

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jasmina N. Đuretić

**UTICAJ STARENJA NA IMUNSKI  
ODGOVOR I NEUROINFLAMACIJU:  
ISPITIVANJA NA MODELU  
EKSPERIMENTALNOG  
AUTOIMUNSKOG  
ENCEFALOMIJELITISA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Jasmina N. Đuretić

**INFLUENCE OF AGING ON IMMUNE  
RESPONSE AND  
NEUROINFLAMMATION: RESEARCH IN  
EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE  
ENCEPHALOMYELITIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2019

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

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

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

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimenti obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom izvedeni su u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu, u okviru projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050), koji je finansijski podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Gordani Leposavić. Od inicijalne ideje, preko ogromnog rada i vremena koji je uložila u osmišljavanje i realizovanje ovih istraživanja, nalaženja kreativnih rešenja u naizgled bezizlaznim situacijama, pa do njene posvećenosti nauci, ona mi je pružala pomoć, učila me i davala primer.*

*Zahvaljujem se prof. dr Zorici Stojić-Vukanić za pomoć u izradi ove doktorske disertacije, a posebno u sagledavanju rezultata vezano za AO pacove.*

*Veliku zahvalnost izražavam dr sc. Ivanu Pilipoviću za izuzetnu pomoć u eksperimentalnom radu, za kritičko čitanje ove doktorske disertacije, ali i zato što me je svojom smirenošću, svojim znanjem, odnosom prema poslu i prema kolegama uvek vraćao na pravi put.*

*Za edukaciju u metodama u imunologiji i ogromnu i nesebičnu pomoć pri izvođenju eksperimenata zahvaljujem se doc. dr Biljani Bufan. Za podršku i pomoć zahvaljujem se i prof. dr Neveni Arsenović-Ranin, dr sc. Mirjani Dimitrijević, doc. dr Mirjani Nacki-Aleksić i dr sc. Dušku Kosecu.*

*Kada je u meni ponestalo energije, došli su, sticajem okolnosti, mladi, divni ljudi da me ohrabre, podrže, zaraze svojim entuzijazmom i energijom – veliko hvala Ivani V., Mariji, Raisi, Ivani Ć. i Veljku.*

*Posebno se zahvaljujem svom suprugu Andreju na razumevanju, svojoj sestri Jadranci i njenoj porodici na pozitivnoj energiji, toplini i ljubavi, koje mi uvek pružaju.*

*Ne postoje reči kojima bih opisala zahvalnost mojim roditeljima. Oni su niti utkane u mene, moje postupke, moju prošlost i budućnost, niti dobrote, sigurnosti i ljubavi.*

*“Treba naučiti penjati se uzbrdo, veslati uzvodno, hodati protiv vetra, zavoleti prepreke. Čovek je večni putnik, večni istraživač...”*

# UTICAJ STARENJA NA IMUNSKI ODGOVOR I NEUROINFLAMACIJU: ISPITIVANJA NA MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA

## Rezime

Starenje utiče na incidenciju većine inflamatornih autoimunskih bolesti, što se povezuje sa starenjem imunskog sistema, tzv. imunološkim starenjem (*engl.* immunosenescence). Budući da je pokazano da postoje značajne individualne razlike u procesu starenja ispitivan je značaj genetskih faktora (sojnih razlika) za starenjem uslovljene promene u incidenciji inflamatornih autoimunskih bolesti kod pacova. Korišćen je model eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) indukovanog inokulacijom homogenata singene kičmene moždine u kompletnom Frojndovom adjuvansu uz ko-administraciju inaktivisane *Bordetella pertussis*, koji mimikrira ranu inflamatornu fazu multiple skleroze, najčešće inflamatorne autoimunske bolesti centralnog nervnog sistema, čija incidencija pokazuje jasnu uzrasnu zavisnost (smanjuje se starenjem). U istraživanja su uključene adultne i stare ženke pacova Dark Agouti (DA) soja, koji pokazuju izrazitu osetljivost na indukciju EAE-a u adultnom uzrastu i pacova Albino Oxford (AO) soja, koji su u adultnom uzrastu relativno rezistentni na indukciju EAE-a. Cilj je bio i da se definišu ćelijski i molekularni mehanizmi, koji bi mogli da budu odgovorni za moguće sojno zavisne starenjem uzrokovane razlike u osetljivosti na indukciju ove bolesti.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da starenje smanjuje incidenciju EAE-a i težinu bolesti kod DA pacova, a da kod AO pacova dovodi do razvoja bolesti blagog protrahovanog toka, koja pokazuje značajnu incidenciju (62,5%). Razlike u kliničkom ispoljavanju bolesti kod ova dva soja pacova su se mogle povezati sa sojnim razlikama u mehanizmima koji su uključeni u kontrolu intenziteta primarnog (auto)imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima, ali i migracije aktivisanih neuroantigen-specifičnih T pomoćničkih 17 (*engl.* T helper 17, Th17) ćelija, posebno zadržavanja u slezini (ekspresija CD44s molekula na površini Th ćelija i zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T-limfocita), kao ključnih za razvoj bolesti u ovom modelu, u ciljni organ (kičmenu moždinu) i autoimunskog

odgovora i inflamacije u kičmenoj moždini. Smanjenje težine neurološkog deficita starenjem kod DA pacova koreliralo je sa smanjenjem veličine mononuklearnog infiltrata i sadržaja Th17 limfocita, a posebno visoko patogenih Th17 limfocita koji sintetišu interferon (*engl.* interferon, IFN)- $\gamma$  i faktor koji stimuliše kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) u ovom infiltratu, dok se starenjem kod AO pacova povećavala i veličina ukupnog mononuklearnog infiltrata i sadržaj visoko patogenih Th17 limfocita u njemu. Ove uzrasne i sojne razlike u broju visoko patogenih Th17 limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu su se mogle povezati sa razlikama u efikasnosti generisanja neuroantigen-specifičnih Th17 ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima, njihovoj podložnosti apoptozi i reaktivaciji u kičmenoj moždini, te karakteristikama lokalne mikrosredine u smislu ekspresije citokina koji su neophodni za usmeravanje i održavanje njihove diferencijacije. Uzrasne i sojne razlike u preživljavanju i reaktivaciji encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini su reflektovale uzrasne i sojne razlike u intrinzičnim karakteristikama ovih ćelija (ekspresija CD134 molekula), zastupljenosti antigen prezentujućih ćelija nastalih iz proinflamatornih monocita, ali i uzrasne i sojne razlike u sposobnosti ćelija u kičmenoj moždini da kontrolišu njihovo preživljavanje (CX3CR1<sup>+</sup> urođenoubilačke ćelije sa protektivnim delovanjem) i reaktivaciju (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorni T-limfociti). Ove razlike su mogle da se povežu i sa razlikama u neuroprotektivnom kapacitetu mikroglialnih ćelija, procenjenom na osnovu njihove sposobnosti da vrše fagocitozu i endocitozu i sekretuju molekule sa neuroprotektivnim/anti-inflamatornim svojstvima. Uzrasnim i sojnim razlikama u broju Th limfocita u kičmenoj moždini pacova doprinele su i razlike u generisanju neuroantigen-specifičnih Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima. Ove razlike su korelirale sa sojnim specifičnostima u aktivaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita, što se moglo povezati sa uzrasnim i sojnim razlikama u broju aktivisanih konvencionalnih dendritskih ćelija, kao i razlikama u proliferativnom kapacitetu CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Za razliku od AO pacova kod kojih starenje nije značajno uticalo na proliferaciju neuroantigen specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kulturi, proliferacija ovih ćelija se starenjem smanjivala kod DA pacova, što se moglo objasniti sa sojnim razlikama u njihovom intrinzičnom kapacitetu za proliferaciju, kao i sa sojnim razlikama u supresornom delovanju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T-limfocita. Starenjem

uslovljeno povećanje efikasnosti generisanja Th17 ćelija kod AO pacova, za razliku od DA pacova (kod kojih je starenje imalo suprotan efekat) se moglo povezati, ne samo sa razlikama u citokinskom profilu lokalne mikrosredine u smislu ekspresije citokina važnih za usmeravanje/održavanje diferencijacije ovih ćelija, već i većom zastupljenosti terminalno diferencijiranih CD11b+CXCR3+CD8+ T-limfocita, koji sintetišu IL-17, budući da je pokazano da ove ćelije „pomažu“ terminalnu diferencijaciju Th17 limfocita i omogućavaju njihov izlazak iz drenirajućih limfnih čvorova, fenomen označen kao “reverzna pomoć” (*engl.* reverse help). Na kraju, imajući u vidu brojne uzrasno i sojno zavisne razlike u mehanizmima razvoja i kontrole Th17 ćelijskog odgovora, od drenirajućih limfnih čvorova do kičmene moždine, ostaje otvoreno pitanje koje su od opisanih razlika nastale primarno, a koje posledično, sekundarno, doprinoseći sojnim i uzrasnim razlikama u kliničkom ishodu imunizacije.

U zaključku, rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju ćelijskih i molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi imunopatogeneze EAE-a, posebno specifičnosti vezanih za starenje, kao i mogućeg značaja genetskih faktora za razvoj ove bolesti. Uz sva ograničenja vezana za translaciju rezultata dobijenih na pacovskim modelima autoimunskih bolesti na odgovarajuće humane bolesti, rezultati dobijeni u ovim istraživanjima bi mogli da budu značajni, ne samo za bolje razumevanje patogeneze i kliničke slike rane inflamatorne faze humane bolesti, posebno individualnih varijacija u njihovim karakteristikama, već, dalekosežno, i za dizajniranje uzrasno i individualno specifičnih terapijskih pristupa u ovoj bolesti.

**Ključne reči:** starenje, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, sojne razlike, GM-CSF i IFN- $\gamma$ -produkujući Th17 limfociti, regulatorni T-limfociti, mikroglija.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija-Imunofarmakologija

**UDK broj:** 57.017.6:616.8-002-097(043.3)



# **INFLUENCE OF AGING ON IMMUNE RESPONSE AND NEUROINFLAMMATION: RESEARCH IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS**

## **Summary**

Aging affects the incidence of most inflammatory autoimmune diseases, which is associated with the aging of the immune system, the so-called immunosenescence. Since it has been shown that there are significant individual differences in the aging process, the significance of genetic factors (strain differences) for age-related changes in the incidence of inflammatory autoimmune diseases in rats was investigated. The model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by inoculation of the syngenic spinal cord homogenate in a complete Freund's adjuvant with co-administration of inactivated *Bordetella pertussis* was used. This model mimics the early inflammatory phase of multiple sclerosis, the most common inflammatory autoimmune disease of the central nervous system, whose incidence shows a clear age dependency (decreases with aging). Young adult and aged female rats of Dark Agouti (DA) strain, which show high susceptibility to EAE induction at a young adult age and rats of Albino Oxford (AO) strain, which are relatively resistant to EAE induction at a young adult age were used in this research. The aim of this doctoral dissertation was to define cellular and molecular mechanisms that could be responsible for presumed strain specificities in age-related changes in the disease induction and development.

The results obtained in this doctoral dissertation showed that aging decreases the incidence of EAE and the disease severity in DA rats, while in AO rats it leads to development of mild clinical disease of prolonged duration, exhibiting a significant incidence (62.5%). Differences in the clinical manifestations of the disease in these two rat strains could be associated with strain differences in the mechanisms involved in controlling the intensity of the primary (auto) immune response in the draining lymph nodes, but also the migration of activated neuroantigen-specific T helper 17 (Th17) cells, in particular their retention in the spleen (Th cell surface expression of CD44s molecule and the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes), the key cells for the development of the disease in this model, to the target organ (spinal cord)

and autoimmune response and inflammation in the spinal cord. Decreased severity of neurological deficit with aging in DA rats correlated with reduced size of mononuclear cell infiltrate and the number of Th17 lymphocytes in spinal cord, and in particular, the frequency of highly pathogenic Th17 cells that synthesize interferon (IFN)- $\gamma$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in this infiltrate, while in AO rats mononuclear cell infiltrate size and the frequency of highly pathogenic Th17 lymphocytes in it increased with aging. These age- and strain-related differences in the number of highly pathogenic Th17 lymphocytes infiltrating the spinal cord could be associated with the differences in the efficacy of neuroantigen-specific Th17 cell generation in draining lymph nodes, in their susceptibility to apoptosis and reactivation in the spinal cord, and in the characteristics of the local microenvironment in terms of expression of cytokines which are necessary for directing and maintaining their differentiation. Age- and strain-related differences in the survival and reactivation of encephalitogenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the spinal cord reflected age and strain-related differences in the intrinsic characteristics of these cells (expression of CD134 molecule), in the frequency of antigen presenting cells derived from proinflammatory monocytes, but also age- and strain-related differences in the ability of the cells in the spinal cord to control their survival (CX3CR1<sup>+</sup> natural killer cells with a protective role) and reactivation (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes). These differences could also be associated with the differences in the neuroprotective capacity of the microglia, estimated based on their capacity for phagocytosis and endocytosis and for secretion of molecules with neuroprotective/anti-inflammatory properties. Age- and strain-related differences in the number of Th lymphocytes in the spinal cords of rats were also linked with differences in the generation of neuroantigen-specific Th17 lymphocytes in draining lymph nodes. These differences correlated with the strain specificities in the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, which could be associated with age- and strain-related differences in the number of activated conventional dendritic cells, as well as with the differences in the proliferative capacity of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. In contrast to AO rats in which aging did not significantly affect the proliferation of neuroantigen specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in culture, in DA rats the proliferation of these cells decreased with aging, which could be explained by the strain differences in their intrinsic proliferative capacity, and by strain differences in

suppressive action of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes. Increase in efficiency of Th17 cell generation in AO rats with aging, unlike DA rats (in which aging had the opposite effect), could be linked, not only with differences in the cytokine profile of the local microenvironment in terms of expression of cytokines important for directing/maintaining the differentiation of these cells, but also with greater frequency of terminally differentiated CD11b<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which synthesize IL-17, since it has been shown that these cells "help" the terminal differentiation of Th17 lymphocytes and allow their migration from draining lymph nodes, a phenomenon termed "reverse help". Finally, bearing in mind many age- and strain-related differences in the mechanisms of development and control of the Th17 cell response, an open question remains which of the described differences developed primarily, and which ones were, consequently, secondary, contributing to the strain- and age-related differences in the clinical outcome of immunization.

In conclusion, the results of the research conducted within this doctoral dissertation contribute to a better understanding of the cellular and molecular mechanisms that underlie the EAE immunopathogenesis, and the age-related specificities in particular, as well as the possible significance of genetic factors for the development of this disease. With all the limitations associated with translating the results obtained in rat autoimmune disease models to corresponding human diseases, the results obtained in this doctoral dissertation could be significant, not only for a better understanding of the pathogenesis and clinical picture of the early inflammatory phase of the human disease, and particularly individual variations in its characteristics, but ultimately, also for designing age- and individually-specific therapeutic approaches for this disease.

**Key words:** aging, experimental autoimmune encephalomyelitis, strain differences, GM-CSF and IFN- $\gamma$ -producing Th17 lymphocytes, regulatory T-lymphocytes, microglia.

**General subject area:** Pharmacy

**Subject area:** Pharmacology-Immunopharmacology

**UDC number:** 57.017.6:616.8-002-097(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Uticaj starenja na imunski odgovor</b> .....	1
1.1.1. Uticaj starenja na matične hematopoetske ćelije.....	1
1.1.2. Uticaj starenja na stečeni imunski odgovor.....	2
1.1.3. Uticaj starenja na urođeni imunski odgovor .....	6
1.1.4. Uticaj starenja na sekreciju proinflamatornih citokina .....	9
1.1.5. Uticaj starenja na neuroinflamaciju.....	11
1.1.6. Starenje imunskog sistema i autoimunost .....	13
<b>1.2. Uticaj starenja na incidenciju i kliničke karakteristike multiple skleroze</b> .....	14
1.2.1. Incidencija i patogeneza multiple skleroze .....	14
1.2.2. Uticaj starenja na kliničke karakteristike multiple skleroze.....	16
<b>1.3. Uzrasne i sojne razlike u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu</b> .....	16
1.3.1. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis .....	16
1.3.2. Uticaj starenja i soja na incidenciju i klinički tok EAE-a .....	20
<b>1.4. Sojne razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a kod DA i AO pacova</b> .....	21
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	25
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b> .....	25
<b>3.2. Eksperimentalni protokol</b> .....	25
<b>3.3. Indukcija EAE-a i evaluacija kliničke slike imunizovanih životinja</b> .....	27

<b>3.4. Histopatološka analiza tkiva kičmene moždine</b> .....	28
<b>3.5. Hemikalije, antitela i imunokonjugati</b> .....	28
<b>3.6. Izolacija mononuklearnih ćelija</b> .....	33
3.6.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine .....	33
3.6.2. Izolacija mononuklearnih ćelija iz slezine i drenirajućih limfnih čvorova.....	33
3.6.3. Magnetno izdvajanje CD11b+ ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD4+ T-limfocita iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine/slezine/drenirajućih limfnih čvorova.....	33
3.6.4. Stimulacija ćelija kičmene moždine i drenirajućih limfnih čvorova za analizu sinteze citokina protočnom cito fluorometrijom .....	34
3.6.5. Kultivisanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova za analizu sinteze citokina nakon stimulacije MBP-om ( <i>engl.</i> “recall cytokine production” test) .....	35
3.6.6. Kultivisanje mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova za analizu proliferacije CD4+ i CD8+ T-limfocita .....	35
3.6.7. Analiza fagocitoze lateksnih čestica .....	36
3.6.8. Analiza endocitoze dekstrana .....	36
<b>3.7. Protočna cito fluorometrija</b> .....	37
3.7.1. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih anti gena .....	37
3.7.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije unutarćelijskih anti gena ...	37
3.7.3. Analiza ćelijskog ciklusa CD4+ i CD8+ limfocita bojenjem nuklearnom bojom 7-AAD .....	38
3.7.4. Određivanje procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u CD4+ T-limfocitima kičmene moždine .....	38
3.7.5. Analiza uzoraka protočnom cito fluorometrijom .....	38
<b>3.8. Određivanje koncentracije citokina enzimskim imunološkim metodama</b> .....	39

3.8.1.	Određivanje koncentracije IL-17A.....	40
3.8.2.	Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$ .....	40
<b>3.9.</b>	<b>Relativna kvantifikacija ekspresije gena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.....</b>	<b>41</b>
3.9.1.	Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine/slezine/drenirajućih limfnih čvorova i CD11b+ ćelija kičmene moždine	41
3.9.2.	Prevođenje ukupne RNK u cDNK .....	41
3.9.3.	Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu.....	42
<b>3.10.</b>	<b>Statistička obrada podataka.....</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.</b>	<b>Uticaj starenja na kliničku i histološku sliku EAE-a kod pacova DA i AO soja.....</b>	<b>44</b>
4.1.1.	Starenje smanjuje osetljivost DA pacova na indukciju EAE-a, a povećava osetljivost AO pacova na indukciju EAE-a.....	44
4.1.2.	Uticaj starenja na histološku sliku EAE-a kod DA i AO pacova je sojno zavisian.....	45
<b>4.2.</b>	<b>Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a .....</b>	<b>46</b>
4.2.1.	Uzrasne i sojne razlike u ukupnom broju mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine .....	47
4.2.2.	Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama fenotipskih i funkcijskih karakteristika CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a .....	47
4.2.2.1.	Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD4+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine i njihovom ukupnom broju.....	47

4.2.2.2. <i>Uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti aktivisanih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini pacova izolovanih u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	48
4.2.2.3. <i>Uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	51
4.2.2.4. <i>Uticao starenja na ekspresiju IL-17 u CD4+ T-limfocitima DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	52
4.2.2.5. <i>Uticao starenja na ekspresiju IFN-<math>\gamma</math> u CD4+ T-limfocitima DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	57
4.2.3. <i>Sojne razlike u uticaju starenja na fenotipske i funkcijske karakteristika CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	60
4.2.3.1. <i>Uzrasne i sojne razlike u proliferaciji CD8+ T limfocita izolovanih iz kičmene moždine</i> .....	62
4.2.3.2. <i>Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ i IFN-<math>\gamma</math>+ ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine</i> .....	63
4.2.4. <i>Uticao starenja na zastupljenost i funkcijske karakteristike subpopulacija limfocita sa protektivnim ulogom u patogenezi EAE u kičmenoj moždini DA i AO pacova izolovanih u efektorskoj fazi bolesti</i> .....	69
4.2.4.1. <i>Uticao starenja na zastupljenost T-limfocita regulatornog CD25+Foxp3+ fenotipa u kičmenoj moždini DA i AO pacova</i> .....	69
4.2.4.2. <i>Uticao starenja na zastupljenost NK ćelija u kičmenoj moždini DA i AO pacova i njihove fenotipske karakteristike</i> .....	72
4.2.5. <i>Uticao starenja na fenotipske karakteristike CD11b+ ćelija u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a</i> .....	76
4.2.5.1. <i>Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u okviru ćelija mikroglije</i> .....	78

4.2.5.2. <i>Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje sintetišu IL-1<math>\beta</math> u okviru mikroglije.....</i>	80
4.2.5.3. <i>Uzrasne i sojne razlike u fagocitnoj sposobnosti ćelija mikroglije.....</i>	82
4.2.5.4. <i>Uzrasne i sojne razlike u ekspresiji iRNK za transformišući faktor rasta-beta (TGF-<math>\beta</math>) i hem-oksigenazu (HO)-1 u CD11b+ ćelijama mikroglije.....</i>	83
<b>4.3. Uticaj starenja na zadržavanje CD4+ T-limfocita u slezini DA i AO pacova imunizovanih u cilju indukcije EAE-a.....</b>	<b>84</b>
4.3.1. Starenje povećava ekspresiju CD44 na CD4+ T-splenocitima .....	87
<b>4.4. Uticaj sojnih razlika na starenjem uslovljene promene fenotipskih i funkcijskih karakteristika mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a .....</b>	<b>89</b>
4.4.1. Uticaj starenja na ukupni broj CD4+ T-limfocita, njihov aktivacioni status i proliferaciju .....	89
4.4.2. Uticaj starenja na zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova.....	96
4.4.3. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.....	101
4.4.4. Uticaj starenja na dendritske ćelije izolovane iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a .....	102
4.4.4.1. <i>Uticaj starenja na zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima AO i DA pacova u induktivnoj fazi EAE-a i odnos aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija i konvencionalnih CD25+Foxp3-CD4+ T-limfocita.....</i>	<i>103</i>
4.4.5. Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike efektorskih CD8+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.....	108



4.4.5.1. Uticaj starenja na zastupljenost CD8+ T-limfocita i njihovu proliferaciju u drenirajućim limfnim čvorovima AO i DA pacova u induktivnoj fazi EAE-a.....	109
4.4.5.2. Uticaj starenja na zastupljenost terminalno diferenciranih/efektorskih CD8+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima.....	111
4.4.5.3. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 i IFN- $\gamma$ u CD8+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova izolovanih u induktivnoj fazi EAE-a.....	112
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>118</b>
<b>5.1. Uticaj starenja na osetljivost na indukciju, kliničku i histološku sliku EAE-a kod DA i AO pacova.....</b>	<b>118</b>
<b>5.2. Starenje utiče na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija kičmene moždine koje učestvuju u patogenezi EAE-a, na sojno zavisian način.....</b>	<b>119</b>
<b>5.3. Uticaj starenja na zadržavanje CD4+ T-limfocita u slezini imunizovanih DA i AO pacova u cilju indukcije EAE-a.....</b>	<b>132</b>
<b>5.4. Sojne specifičnosti u uticaju starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova koji su imunizovani u cilju indukcije EAE-a.....</b>	<b>133</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>143</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>145</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Uticaj starenja na imunski odgovor

Tokom starenja dolazi do kontinuiranog remodelovanja imunskog sistema (starenja imunskog sistema), tako da se neke funkcije ovog sistema smanjuju, druge ostaju bez bitnih promena ili se čak pojačavaju (Burkle i sar., 2007; Pawelec, 2014). Starenjem imunskog sistema (*engl.* immunosenescence) dolazi do promene svih tipova imunskih ćelija, i cirkulišućih faktora (citokina, hemokina i drugih solubilnih molekula) (Nikolich-Žugich, 2017). Shodno tome, promene koje nastaju tokom starenja zahvataju oba odeljka imunskog sistema, odnosno i urođeni i stečeni imunski sistem. Međutim, smatra se da su ove promene izraženije u stečenom odeljku imunskog sistema, a posebno u njegovom T-ćelijskom subodeljku (Müller i Pawelec, 2015). Iako su brojne starenjem uslovljene promene imunskog sistema detektovane i objašnjene, ostaju nerasvetljeni međusobni uticaji ovakvih promena, kao i koje od promena nastaju kao direktna posledica starenja, a koje kao posledica kompenzacije ili prilagođavanja primarnim promenama koje nastaju starenjem u imunskom sistemu (Nikolich-Žugich, 2017).

#### 1.1.1. Uticaj starenja na matične hematopoetske ćelije

Proliferativni kapacitet matičnih hematopoetskih ćelija kostne srži, koje mogu diferencirati kako u limfoidne, tako i u mijeloidne progenitore, starenjem se smanjuje (Lansdorp i sar., 1994). Osim smanjenja proliferativnog kapaciteta matičnih hematopoetskih ćelija kostne srži, uočena je i njihova veća sposobnost diferencijacije ka mijeloidnim, nego ka limfoidnim progenitorima (Rossi i sar., 2005; Cho i sar., 2008; Geiger i Rudolph, 2009). Stoga, kostna srž starih miševa sadrži veći broj mijeloidnih progenitora na račun limfoidnih u poređenju sa kostnom srž mladih životinja (Rossi i sar., 2005). Ovo se povezuje sa efikasnijim urođenim, a slabijim stečenim imunskim odgovorom kod starih (Rossi i sar., 2005). Međutim, ukazano je i na postojanje intrinzičnih defekta mijeloidnih progenitora kod starih miševa (Signer i sar., 2007), koji dovode do manje efikasne mijelopoese nego kod mladih miševa, što objašnjava činjenicu da nema značajnih razlika u broju zrelih mijeloidnih ćelija kod mladih i starih

---

miševa. Međutim, treba naglasiti da ovi intrinzični defekti mogu doprineti smanjenju funkcije mijeloidnih ćelija kod starih životinja (Signer i sar., 2007). Pokazano je da starenjem uslovljenim promenama matičnih hematopoetskih ćelija doprinose genetski faktori. Kod starih D2 miševa izraženija je sklonost ovih ćelija da diferenciraju u mijeloidne nego u limfoidne progenitore, u poređenju sa B6 miševima, sa posledičnim smanjenjem broja prekursora T-limfocita i B-limfocita (Cho i sar., 2008). Smatra se da bi smanjenje broja limfoidno opredeljenih matičnih hematopoetskih ćelija moglo doprineti većoj incidenciji infektivnih (Pfister i sar., 2008) i malignih (Yancik, 2005) bolesti kod starih jedinki. Pretpostavlja se da bi sledeći mehanizmi mogli da stoje u osnovi starenjem uslovljenih promena u hematopoetskom odeljku kostne srži: 1) skraćenje telomera (Vaziri i sar., 1994); 2) epigenetske promene, tako da mijeloidni progenitori pokazuju manju metilaciju DNK u poređenju sa limfoidnim (Chambers i sar., 2007; Ji i sar., 2010) i 3) promene citokinskog okruženja (Challen i sar., 2010).

### 1.1.2. Uticaj starenja na stečeni imunski odgovor

Iako starenje utiče na sve tipove ćelija imunskog sistema, smatra se da su starenjem uzrokovane promene posebno izražene u ćelijama stečene imunosti, i da najviše pogađaju T-limfocite (Nikolich-Zugich, 2014; Müller i Pawelec, 2015). Involucija timusa je biološki fenomen karakterističan za starenje, koji obuhvata smanjenje mase organa i celularnosti, kao i promene u tkivnoj organizaciji koje se ogledaju u zameni funkcionalnog tkiva kore i srži timusa masnim tkivom, što posledično vodi manjem stvaranju i izlasku naivnih T-limfocita iz timusa na periferiju (Taub i Longo, 2005; Lynch i sar., 2009). U uslovima starenjem uslovljene atrofije (involucije) timusa i smanjenja broja timusnih emigranata, održavanje ukupnog broja T-limfocita relativno konstantnim ostvaruje se homeostatskom proliferacijom memorijskih T-ćelija (dugoživećih ćelija generisanih nakon prvog izlaganja antigena) na periferiji (Berzins i sar., 2002). Ovo se povezuje sa sužavanjem T-ćelijskog repertoara i promenom odnosa naivnih i memorijskih T-limfocita u korist memorijskih (Berzins i sar., 2002; Goronzy i sar., 2007). Osim kvantitativnih, tokom starenja u T-ćelijskom odeljku dolazi i do kvalitativnih promena. Naivni T-limfociti starih osoba pokazuju brojne funkcionalne defekte, uključujući smanjenu produkciju interleukina (IL)-2, poremećaje u proliferaciji i diferencijaciji u efektorske ćelije u poređenju sa ovim

ćelijama mladih osoba (Haynes i sar., 1999; Pfister i sar., 2006). Posledično, sposobnost T-ćelija da obezbede efikasan imunski odgovor na nove antigenske "izazove" se smanjuje. Međutim, starenje smanjuje i sposobnost efikasnog imunskog odgovora na antigene sa kojima se imunski sistem već susreo, čemu doprinosi i izmenjen aktivacioni potencijal memorijskih T-limfocita, još jedna od važnih promena do kojih dolazi starenjem imunskog sistema (Lerner i sar., 1989; Nel i Slaughter, 2002). Defekti u formiranju imunološke sinapse utvrđeni su kako kod naivnih (Garcia i Miller, 2001), tako i kod memorijskih (Eisenbraun i sar., 2001) T-limfocita starih miševa. S obzirom na to da kostimulatorni molekul CD28 ima značajnu ulogu i u regulaciji citoskeleta (Zumerle i sar., 2017), starenjem uslovljeno smanjenje u površinskoj ekspresiji ovog molekula bi moglo uticati na uspešno formiranje imunološke sinapse (Nel i Slaughter, 2002; Weng i sar., 2009). Gubitak površinske ekspresije CD28 kostimulatornog molekula starenjem daleko je izraženiji na CD8<sup>+</sup> nego CD4<sup>+</sup> T-limfocitima (Goronzy i sar., 2001). Budući da je pokazano da visoka zastupljenost CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-limfocita u perifernoj krvi korelira sa slabijim imunskim odgovorom na vakcinaciju, smatra se da bi zastupljenost ovih ćelija mogla da predstavlja biološki marker kompromitovane imunokompetentnosti (Goronzy i sar., 2001). Gubitak ekspresije CD28 molekula na CD4<sup>+</sup> T-limfocitima praćen je i "defektom" u ekspresiji CD154 (CD40L) molekula (Weiskopf i sar., 2009), što se povezuje sa smanjenom sposobnošću ovih ćelija da pomognu proliferaciju B limfocita, kao i stvaranje antitela. Osim toga, CD28<sup>-</sup> T-limfociti pokazuju smanjenu osetljivost na apoptotske signale, i smanjeni proliferativni kapacitet (Vallejo, 2005). S druge strane, pokazano je i da ove ćelije migriraju na mesto inflamacije, sintetišu velike količine interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), kao i citotoksičnih enzima, perforina i granzima B, i da doprinose oštećenju tkiva i stvaranju sredine u kojoj autoreaktivni T-limfociti mogu biti aktivisani i na nespecifičan način (Broux i sar., 2012; Thewissen i sar., 2007; Peeters i sar., 2017). Osim tokom starenja, nađeno je povećanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-limfocita u perifernoj krvi tokom razvoja autoimunskih bolesti, što se povezuje sa atrofijom timusa indukovanom delovanjem proinflamatornih citokina, kao i njihovim direktnim delovanjem na CD4<sup>+</sup> T-limfocite (Schmidt i sar., 1996; Moosig i sar., 1998; Fasth i sar., 2004; Sun i sar., 2008; Maly i sar., 2015; Lee i sar., 2016). Prisustvo ovih ćelija detektovano je i u moždanim lezijama i perifernoj krvi bolesnika sa multiplom sklerozom (Thewissen i sar., 2007; Broux i sar.,

---

2012; Peeters i sar., 2017), kao i u sklopu razvoja eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) kod glodara (Vanheusden i sar., 2017), uključujući i pacove Dark Agouti (DA) soja (Nacka-Aleksić i sar., 2018).

Molekularne studije pokazuju da su T-ćelije programirane da kako se približavaju završnim stadijumima svog replikativnog životnog veka, eksprimiraju receptore karakteristične za urođenoubilačke ćelije (*engl.* natural killer cells, NK ćelije) (Abedin i sar., 2005). Pokazano je da T-limfociti starih osoba postaju skloniji aktivaciji posredstvom receptora urođene imunosti, poput receptora ubilačkih ćelija sličnih imunoglobulinima (*engl.* killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs) ili receptora ubilačkih ćelija sličnih lektinima (*engl.* killer cell lectin-like receptors, KLRs), tipičnim za funkciju NK ćelija (Abedin i sar., 2005). Smatra se da ekspresija receptora karakterističnih za NK ćelije na T-limfocitima starih jedinki predstavlja adaptivni mehanizam (Abedin i sar., 2005; Vallejo, 2006), u uslovima sužavanja T-ćelijskog repertoara i niza promena u urođenom imunskom odgovoru do kojih dolazi starenjem, uključujući i defekte u funkciji NK ćelija (Plackett i sar., 2004). Do danas ostaje nejasno koje bi bile sve reperkusije ekspresije receptora urođene imunosti na T-limfocitima, odnosno da li bi ovo vodilo smanjenoj sposobnosti organizma za adekvatan imunski odgovor nakon izlaganja antigenu, ili bi bilo korisno za održavanje homeostaze u organizmu u bazalnim uslovima (Goronzy i sar., 2012). Starenje dovodi i do promena na nivou gotovo svih puteva sprovođenja signala od T-ćelijskog receptora (TCR) (Henson, 2017). Promene su detektovane na nivou fosforilacije tirozinskih ostataka proteina, mobilizacije kalcijuma i translokacije protein kinaze C do plazma membrane (Pahlavani, 1998; Garcia i Miller, 2009; Larbi i sar., 2004). Dakle, T-ćelijski odgovor kod starih osoba je usporen i manjeg intenziteta nego kod mladih, posmatrano bilo kroz indukciju prenosa signala (Larbi i sar., 2006) ili proliferaciju T-ćelija (Plunkett i sar., 2007). Promene funkcije T-limfocita nastale starenjem, mogu biti prevaziđene delovanjem inflamatornih citokina ili adjuvanasa (Haynes i sar., 2004; Sharma i sar., 2008). Konačno, starenjem nastale intrinzične promene T-limfocita, pre svega njihova smanjena sposobnost da se aktiviraju i proliferiraju, mogu doprinostiti manjoj incidenciji autoimunskih bolesti kod starih (Tatari-Calderone i sar., 2012). Opisane su sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u T-ćelijskom odeljku miševa, poput onih u

---

zastupljenosti naivnih i memorijskih/aktivisanih T-splenocita (Pinchuk i Filipov, 2008) ili u proliferativnom kapacitetu T-limfocita (Vibert i Thomas-Vaslin, 2017).

Starenje utiče ne samo na konvencionalne T-ćelije, već i na regulatorne T-limfocite (Treg) (Jagger i sar., 2014; Henson, 2017), koji imaju ulogu da spreče aktivaciju autoreaktivnih limfocita, suprimiraju razvoj alergije i patogenom indukovane imunopatologije (Corthay, 2009). Pokazano je da starenjem kod miševa u sekundarnim limfnim organima (Sharma i sar., 2006; Chiu i sar., 2007), kao i kod ljudi u perifernoj krvi (Gregg i sar., 2005), dolazi do povećanja kako procentualne zastupljenosti Treg u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita, tako i apsolutnog broja ovih ćelija. U okviru CD4<sup>+</sup> Treg razlikuju se dve populacije ćelija: prirodne ili urođene Treg ćelije (*engl.* natural regulatory T cells, nTreg), koje nastaju u timusu i adaptivne ili inducibilne Treg ćelije (*engl.* inducible regulatory T cells, iTreg), koje nastaju aktivacijom konvencionalnih T-limfocita na periferiji (Feuerer i sar., 2009; Huehn i sar., 2009). Ostaje nejasno da li je povećanje broja Treg starenjem, na račun nTreg ili iTreg, ili ovo povećanje reflektuje povećanje broja ćelija koje pripadaju i jednom i drugom subsetu Treg. Od pretpostavljenih mehanizama, koji bi mogli objasniti veće prisustvo Treg kod starih jedinki, istraživanja ukazuju na ključnu ulogu boljeg preživljavanja ovih ćelija na periferiji (Raynor i sar., 2013; Jagger i sar., 2014). Pokazano je da Treg ćelije starih jedinki ostvaruju nishodnu regulaciju gena za proapoptotski Bim [protein 11 sličan B-ćelijskom limfomu (Bcl) 2] protein, koji pripada Bcl-2 familiji proteina, što im obezbeđuje prednost u preživljavanju u poređenju sa Treg ćelijama mladih jedinki (Chougnet i sar., 2011). S druge strane postoje i podaci koji pokazuju da se starenjem povećava i zastupljenost CD4<sup>+</sup> iTreg (Sharma i sar., 2006; Rosenkranz i sar., 2007; Raynor i sar., 2012). Pokazano je da kod starih miševa postoji korelacija između povećanog broja iTreg ćelija i oslabljenog imunskog odgovora na antigene tumora (Sharma i sar., 2006), i patogena (Belkaid i Rouse, 2005; Lages i sar., 2008). Posledično, akumulacija iTreg kod starih osoba se povezuje sa većom incidencijom malignih bolesti kod starih, većom incidencijom i težim kliničkim tokom infektivnih bolesti, a manjom efikasnosti vakcinacije u ovoj uzrasnoj populaciji (Pawelec i sar., 2002; Taub i Longo, 2005; Dejaco i sar., 2006). Osim toga, akumulacija Treg kod starih se povezuje sa manjom incidencijom većine autoimunskih bolesti kod starih u poređenju sa pojavom ovih bolesti u pubertetu ili adultnom uzrastu (Beeson, 1994;

---

Vadasz i sar., 2013; Watad i sar., 2017). Pokazane su i razlike u zastupljenosti CD4+ Treg u limfnim čvorovima različitih sojeva miševa, kao i da je manja zastupljenost ovih ćelija pozitivno korelirala sa predispozicijom za spontani razvoj autoimunskih bolesti (Tucker i sar., 2011). Smatra se i da je odnos Treg i efektorskih T-limfocita genetski kontrolisan, a da je disbalans odnosa ovih ćelija značajan faktor koji utiče na razvoj određenih autoimunskih bolesti (Tucker i sar., 2011).

Starenjem dolazi i do značajne promene u humoralnom imunskom odgovoru. Kod ljudi i miševa utvrđeno je da starenje utiče na smanjenje somatskih hipermutacija u B-limfocitima i promene klase teških lanaca (Frasca i sar., 2008). Takođe, starenjem dolazi i do nishodne regulacije ekspresije aktivacijom-indukovane citidin deaminaze (*engl.* activation-induced cytidine deaminase, AID), koja je potrebna kako za somatske hipermutacije, tako i za promenu klase teških lanaca (Frasca i sar., 2008). Postojanje „defekta“ u ovim mehanizmima kompromituje stvaranje efikasnih antitela kod starih ljudi i miševa (Frasca i sar., 2008).

Kod starih miševa opisan je slabiji humoralni imunski odgovor u poređenju sa mladim miševima, s tim da je ova nishodna regulacija humoralnog imunskog odgovora bila različitog stepena kod različitih sojeva ispitivanih miševa (Asanuma i sar, 2001).

### 1.1.3. Uticaj starenja na urođeni imunski odgovor

Iako se smatra da starenjem uslovljene promene prevashodno zahvataju ćelije stečene imunosti, sve je više podataka koji pokazuju da starenje pogađa i ćelije urođene imunosti (Caruso, 2009). Promene urođene imunosti u starenju su složene i vode slabijem urođenom imunskom odgovoru, ali paradoksalno i ushodnoj regulaciji nekih signalnih puteva, poput pojačane fosforilacije STAT (*engl.* signal transducer and activator of transcription)1 i STAT3, kao i porastu koncentracije citokina, kao što su IL-6 i faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  (Montgomery i Shaw, 2015).

Brojne funkcije makrofaga takođe mogu biti pogođene procesom starenja. Pokazano je da se starenjem smanjuje fagocitna sposobnost makrofaga što dovodi do produženog uklanjanja ćelijskog debrija u oštećenom tkivu i posledično kompromituje reparaciju oštećenog tkiva (Swift i sar., 2001; Plowden i sar., 2004). Starenjem se

---

smanjuje i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika u makrofagima, što ima za posledicu smanjenu efikasnost makrofaga u uklanjanju patogena (Plowden i sar., 2004). Peritonealni makrofagi starih miševa nakon stimulacije lipopolisaharidom (*engl.* lipopolysaccharide, LPS) sintetišu veće količine prostaglandina E2 u odnosu na mlade miševе (Wu i sar., 1998). Pokazano je da se starenjem menja i citokinski sekretorni profil mišjih makrofaga. Preciznije, nađeno je da se starenjem povećava sposobnost mišjih makrofaga da sintetišu IL-10, a smanjuje sposobnost sinteze IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Chelvarajan i sar., 2005; Sebastian i sar., 2005; Shaw i sar., 2010). Ispitivanja uticaja starenja na makrofage pacova pokazala su da su starenjem uslovljene promene u sekreciji citokina sojno zavisne (Dimitrijević i sar., 2014). Konkretno, nađeno je da se starenjem smanjuje sposobnost peritonealnih makrofaga pacova DA soja da sintetišu TNF- $\alpha$  i IL-10 nakon stimulacije LPS-om u kulturi, dok peritonealni makrofagi pacova Albino Oxford (AO) soja starenjem povećavaju sintezu ovih citokina u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Dimitrijević i sar., 2014). Osim toga, u slezini, limfnim čvorovima i kostnoj srži starih miševa, u poređenju sa mladim miševima, odnos proinflamatornih M1 i antiinflamatornih M2 makrofaga (Mantovani i sar., 2004) se pomera na stranu M2 makrofaga (Jackaman i sar., 2013). Kod starih AO pacova utvrđeno je da je u peritonealnim makrofagima, metabolizam arginina usmeren više prema sintezi uree nego azot (II) oksida (Dimitrijević i sar., 2014), što bi išlo u prilog polarizacije makrofaga u M2 makrofage (Thomas i Mattila, 2014). Uz sve ove promene pokazano je i da se starenjem smanjuje ekspresija molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) II klase na površini makrofaga miševa nakon stimulacije IFN- $\gamma$  (Herrero i sar., 2001), što implicira i manju sposobnost ovih ćelija da prezentuju antigene CD4+ T-limfocitima.

Do danas nije formirana potpuno jasna slika o uticaju starenja na dendritske ćelije. Primećeno je da starenje utiče na kapacitet mišjih dendritskih ćelija da preuzimaju antigene endocitozom, što se manifestuje redukcijom broja i veličine endocitoznih vakuola (Chougnet i sar., 2015). Smatra se da je u osnovi ove promene smanjeno stvaranje adenzin-trifosfata i pad membranskog potencijala mitohondrija (Chougnet i sar., 2015). Pokazano je da mišje dendritske ćelije pokazuju i smanjenu fagocitoznu sposobnost (Chougnet i sar., 2015). Kod starih osoba je pokazan i „defekt“



---

u migratornoj sposobnosti dendritskih ćelija diferenciranih iz monocita, kao i povećana produkcija TNF- $\alpha$  i IL-6 nakon stimulacije ovih ćelija LPS-om i jednolančanom ribonukleinskom kiselinom (RNK), a IL-6 i IFN- $\alpha$  nakon stimulacije sopstvenom dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) u poređenju sa dendritskim ćelijama mladih jedinki (Agrawal i sar., 2009). Smatra se da se ove starenjem nastale promene dendritskih ćelija mogu pripisati smanjenoj aktivnosti fosfoinozitol 3 kinaze (Agrawal i sar., 2007).

Pokazano je da se starenjem menjaju i pacovske dendritske ćelije. Konvencionalne dendritske ćelije pacova, posebno značajne za aktivaciju i polarizaciju autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u EAE-u (Greter i sar., 2005; McMahon i sar., 2005), starenjem pokazuju i fenotipske i funkcijske promene, kao i da su te promene sojno zavisne (Voisine i sar., 2002; Stojić-Vukanić i sar., 2013; Bufan i sar., 2015). Kod AO pacova nađeno je starenjem uslovljeno povećanje procentualne zastupljenosti CD4-ćelija u okviru populacije slezinskih konvencionalnih dendritskih ćelija (Stojić-Vukanić i sar., 2013). Ove ćelije, za razliku od CD4<sup>+</sup> konvencionalnih dendritskih ćelija, mogu da oslobađaju velike količine proinflammatoryh citokina i da usmeravaju imunski odgovor ka tipu 1 pomoćničkih T-ćelija (*engl.* Type 1 T helper cells, Th1) (Voisine i sar., 2002). S druge strane, starenje kod DA pacova nije uticalo na promenu procentualne zastupljenosti CD4-ćelija u okviru slezinskih konvencionalnih dendritskih ćelija (Bufan i sar., 2015). Nakon *in vitro* stimulacije LPS-om konvencionalne dendritske ćelije starih AO pacova pokazale su veću sekreciju IL-6 i IL-23, ali i IL-12 i TNF- $\alpha$  u poređenju sa ovim ćelijama mladih pacova istog soja (Stojić-Vukanić i sar., 2013). S druge strane, konvencionalne dendritske ćelije starih DA pacova nakon stimulacije LPS-om, u poređenju sa ovim ćelijama izolovanim iz mladih pacova istog soja, sekretovale su više IL-6 i IL-23, ali i IL-10, dok je sekrecija TNF- $\alpha$  bila smanjena (Bufan i sar., 2015). Konzistentno prethodnim nalazima, ispitivanja u ko-kulturi alogenih CD4<sup>+</sup> limfocita izolovanih iz mladih životinja i konvencionalnih dendritskih ćelija AO pacova pokazala su da se koncentracije IFN- $\gamma$  i IL-17 u ovim kulturama povećavaju u prisustvu dendritskih ćelija starih životinja u poređenju sa dendritskim ćelijama mladih pacova, dok se u ko-kulturi alogenih CD4<sup>+</sup> limfocita i konvencionalnih dendritskih ćelija DA pacova koncentracije IFN- $\gamma$  i IL-17 nisu značajno menjale u

---

prisustvu dendritskih ćelija starih životinja u poređenju sa dendritskim ćelijama mladih pacova (Stojić-Vukanić i sar., 2013).

Starenje kod ljudi povećava apsolutni broj NK ćelija u perifernoj krvi (Almeida-Oliveira i sar., 2011). Osim promene u broju ovih ćelija, starenje utiče i na povećanje zastupljenosti NK ćelija sa izraženijom citotoksičnom funkcijom i smanjenje onih odgovornih za produkciju citokina kod ljudi (Krishnaraj i Bhooma, 1996; Almeida-Oliveira i sar., 2011). Veći broj rezultata potvrđuje i da se kod ljudi citotoksičnost na nivou pojedinačne NK ćelije smanjuje starenjem (Mariani i sar., 1996; Hazeldine i sar., 2012). Osim toga, pokazano je da se kod miševa tokom starenja značajno menja sposobnost sazrevanja NK ćelija, te da kod starih miševa ove ćelije pokazuju značajan funkcijski deficit (Nair i sar., 2015). Utvrđena je i smanjena sposobnost NK ćelija da migriraju iz krvi u limfni čvor koji drenira mesto infekcije kod starih miševa (Fang i sar., 2010).

Konačno, iako nema podataka o sojnim razlikama u uticaju starenja na funkcijski kapacitet NK ćelija, važno je istaći da su uočene značajne sojne razlike u funkcijskom kapacitetu NK ćelija mladih miševa (Whyte i Miller, 1998).

#### 1.1.4. Uticaj starenja na sekreciju proinflamatornih citokina

Uočeno je da tokom starenja dolazi do progresivnog porasta koncentracije proinflamatornih markera u perifernoj krvi (Franceschi i sar., 2000). Ovaj fenomen opisuje se terminom “inflamatorno” starenje (*engl.* inflammaging) (Franceschi i sar., 2000). Iako postoji više teorija koje pokušavaju da objasne ovaj fenomen, nijedna od njih ne opisuje na zadovoljavajući način ovaj fenomen. Prema “teoriji stresa” organizam je konstantno izložen delovanju stresora, i ovaj fenomen nastaje kao rezultanta njihovog delovanja (Butcher i Lord, 2004; Xia i sar., 2016). Druga teorija povezuje oksidativni stres, inflamaciju i starenje (De La Fuente i Miquel, 2009). Prema ovoj teoriji, starenjem uslovljene promene u imunskom sistemu nastaju kao rezultanta delovanja oksidativnog i inflamatornog stresa, koji u imunskim ćelijama dovode do aktivacije signalnog puta nuklearnog faktora kapa B (De La Fuente i Miquel, 2009). Smatra se da ovaj signalni put ima ključnu ulogu u odgovoru imunskih ćelija na infekciju, dok se poremećaji ovog signalnog puta dovode u vezu sa razvojem tumora, inflamatornih i autoimunskih bolesti (De La Fuente i Miquel, 2009). Uz prethodne teorije postoji još jedna teorija – teorija

---

oštećenja DNK. U osnovi ove teorije stoje podaci koji ukazuju da oštećenje DNK indukuje odgovor koji može dovesti do reparacije, oštećenja, apoptoze ili starenja ćelije (Hewitt i sar., 2012). Shodno ovoj teoriji, akumulacija oštećenja DNK matičnih ćelija i stromalnih fibroblasta tokom starenja rezultuje pojačanom sintezom proinflamatornih citokina i stvaranjem “začaranog kruga”, u sklopu kojeg proinflamatorni citokini indukuju DNK oštećenje i u ćelijama koje okružuju ćelije u kojima je inicijalno došlo do oštećenja DNK, čime se ostvaruje propagacija inflamatornog oštećenja, što dovodi do inflamatornog starenja (Bonafè i sar., 2012). Konačno, postoji mišljenje da bi starenjem uslovljen poremećaj autofagije mogao da dovede do stvaranja reaktivnih oblika kiseonika, koji bi aktivacijom receptora za pirinski domen 3 familije receptora za domene slične oligomerizovanim vezanim nukleotidima (*engl.* nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3), mogli da stimulišu stvaranje IL-1 $\beta$  i IL-18, te ubrzano starenje (Salminen i sar., 2012). Ova hronična inflamacija niskog stepena koja se javlja tokom starenja predstavlja značajan faktor rizika za povećan morbiditet i mortalitet starih osoba za kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa 2, sarkopeniju, tumore, Parkinsonovu bolest, Alchajmerovu bolest i dr. (Skoog i sar., 2002; Giunta i sar., 2008; Grivennikov i sar., 2010; Cevenini i sar., 2013; Franceschi i Campisi, 2014; Calabrese i sar., 2018). Smatra se da povećano oslobađanje proinflamatornih citokina kod starih stvara okruženje koje je pogodno za pojavu autoimunskih fenomena (Grolleau-Julius i sar., 2010), tako da se starenje može posmatrati kao autoimunski, autoinflamatorni fenomen (Franceschi i sar., 2017). Za ovu niskogradnu inflamaciju kod starih jedinki veruje se da su odgovorni uglavnom endogeni molekuli, izmenjeni delovanjem stresora ili starenjem ćelije, tzv. molekularni obrasci oštećenih ćelija (*engl.* damage-associated molecular patterns, DAMPs), alarmini. Starenjem se povećava njihovo stvaranje, a smanjuje uklanjanje (Franceschi i sar., 2017). Ove molekule prepoznaju receptori ćelija urođenog imunskog sistema indukujući inflamatorni odgovor (Lin i sar., 2009; Anderson i sar., 2013).

S druge strane, ova niskogradna hronična inflamacija kod starih bi mogla da dovede i do porasta koncentracije kortizola u krvi (Giunta, 2008). Zapravo, neuroni hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežne osovine ispoljavaju brojne receptore za brojne citokine, uključujući i IL-1, IL-6 i TNF (Turnbull i Rivier, 1999), te bi porast koncentracije ovih citokina u moždanom tkivu kod starih uticao i na porast sekretorne

---

aktivnosti hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežne osovine, te posledično i do povećanog oslobađanja kortizola iz kore nadbubrega, koji deluje imunoregulatorno i sprečava preteranu reakciju imunskog sistema, koja bi mogla dovesti do tkivnog oštećenja (Giunta, 2008). Tome u prilog ide činjenica da visokosrodni sojevi pacova koji su rezistentni na indukciju EAE-a (PVG, F344 and BN) imaju više nivoe steroidnih hormona, uključujući i kortikosteron, u cirkulaciji (Günther i sar., 1978; Villas i sar., 1978). Pored toga, pokazano je i da “inflamatorno” starenje kod ljudi i miševa indukuje promene u imunskim ćelijama, koje doprinose nishodnoj regulaciji imunskog odgovora na antigene (Frasca i Blomberg, 2015).

#### 1.1.5. Uticaj starenja na neuroinflamaciju

Postoje brojni klinički i eksperimentalni dokazi da starenjem dolazi do razvoja niskogradne inflamacije u moždanom tkivu (Norden i Godbout, 2013). Saglasno ovome, u nervnom tkivu ljudi i glodara, uključujući DA pacove, starenjem se povećava koncentracija proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$  i/ili IL-6 (Henry i sar., 2009; Fenn i sar., 2013; Norden i sar., 2015), a smanjuje koncentracija antiinflamatornih citokina IL-10 i IL-4 (Ye i Johnson, 2001; Maher i sar., 2005; Nacka-Aleksić i sar., 2017). Razvoj neuroinflamacije niskog intenziteta koja se uočava u starenju se povezuje sa oštećenjem krvno-moždane barijere usled hroničnog izlaganja delovanju proinflamatornih citokina, što dovodi do povećanog ulaska proinflamatornih citokina i imunskih ćelija u moždano tkivo (Di Benedetto i sar., 2017). Ovo posledično dovodi do aktivacije rezidentnih ćelija, pre svega ćelija mikroglije, i tako doprinosi razvoju inflamacije (Di Benedetto i sar., 2017; Wolfe i sar., 2018). Uočeno je da mikroglija tokom starenja povećava ekspresiju inflamatornih medijatora nakon stimulacije, odnosno da pokazuje “preterani” inflamatorni odgovor (Norden i sar., 2015). Ovakvim promenama mikroglije u starenju najverovatnije doprinosi i pojačan intenzitet oštećenja izazvanih delovanjem slobodnih radikala (Gemma i sar., 2007), kao i promene na nivou regulacije gena za insulinu sličan faktor rasta 1 i hemokina (CX3C-motiv) ligand 1 (CX3CL1), negativnih modulatora aktivacije mikroglije, od strane mikroRNK (Fenn i sar., 2013). Osim toga, za razvoj neuroinflamacije kod starih bi mogle da budu značajne i promene u inflamazomima neurona (Mawhinney i sar., 2011; Fenn i sar., 2015). U prilog poslednjem govorila bi povećana ekspresija NLRP3 u hipokampusu starih miševa u

---

odnosu na mlade životinje (Wang i sar., 2018), budući da je kod starih miševa sa delecijom NLRP3, inflamacija u CNS-u bila značajno smanjena u poređenju sa kontrolnim životinjama istog uzrasta (Youm i sar., 2013).

O uticaju genetskih faktora na intenzitet neuroinflamacije kod starih govore podaci o ushodnoj regulaciji potencijalno proinflamatornih gena u prefrontalnom korteksu starenjem kod ljudi, kao što su geni za nuklearni faktor kappa B subjedinicu 1 (*engl.* nuclear factor kappa B subunit 1, NF kB1), faktor 6 povezan sa TNF receptorom (*engl.* TNF receptor associated factor 6, TRAF6), receptor sličan Tollu (*engl.* Toll-like receptor, TLR) 4, IL-1 receptor 1, translokatorni protein (*engl.* translocator protein, TSPO) i glijalni kiseli fibrilarni protein (*engl.* glial fibrillary acidic protein, GFAP). Postoje podaci koji jasno ukazuju da postoje sojne razlike u neuroinflamatornom odgovoru kod mladih miševa (Kigerl i sar., 2006; Nikodemova i Watters, 2011).

Mikroglija starih miševa pokazuje i morfološke promene. Ove promene se ogledaju u smanjenju broja i dužine nastavaka, dok se telo ćelije uvećava sa formiranjem sferoidnih evaginacija. Ovakva mikroglija označava se kao “distrofična mikroglija” (Streit, 2006; Flanary i sar., 2007). Novija istraživanja pokazuju da se starenjem povećava broj mikroglijalnih ćelija specifičnog fenotipa, koje se označavaju kao tzv. “tamna” mikroglija, usled prisutnih znakova izraženog oksidativnog stresa, tj. kondenzovane, guste citoplazme i nukleoplazme i dilatiranog endoplazmatskog retikuluma (Bisht i sar., 2016). Ove morfološke promene se povezuju sa ekstenzivnom fagocitozom sinapsnih elemenata i remodelovanjem neuronske mreže (Bisht i sar., 2016). Smatra se da ova “distrofična” mikroglija gubi svoju neuroprotektivnu funkciju, te može doprineti razvoju neurodegenerativnih bolesti (Spittau, 2017), kao i razvoju neurodegeneracije u autoimunskim bolestima CNS-a (Thompson i Tsirka, 2017). Starenje dovodi do smanjenja ekspresije hemokina CX3CL1, (poznat pod nazivom fraktalkin i neurotakin) (Wynne i sar., 2010; Bachstetter i sar., 2011; Deak i Sonntag, 2012), koji konstitutivno eksprimiraju neuroni, a koji se vezuje za CX3C hemokinski receptor 1 (CX3CR1), koji u CNS-u eksprimira isključivo mikroglija (Harrison i sar., 1998). Interakcija CX3CL1-CX3CR1 je ključna za modulaciju aktivacije mikroglije i sledstveno ograničavanje razvoja autoimunske neuroinflamacije (Cardona i sar., 2006). Smatra se da bi poremećaj ove interakcije, do koga dolazi u starenju, mogao da bude od

---

značaja za razvoj autoimunskih bolesti CNS-a u ovoj uzrasnoj grupi (Lyons i sar., 2009; Fenn i sar., 2013).

Uočeno je da se starenjem menja i fenotip makrofaga koji se mogu izolovati iz tkiva CNS-a, odnosno da se favorizuje diferencijacija makrofaga proinflamatornog M1 fenotipa na račun onih protektivnog M2 fenotipa, što bi takođe moglo da doprinese razvoju neuroinflamacije (Di Benedetto i sar., 2017).

#### 1.1.6. Starenje imunskog sistema i autoimunost

Incidencija autoimunskih fenomena se povećava starenjem (Datta i Sarvetnick, 2009; Tatari-Calderone i sar., 2012). Ovo se povezuje sa smanjenjem apoptoze i homeostatskom proliferacijom T-limfocita kod starih (Nikolich-Žugich, 2017). Povećanje homeostatske proliferacije kod starih životinja se povezuje sa smanjenim stvaranjem T-limfocita u timusu, i posledično izlaskom naivnih T-limfocita iz timusa na periferiju (Goronzy i sar., 2007, Müller i Pawelec, 2015). Važno je istaći da se starenjem favorizuje preživljavanje i homeostatska proliferacija T-limfocita sa visokim aviditetom za sopstvene peptide prikazane u sklopu MHC molekula u odnosu na T-limfocite sa niskim aviditetom (Tatari-Calderone i sar., 2012). Kao posledica procesa ekspanzije, T-limfociti sa visokim aviditetom za sopstvene antigene zadobijaju fenotip aktivisanih/memorijskih T-limfocita i stiču efektorske funkcije (Kieper i Jameson, 1999; Cho i sar., 2000; Goldrath i sar., 2000).

Kod ljudi i miševa detektovana je i subpopulacija B-limfocita koji ekspimiraju CD11b i CD11c, ali ne i CD21 i označeni su kao B-limfociti povezani sa starenjem (*engl.* age-associated B cells, ABCs) (Naradikian i sar., 2015). Ove ćelije čine 30-40% zrelih recirkulišućih B-limfocita kod miševa starih 24-30 meseci (Ratliff i sar., 2013). Deplecija ovih ćelija u animalnim modelima dovela je do smanjenja titra autoreaktivnih antitela (Rubtsov i sar., 2011), što ukazuje na značajnu ulogu ovih ćelija u razvoju autoimunosti. Ne samo da ove ćelije mogu sintetisati autoantitela, već njihova visoka ekspresija MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula implicira da one mogu i prezentovati autoantigene T-limfocitima (Rubtsov i sar., 2011).

Bez obzira na prethodno opisane fenomene koji se javljaju u starenju, incidencija većine autoimunskih bolesti, ne samo da se ne povećava starenjem, već je

---

znatno manja u kasnijem životnom dobu nego u pubertetu i u adultnom uzrastu (Beeson, 1994; Vadasz i sar., 2013; Watad i sar., 2017). Preciznije, izuzetak su bulozni pemfigoid (Kridin i Ludwig, 2018) i gigantocelularni arteritis (Berti i sar., 2015), čija je incidencija veća u kasnom životnom dobu (Beeson, 1994; Watad i sar., 2017), dok incidencija inflamatorne bolesti creva ima dva pika, prvi između 20-40. godine i drugi nakon 60. godine (Watad i sar., 2017). Smanjenje incidencije autoimunskih bolesti kod starih se objašnjava ekspanzijom Treg ćelija na periferiji i starenjem uslovljenim smanjenjem sposobnosti T-limfocita da efikasno odgovore na stimulaciju (auto)antigenima (opisano u sekciji 1.1.2.) (Vadasz i sar., 2013). S druge strane, imajući u vidu činjenicu da se u slučaju primarne bilijarne ciroze, koja se najčešće javlja kod žena starosti 50-65 godina, patogena antimitohondrijalna antitela mogu detektovati pre pojave klinički manifestne bolesti (Mousa i sar., 2016), može se pretpostaviti da se i neke druge autoimunske bolesti počinju razvijati mnogo pre nego što se pojavi klinički manifestna bolest (Watad i sar., 2017).

## **1.2. Uticaj starenja na incidenciju i kliničke karakteristike multiple skleroze**

### **1.2.1. Incidencija i patogeneza multiple skleroze**

Multipla skleroza predstavlja najčešće autoimunske oboljenje CNS-a, koje se karakteriše inflamacijom i demijelinizacijom koje zahvataju različite delove CNS-a (Tullman, 2013). Na osnovu analize 38 studija, 19 iz severne i 12 iz južne Evrope, 5 iz Australije i 2 iz Sjedinjenih Američkih Država ukupna stopa incidencije multiple skleroze je 3,6/100 000 osoba kod žena i 2/100 000 osoba kod muškaraca (Alonso i Hernan, 2008; Watad i sar., 2017), a početak bolesti je najčešće između 20. i 50. godine života (Polliack i sar., 2001; Alonso i Hernan, 2008). Prvi simptomi bolesti retko se javljaju pre 10. i nakon 60. godine života (Ditamo i sar., 2005; Tullman, 2013). Kohortne studije pokazuju da je udeo onih bolesnika kod kojih se bolest razvila nakon 50. godine života 0.45%-1.33% (Leibowitz i sar., 1964; White i sar., 1990; Delalande i sar., 2002; Tremlett i Devonshire, 2008; Bove i sar., 2012).

Smatra se da u multiploj sklerozi dolazi do aktivacije perifernih autoreaktivnih efektorskih CD4+ T-limfocita, koji potom migriraju u CNS i iniciraju oboljenje (hipoteza “spolja ka unutra”) (Baecher-Allan i sar. 2018). Međutim, nasuprot ovoj jeste

---

hipoteza prema kojoj je inicijalni događaj u multiploj sklerozi unutar CNS-a (Dargahi i sar., 2017). Prema prvoj hipotezi periferno aktivisani autoreaktivni T-limfociti prolaze krvno-moždanu barijeru, zajedno sa B-limfocitima i monocitima, i dospevaju u CNS gde dolazi do njihove reaktivacije (Baecher-Allan i sar. 2018). Th1 ćelije oslobađaju IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , a Th17 ćelije sekretuju IL-17, kao i IL-21 i IL-22 (Baecher-Allan i sar. 2018). Kod miševa je pokazano da Th17 ćelije mogu koeksprimirati i IFN- $\gamma$  i faktor koji stimuliše kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i ove ćelije poseduju izrazit patogeni kapacitet (Sheng i sar., 2014; McWilliams i sar., 2015).

Pored CD4<sup>+</sup> T-limfocita, i CD8<sup>+</sup> T-limfociti takođe mogu sekretovati i IL-17 (Srenathan i sar., 2016). Svojim citotoksičnim dejstvom CD8<sup>+</sup> T-limfociti mogu dovesti i do direktnog oštećenja aksona neurona (Sobottka i sar., 2009). Ovo oštećenje, može dovesti do poremećaja u prenošenju nervnih impulsa, što, u zavisnosti od lokalizacije i zastupljenosti, ima za posledicu pojavu različitih neuroloških simptoma i znakova (Lubetzki i Stankoff, 2014).

U CNS-u, kao i na periferiji, efektorski T-limfociti mogu biti izloženi uticaju različitih subsetova regulatornih ćelija CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> Treg (Baecher-Allan i sar. 2018), regulatornih Th ćelija tipa 1 (Tr1), koje predstavljaju Treg ćelije indukovane na periferiji hroničnom aktivacijom CD4<sup>+</sup> T-limfocita antigenom u prisustvu IL-10 i pokazuju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 (*engl.* forkhead box P3, Foxp3)- fenotip (Zeng i sar., 2015), regulatornih B-ćelija, a regulatorna svojstva mogu imati i NK ćelije (Baecher-Allan i sar. 2018). Važno je napomenuti da postoje podaci koji ukazuju da makar neki od ovih subsetova pokazuju sojne razlike u regulatornom kapacitetu, što se povezuje sa sojnim razlikama u osetljivosti pacova na indukciju EAE-a (Sun i sar., 1999).

Istraživanja ukazuju i na mogućnost da se primarni proces koji inicira razvoj multiple skleroze odvija u CNS-u. Inicijalni događaj može biti intrinzični poremećaj oligodendrocita, koji dovodi do oligodendrocitne distrofije i posledičnog inflamatornog procesa (Lucchinetti i sar., 2000; Dargahi i sar., 2017). Ovo dovodi do aktivacije rezidentnih imunskih ćelija u CNS-u, verovatno mikroglijalnih ćelija, koje ushodno regulišu MHC molekule klase I i II, kao i kostimulatorne molekule, sintetišu citokine i hemokine, te omogućuju ulazak T-limfocita, B-limfocita, makrofaga i dendritskih ćelija



---

u CNS (Hemmer i sar., 2006). Ove ćelije oslobađaju citokine, reaktivne oblike kiseonika i azota, matriksne metaloproteinaze, što dovodi do oštećenja mijelina, razvoja inflamatornog procesa i destrukcije nervnog tkiva (Koriem, 2016; Dargahi i sar., 2017).

### 1.2.2. Uticaj starenja na kliničke karakteristike multiple skleroze

Istraživanja pokazuju da vreme početka bolesti predstavlja značajan faktor koji određuje klinički tok multiple skleroze (Musella i sar., 2018). Kod bolesnika sa kasnim početkom multiple skleroze (KPMS), tj. početkom nakon 50. godine života, klinički tok je najčešće primarno progresivni, dok je kod bolesnika sa početkom bolesti pre 40. godine najčešće relapsno-remitentan sa mogućim kasnijim razvojem sekundarno progresivnog oblika (Hooge i Redekop, 1992; Noseworthy, 1993; Kis i sar., 2008). Ukoliko je kod bolesnika sa KPMS prisutan relapsno-remitentan oblik bolesti, kod njih najčešće brže dolazi do razvoja sekundarno progresivnog oblika u odnosu na bolesnike sa ranijim početkom bolesti (Martinelli i sar., 2004).

Najčešći inicijalni simptomi kod bolesnika sa KPMS jesu motorne smetnje donjih ekstremiteta (Polliack i sar., 2001; Delalande i sar., 2002; Paty i sar., 2003). Simptomima u čijoj osnovi su motorna ili cerebelarna oštećenja pridružuju se tokom vremena i senzorni poremećaji, kao i disfunkcija sfinktera, dok su vizuelne smetnje retke kod ovih bolesnika (Martinelli i sar., 2004).

Patohistološki nalazi ukazuju da se bolest kod bolesnika sa KPMS značajno razlikuje od bolesti kod bolesnika sa njenim ranijim početkom, a karakteriše se izraženijom degenerativnom patologijom i manje izraženim inflamatornim promenama (Paty i sar., 2003; Martinelli i sar., 2004).

## 1.3. Uzrasne i sojne razlike u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu

### 1.3.1. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EAE je najčešće korišćeni eksperimentalni model multiple skleroze (Constantinescu i sar., 2011). Različiti modeli ove bolesti, mimikriraju njene različite patogenetske aspekte - neuroinflamaciju, demijelinizaciju, remijelinizaciju i neurodegeneraciju. Međutim, nijedan model EAE-a ne obuhvaća čitav spektar

---

patogenetskih i kliničkih karakteristika multiple skleroze, stoga se različiti modeli ove bolesti koriste za ispitivanje njenih različitih patogenetskih i kliničkih aspekata (Lassmann i Bradl, 2017). Bolest se najčešće indukuje aktivnom imunizacijom homogenatom kičmene moždine ili peptidima mijelina poput mijelin baznog proteina (MBP), proteolipidnog proteina (PLP), mijelin-asociranog glikoproteina (MAG) ili mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG), uz primenu adjuvanasa, čija je uloga da aktiviraju urođeni imunski odgovor (Constantinescu i sar., 2011; Stromnes i Goverman, 2006a). U zavisnosti od primenjenog antigena, imunizacionog protokola, vrste i soja eksperimentalnih životinja tok bolesti može biti akutni, hronično progresivni ili relapsno-remitentan (Bittner i sar., 2014). Pokazano je da se bolest može indukovati kod veoma osetljivih sojeva pacova i bez korišćenja adjuvansa (Levine i Wenk, 1965; Stosic-Grujicic i sar., 2004). Međutim, najčešće se primenjuje imunizacioni protokol u kome je indukcija bolesti olakšana primenom adjuvansa, najčešće kompletnog Frojndovog adjuvansa (KFA) (Billiau i Matthys, 2001). Osim što KFA produžava vreme oslobađanja antigena sa mesta aplikacije, zahvaljujući mikobakterijskoj komponenti, KFA podstiče Th1 (Lucey i sar., 1996), a posebno Th17 (Tigno-Aranjuez i sar., 2009; Damsker i sar., 2010) odgovor na antigene mijelina. Smatra se da IL-17 ima ključnu ulogu u razvoju EAE-a u modelima u kojima se za indukciju bolesti, kao adjuvans, koristi KFA (Komiyama i sar., 2006; Damsker i sar., 2010). Podaci ukazuju da je diferencijacija Th17 ćelija veoma dinamičan i kompleksan proces, koji zavisi prevashodno od polarizujućih citokina (Kurebayashi i sar., 2013), što ima za posledicu izrazitu plastičnost Th17 limfocita, koja se ogleda u tome da ove ćelije mogu koekspimirati transkripcione faktore ili citokine karakteristične za druge subsetove CD4+ T-limfocita, poput Foxp3 transkripcionog faktora (Zhou i sar., 2008; Bhaumik i Basu, 2017), ili IFN- $\gamma$  (Kaufmann i sar., 2012; Zielinski i sar., 2012; Cosmi i sar., 2014). U mišjim modelima EAE-a, kao i humanoj bolesti, najveća patogenost pokazana je za one Th17 limfocite koji koekspimiraju IFN- $\gamma$  i GM-CSF (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011; Sheng i sar., 2014; McWilliams i sar., 2015; Rasouli i sar., 2015).

Za KFA je takođe pokazano da utiče na povećanje permeabilnosti krvno-moždane barijere (Rabchevsky i sar., 1999), podstiče fagocitoznu/pinocitoznu aktivnost dendritskih ćelija, kao i oslobađanje citokina kao što su: TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 i IFN- $\gamma$  i hemokina poput IL-8 i monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (Billiau i Matthys,

2001). U sklopu nekih protokola za imunizaciju kod miševa, ali i kod pacova, uključujući DA pacove, posebno kada je potrebno dobiti robustan i reproducibilan model, koristi se i dodatni tretman davanjem inaktivisane *Bordetella pertussis* ili njenog toksina (Miyakoshi i sar., 2003; Constantinescu i Hilliard, 2005). *Bordetella pertussis* ili njen toksin utiču na povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere, te posledično i na ulazak ćelija u CNS (Brückener i sar., 2003, Sakuma i sar., 2004), aktiviraju antigenprezentujuće ćelije u limfnim organima i u CNS-u, te olakšavaju aktivaciju autoreaktivnih T ćelija, odnosno njihovu reaktivaciju u ciljnom organu (Hofstetter i sar., 2002). Treba napomenuti da noviji podaci ukazuju da *Bordetella pertussis* ili njen toksin doprinose razvoju multiple skleroze kod ljudi (Rubin i Glazer, 2016). Naime, imajući u vidu podatke koji pokazuju subkliničku nazofaringealnu kolonizaciju ovom bakterijom u populacijama vakcinisanih protiv velikog kašlja (Zhang i sar., 2014) i ulogu *Bordetella pertussis* u razvoju EAE-a (Brückener i sar., 2003, Sakuma i sar., 2004), pretpostavlja se da je kolonizacija ovom bakterijom značajan faktor u razvoju multiple skleroze (Rubin i Glazer, 2016). EAE se može indukovati i pasivno, adoptivnim transferom preaktivisanih encefalitogenih CD4+ T-limfocita u naivne recipijente (Stromnes i Goverman, 2006b). Prednosti ovakvog modela nad aktivno indukovanim EAE-om jesu mogućnost obeležavanja T-limfocita pre transfera, te se njihova lokacija i aktivnost mogu pratiti, kao i mogućnost *in vitro* manipulacije efektorskom funkcijom T-limfocita pre transfera, što omogućuje istraživačima ispitivanje značaja koje određene funkcije ovih ćelija imaju za patogenezu bolesti (Stromnes i Goverman, 2006b). Adoptivnim transferom se direktno indukuje efektorska faza EAE-a, a značajni nedostatak ovakvog modela je odsustvo rasprostranjene primarne fokalne demijelinizacije, bez obzira na korišćenu vrstu i soj eksperimentalnih životinja (Lassmann i Bradl, 2017). S obzirom na načine indukcije, oba modela, aktivni i pasivni EAE, nisu pogodni za ispitivanje „okidača“ autoimunskog procesa usmerenog na CNS. Uspostavljen je model u kome eksperimentalne životinje spontano razvijaju bolest. Ovo je postignuto korišćenjem transgenih životinja, čiji T-limfociti eksprimiraju TCR, koji prepoznaje mijelinske antigene (Bettelli i sar., 2003).

U istraživanjima opisanim u ovoj tezi korišćen je aktivni model EAE-a. Imunizacija je izvršena ubrizgavanjem homogenata kičmene moždine singenih životinja emulgovanom u KFA i dodatno ubrizgavanjem suspenzije inaktivisane *Bordetella*

---

*pertussis*. Pokazano je da u ovom modelu EAE prolazi kroz dve faze: induktivnu i efektorsku. U induktivnoj fazi dolazi do aktivacije i diferencijacije encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućem limfnom čvoru (Miller i sar., 2007). Diferencijaciju encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u efektorske ćelije u drenirajućem limfnom čvoru mogu pomoći CD8<sup>+</sup> T-limfociti putem oslobađanja IFN- $\gamma$  i IL-17, što je opisano terminom “reverzna pomoć“ (*engl.* reverse help) (Camara i sar., 2013; Huber i sar., 2015). Smatra se da je ovaj mehanizam posebno značajan u onim modelima EAE-a koje karakteriše relativno blaga klinička slika bolesti (Camara et al., 2013). S druge strane, na aktivaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita uticaj mogu ostvarivati Treg ćelije utičući na interakciju T limfocita i dendritskih ćelija (Rossi i Constantin, 2016). Supresorno delovanje Treg mogu ostvariti i delujući na proliferativni odgovor CD4<sup>+</sup> T-limfocita na antigensku stimulaciju (Takahashi i sar., 1998; Sojka i sar., 2008).

Neuroantigen specifični CD4<sup>+</sup> T-limfociti aktivisani u drenirajućim limfnim čvorovima migriraju u CNS prolazeći kroz slezinu (Constantinescu i sar., 2011). Na tom putu može doći do njihovog zadržavanja u slezini (Flügel i sar., 2001; Staykova i sar., 2002; Yang i sar., 2002; Tischner i sar., 2006). Na zadržavanje neuroantigen specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini može uticati ekspresija glikoproteina CD44, preciznije njegove izoforme CD44s (Yang i sar., 2002), kao i zastupljenost Treg u slezini (Tischner i sar., 2006). Pokazano je da Treg utiču na zadržavanje aktivisanih neuroantigen specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini i tako ograničavaju infiltraciju CNS-a ovim ćelijama (Tischner i sar., 2006).

Efektorska faza obuhvata migraciju aktivisanih neuroantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u CNS, influks proinlamatornih monocita u CNS, aktivaciju perifernih monocita i rezidentnih makrofaga, kao i mikroglialnih ćelija citokinima koje oslobađaju Th ćelije i nastanak oštećenja tkiva delovanjem medijatora koje oslobađuju Th ćelije i proinlamatorni monociti/makrofagi (Miller i sar., 2007; Croxford i sar., 2015a). Tokom efektorske faze EAE-a, GM-CSF koji sekretuju Th ćelije ima ključnu ulogu u održavanju neuroinlamatornog procesa delujući na mijeloidne ćelije koje infiltriraju CNS (Croxford i sar., 2015b). Utvrđeno je i da bi selektivni gubitak ekspresije GM-CSF od strane autoreaktivnih Th ćelija, pre svega, imao posledice za njihovu patogenost tokom efektorske faze EAE-a (Codarri i sar., 2011). Ispitivanja na mišjem modelu EAE-a pokazala su da je uloga GM-CSF kritična za razvoj EAE-a, bez

---

obzira na genetsku osnovu miševa (Codarri i sar., 2011). U lezijama CNS-a pacijenata sa multiplom sklerozom detektovani su CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfociti koji sintetišu GM-CSF, a veliki broj ovih ćelija istovremeno je ekspimirao i IFN- $\gamma$  i IL-17 (Rasouli i sar., 2015). Utvrđeno je da IFN- $\beta$  suprimira sintezu GM-CSF od strane T-limfocita *in vitro*, a i značajno veći broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita koji sintetišu GM-CSF utvrđen je u perifernoj krvi pacijenata sa multiplom sklerozom koji nisu bili na terapiji IFN- $\beta$ , u odnosu na one koji su bili na ovakvoj terapiji ili u odnosu na zdrave kontrole, što ukazuje na značaj GM-CSF u patogenezi multiple skleroze (Rasouli i sar., 2015). Ispitivanja ukazuju na neophodnost GM-CSF u aktivaciji mikroglije u EAE-u (Ponomarev i sar., 2007). U razvoju EAE-a mikroglija može imati značajnu ulogu u oštećanju tkiva CNS-a, pre svega oslobađanjem većih količina proinflammatoryh citokina i neurotoksičnih medijatora tokom akutne faze bolesti (Chu i sar., 2018). Važno je istaći da je pokazano da mikroglija može doprineti i ograničavanju autoimunske neuroinflamacije i tkivnog oštećenja (Goldmann i Prinz, 2013). Kontrola aktivacije mikroglije i njenog neurotoksičnog delovanja ostvaruje se posredstvom interakcije između CX3CL1 hemokina i njegovog receptora (Cardona i sar., 2006). Vezivanje CX3CL1 za receptor na ćelijama mikroglije dovodi do nishodne regulacije ekspresije proinflammatoryh citokina, pre svega IL-1 $\beta$  (Bhaskar i sar., 2010), ushodnom regulacijom anti-inflammatoryh/immunoregulatoryh citokina, kao što su IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 i faktora transformacije rasta- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) (Tang i Le, 2016). Sve ovo, uz pojačanu fagocitnu aktivnost (Huang i sar., 2016), doprinosi supresiji razvoja EAE-a (Jiang i sar., 2012) i pomaže u tkivnoj reparaciji (Laria i sar., 2016).

### 1.3.2. Uticaj starenja i soja na incidenciju i klinički tok EAE-a

Relativno oskudni literaturni podaci ukazuju da starenje ima uticaja kako na incidenciju EAE-a, tako i na klinički tok bolesti (Ludowyk i sar., 1993; Ditamo i sar., 2005; Tatari-Calderone i sar., 2012; Peferoen i sar., 2016). Međutim, važno je napomenuti da postojeći podaci nisu konzistentni. U literaturi se nalaze podaci koji pokazuju da se kod Wistar pacova starenjem smanjuje incidencija aktivno indukovanog EAE-a, tako da je ona kod ovih pacova starosti 15 meseci iznosila 14,6%, a kod mladih pacova starosti 7 nedelja 78,3% (Ditamo i sar., 2005). Pokazano je da starenje utiče na

---

smanjenje osetljivosti na indukciju EAE-a kod BALB/c i SJL miševa (Endoh i Tabira, 1990). S druge strane, starenje nije imalo uticaja na osetljivost na indukciju EAE-a kod rezistentnih pacova Brown-Norway soja (Källén i Nilsson, 1989). U odnosu na mlade Wistar pacove, kod starih Wistar pacova induktivna faza EAE-a je bila značajno dužeg trajanja, a ovo je koreliralo sa slabijom indukcijom Th1 odgovora na imunizaciju (Ditamo i sar., 2005). Starenje je uticalo i na kliničku sliku EAE-a kod Lewis pacova (Ben-Nun i sar., 1980; Ludowyk i sar., 1993). Aktivna indukcija EAE-a kod mladih Lewis pacova u najvećem broju slučajeva dovodi do razvoja bolesti akutno-monofaznog oblika sa spontanom oporavkom i najčešće bez demijelinizacije ili sa oštećenjem mijelina slabog intenziteta, dok starenje utiče na razvoj hroničnog ili relapsno-remitentnog oblika bolesti (Ben-Nun i sar., 1980; Ludowyk i sar., 1993). Matejuk i njegovi saradnici (2005) uočili su da je starenje kod miševa C57BL/6 soja uticalo na razvoj EAE-a teže kliničke slike, dok je tok bolesti bio hroničan, bez remisija, za razliku od mladih miševa kod kojih je tok bolesti bio akutan sa nepotpunom remisijom. S druge strane, Tatari-Calderone i sar. (2012) uočili su da starenje kod istog soja miševa dovodi do razvoja blaže kliničke slike EAE-a. Kod Biozzi ABH miševa, kod kojih aktivna indukcija bolesti najčešće dovodi primarno do relapsno-remitentne bolesti, koja sekundarno dobija progresivni tok, starenje je uticalo na razvoj primarno progresivnog EAE-a (Peferoen i sar., 2016).

Nekonzistentnost podataka vezanih za uticaj starenja na osetljivost na indukciju EAE-a, kao i na klinički tok, može se povezati sa podacima koji pokazuju da su u različitim studijama korišćene različite vrste i sojevi životinja, da su životinje bile različite hronološke (a verovatno i biološke) starosti i različitog pola, da su korišćeni različiti protokoli za imunizaciju u smislu vrste i sadržaja antigena, i adjuvansa, administracije *Bordetella pertussis* (Ben-Nun i sar., 1980; Källén i Nilsson, 1989; Endoh i sar., 1990; Di Rosa i sar., 2000; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005; Teuscher i sar., 2006; Constantinescu i sar., 2011; Tatari-Calderone i sar., 2012).

#### **1.4. Sojne razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a**

Sojne razlike u osetljivosti mladih životinja na indukciju EAE-a pokazne su kod pacova i miševa i ukazano je na neke od razlika u mehanizmima razvoja bolesti koji bi mogli biti odgovorni za ove razlike (Becker, 2016). Pokazano je da su sojne razlike u

---

osetljivosti mladih DA i AO pacova izrazito robusne, pa je istraživački interes u ovoj disertaciji fokusiran na ćelijske i molekularne mehanizme razvoja EAE-a kod pacova ova dva soja. Mladi pacovi DA soja su izrazito osetljivi na indukciju EAE-a, te se kod njih bolest može indukovati i bez primene adjuvansa (Stosic-Grujicic i sar., 2004). Takođe, pokušaj da se izazove imunološka tolerancija imunizacijom MBP-om 63-81 emulgovanom u nekomplentnom Frojndovom adjuvanasu, odnosno imunizacijom koja kod većine glodara dovodi do razvoja tolerancije na razvoj EAE-a (Alvord i sar., 1965; Bernard, 1977; Lenz i sar., 1999), imao je kod DA pacova, neočekivano, za rezultat razvoj EAE-a (Lenz i sar., 1999), što ide u prilog izrazitoj osetljivosti ovog soja za razvoj EAE-a. Za razliku od DA pacova, AO pacovi su relativno rezistentni na indukciju EAE-a (Mostarica-Stojkovic i sar., 1982a). Pokazano je da se rezistencija na EAE kod AO pacova može delimično nadvladati prethodnim tretmanom niskom dozom rendgenskog zračenja ili ciklofosfamidom, i sugerisano da u osnovi njihove rezistencije na razvoj EAE-a nakon imunizacije MBP-om emulgovanom u KFA jeste aktivnost supresornih mehanizama, a ne nemogućnost da se indukuju efektorski T-limfociti (Mostarica-Stojkovic i sar., 1982b).

Kada su u pitanju mehanizmi koji obezbeđuju izrazitu osetljivost DA soja na indukciju EAE-a, istraživanja su pokazala značajno manju ekspresiju iRNK za IFN- $\gamma$  i IL-17, kao i sintezu ovih citokina od strane mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz AO pacova u poređenju sa istim ćelijama DA pacova u induktivnoj fazi bolesti (Miljkovic i sar., 2006). U induktivnoj fazi EAE-a mononuklearne ćelije drenirajućih limfnih čvorova DA pacova pokazale su i veću sintezu IL-12, kao i veću ekspresiju iRNK za subjedinice ovog citokina p35 i p40 u odnosu na mononuklearne ćelije drenirajućih limfnih čvorova AO pacova (Markovic i sar., 2009). U istoj fazi bolesti, u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova DA pacova utvrđena je i veća ekspresija iRNK za p19, jedinstvenu subjedinicu IL-23, citokina neophodnog za preživljavanje, ekspanziju, i funkciju Th17 ćelija (McGeachy i Cua, 2008), nego u ovim ćelijama AO pacova (Markovic i sar., 2009). Ekspresija iRNK za IL-6 u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova AO pacova, za razliku od DA pacova, nije bila detektabilna (Markovic i sar., 2009).

Iz kičmene moždine DA pacova izolovan je veći broj mononuklearnih ćelija nego iz kičmene moždine AO pacova i detektovan veći broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita, kao i

---

CD11b+ ćelija kod DA nego kod AO pacova. Ekspresija iRNK za IL-17 i IFN- $\gamma$  je bila veća u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA nego AO pacova (Miljković i sar., 2011). U tkivu kičmene moždine AO pacova utvrđena je i značajno veća ekspresija CXC- (motiv sadrži dva cisteinska ostatka razdvojena jednom aminokiselinom različitom od cisteina, X) hemokin ligand (CXCL)12 (Miljković i sar., 2011), hemokina koji sprečava prelazak infiltrišućih ćelija iz perivaskularnog prostora u parenhim CNS-a (McCandless i sar., 2006), nego kod DA pacova.

Iako prethodno pomenuta istraživanja ukazuju na neke od ćelijskih i molekularnih mehanizama koji bi mogli da objasne razlike u osetljivosti mladih adultnih DA i AO pacova na indukciju EAE-a ovaj fenomen još uvek nije potpuno razjašnjen, te zahteva dalja istraživanja. U literaturi nema podataka o uporednoj analizi uticaja starenja na patogenezu EAE-a kod DA i AO pacova, iako bi se to moglo očekivati imajući u vidu prethodno iznete podatke koji pokazuju da starenje deluje na sojno specifičan način na makar neke od tipova imunskih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE-a (Bufan i sar., 2015; Dimitrijević i sar. 2014). Osim toga, uprkos činjenici da se starenjem, zavisno od vrste, i posebno važna soja, osetljivost na indukciju EAE-a, menja različito (u suprotnom smeru) (Endoh i sar., 1990; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005), pažljivom analizom dostupne literature nije bilo moguće naći podatke koji bi ukazivali da su ispitivane sojne razlike u uticaju starenja na ćelijske i molekularne mehanizme razvoja EAE-a. Na osnovu ovih saznanja i podataka vezanih za sojne razlike u ćelijskim i molekularnim mehanizmima razvoja EAE-a kod mladih eksperimentalnih životinja DA i AO soja, postavljeni su centralna hipoteza i ciljevi istraživanja.



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Centralna hipoteza je da starenje, delujući na sojno specifičan način, utiče na osetljivost pacova na indukciju EAE-a i kliničku sliku indukovane bolesti.

U skladu sa postavljenom hipotezom, centralni cilj istraživanja je bio da se:

- 1) ispita uticaj starenja na osetljivost pacova DA i AO soja na indukciju klinički manifestnog EAE-a imunizacijom emulzijom homogenata kičmene moždine pacova i KFA uz ko-administraciju inaktivisanih bakterija (*Bordetella pertussis*) i kliničke karakteristike bolesti i
- 2) definišu ćelijski i molekularni mehanizmi, koji bi mogli da budu odgovorni za pretpostavljene sojno zavisne starenjem uzrokovane promene u indukciji i kliničkom ispoljavanju ove bolesti.

Da bi se ostvario centralni cilj definisana su tri potcilja:

1. Da se istraži uticaj genetskih faktora (sojnih razlika) na ćelijske i molekularne mehanizme koji bi mogli da dovedu do razvoja primarnog CD4+ T-ćelijskog odgovora različitog intenziteta i kvaliteta (imajući u vidu efikasnost diferencijacije Th0 u visoko patogene Th17 limfocite koji pored IL-17 produkuju i IFN- $\gamma$  i GM-CSF) u drenirajućim limfnim čvorovima;
2. Da se ispita uticaj genetskih faktora (sojnih razlika) na zadržavanje aktivisanih, u drenirajućem limfnom čvoru, CD4+ T-limfocita specifičnih za neuroantigene u slezini na putu do CNS-a (kičmene moždine) i
3. Da se utvrdi uticaj genetskih faktora (sojnih razlika) na preživljavanje, reaktivaciju CD4+ T-limfocita specifičnih za neuroantigene u kičmenoj moždini i njihovu diferencijaciju u visoko patogene Th17 limfocite, koji pored IL-17 produkuju i IFN- $\gamma$  i GM-CSF, i ćelijske i molekularne mehanizme koji stoje u osnovi ovih procesa.

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

#### **3.1. Eksperimentalne životinje**

Za eksperimentalni rad u istraživanju u okviru ove studije korišćene su ženke pacova DA i AO visokosrodnih sojeva, uzrasta 3-4 meseca (mladi odrasli pacovi) i 24-26 meseci (stari pacovi), odgajane u štali Centra za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od  $21 \pm 2$  °C, relativna vlažnost vazduha 50-60%, svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak, sa 3-4 životinje u kavezu i bez ograničenja pristupa hrani i vodi).

Svi eksperimenti u okviru ove studije izvedeni su u skladu sa principima koje propisuje direktiva Evropske komisije 2010/63/EU i u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i odobrenjem Uprave za veterinu (Ministarstvo za poljoprivredu i zaštitu životne sredine) broj 323-07-01577/2016-05/14. U skladu sa 3R principom, činjeni su naponi da se broj životinja smanji na minimalno neophodan za dobijanje relevantnih rezultata i da se patnja životinja smanji na najmanju moguću meru.

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

U okviru ove studije je sproveden „pilot“ eksperiment u kome su imunizovane mlade i stare ženke DA (9 mladih i 11 starih) i AO (13 mladih i 13 starih) pacova i svakodnevno je praćena klinička slika od 7. do 60. dana posle imunizacije (d.p.i.), kako bi se sagledao uticaj genetskih faktora i starenja na klinički tok bolesti.

Nakon „pilot“ eksperimenata, sprovedeni su eksperimenti u kojima su životinje žrtvovane u induktivnoj fazi EAE-a 7. d.p.i., odnosno u efektorskoj fazi na vrhuncu bolesti, koji je kod DA pacova (shodno „pilot“ eksperimentu) bio 13. d.p.i., a kod AO pacova 16. d.p.i. Za procenu starenjem uslovljenih promena u efektima inokulacije homogenata kičmene moždine korišćene su zdrave životinja oba soja i uzrasta.

Životinje anestetizirane intraperitonealnom injekcijom 800  $\mu$ l/100g telesne mase rastvora za anesteziju (katamin, 100 mg/ml; Ketamidol, Richter Pharma AG, Wels,

Austria; ksilazin, 20 mg/ml; Xylased, Bioveta, Ivanovice na Hané, Češka Republika i fiziološki rastvor, u odnosu 1:0,5:8,5), su žrtvovane intrakardijalnom perfuzijom fosfatnim puferom (pH 7,3), u čiji sastav ulaze:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10 mmol/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,8 mmol/L), NaCl (137 mmol/L) i KCl (2,7 mmol/L), a koji je obezbeđen iz Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" u Beogradu. Pošto su životinje perfundovane, pažljivo su vađene slezine i kičmene moždine 13. d.p.i. kod DA pacova, odnosno 16. d.p.i. kod AO pacova, ili drenirajući zatkoleni limfni čvorovi 7.d.p.i.

Tkivo kičmene moždine korišćeno je za histopatološku analizu prisustva perivaskularnih infiltrata. Mononuklerne ćelije izolovane iz kičmene moždine su podvrgavane imunofenotipizaciji u cilju detekcije: zastupljenosti  $\text{CD4}^+$  T-limfocita, procenta aktivisanih i apoptotičnih ćelija u subpopulaciji  $\text{CD4}^+$  T-limfocita, zastupljenosti  $\text{CD8}^+$  T-limfocita, proliferacije *ex vivo* efektorskih  $\text{CD8}^+$  T-limfocita, zastupljenosti  $\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  ćelija u okviru  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  T-limfocita, zastupljenosti NK ćelija i u okviru njih procenta  $\text{CX3CR1}^+$  i granzim B<sup>+</sup> ćelija, zastupljenosti  $\text{CD11b}^+$  ćelija različitog nivoa aktivacije, zastupljenosti ćelija mikroglije i u okviru njih procenta  $\text{CX3CR1}^+$  ćelija i onih koje sintetišu IL-1 $\beta$ , korišćenjem metode protočne citofluorometrije. Osim toga, u ovim ćelijama je analizirana ekspresija iRNK za inflamatorne i anti-inflamatorne/imunoregulatorne citokine, enzim hem-oksigenazu (HO)-1 primenom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl.* quantitative real-time polimerase chain reaction, RT-qPCR). Mononuklerne ćelije izolovane iz kičmene moždine su podvrgavane i restimulaciji forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) i jonomicinom ili MBP-om radi ispitivanja sinteze IFN- $\gamma$  i IL-17 i granzima B metodom protočne citofluorometrije i sekrecije IFN- $\gamma$  i IL-17 metodom enzimске imunoadsorpcije (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Analizirana je i fagocitna i endocitozna sposobnost ćelija mikroglije koje su se nalazile u suspenziji mononuklearnih ćelija kičmene moždine.

U mononuklearnim ćelijama izolovanim iz slezine ispitana je metodom protočne citofluorometrije: zastupljenost  $\text{CD4}^+$  T-splenocita i ekspresija aktivacionih markera na ovim ćelijama kod svih eksperimentalnih grupa, kao i procentualna zastupljenost  $\text{CD44}^+$  ćelija u okviru  $\text{CD4}^+$  T-splenocita kod DA pacova, a metodom qRT-PCR ekspresija iRNK za CD44 u  $\text{CD4}^+$  T-splenocitima DA pacova.

Mononuklearne ćelije izolovane iz drenirajućih limfnih čvorova bile su podvrgnute imunofenotipizaciji radi utvrđivanja zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T-limfocita, kao i procenata aktivisanih ćelija i CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ispitivana je proliferacija CD4<sup>+</sup> limfocita u kulturi mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova, u bazalnim uslovima (u odsustvu poznatog stimulatora), kao i u odgovoru na stimulaciju mitogenom - konkanavalinom A (ConA) i neuroantigenom-MBP-om. U suspenziji mononuklearnih ćelija sveže izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova ispitivana je i zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita i terminalno diferenciranih/efektorskih CD8<sup>+</sup> T-limfocita, proliferacija konvencionalnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita, a u kulturama ovih ćelija proliferacija CD8<sup>+</sup> limfocita, u odsustvu ili sa prisutnim MBP-om ili ConA. U sveže izolovanim ćelijama je analizirana i ekspresija iRNK za inflamatorne/imunoregulatorne citokine. Ove ćelije su i restimulisane PMA i jonomicinom ili MBP-om radi ispitivanja sinteze INF- $\gamma$  i IL-17 metodom protočne citofluorometrije i njihove sekrecije ELISA metodom. U sveže izolovanim suspenzijama mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ispitivana je i zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija, kao i procenat MHC II<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> i CD86<sup>+</sup> ćelija u okviru konvencionalnih dendritskih ćelija, metodom protočne citofluorometrije.

### 3.3. Indukcija EAE-a i evaluacija kliničke slike imunizovanih životinja

Indukcija EAE-a izvršena je intradermalnim ubrizgavanjem u plantarnu stranu zadnje leve šapice životinja 100  $\mu$ l emulzije homogenata kičmene moždine singenih životinja u KFA. Emulzija je dobijena homogenizacijom kičmene moždine (1g) u fiziološkom rastvoru (2,5 ml) u homogenizeru na ledu. Pomoću špriceva zapremine 5 ml, spojenih plastičnom spojnicom, homogenat kičmene moždine emulgovan je sa istom zapreminom KFA. Nakon ubrizgavanja ovako dobijenog emulgata kičmene moždine u KFA, u istu šapicu je supkutano, sa dorzalne strane, aplikovano 250  $\mu$ l fiziološkog rastvora u kojem je resuspendovano  $5 \times 10^8$  inaktivisane *Bordetella-pertussis*.

Životinje su svakodnevno pažljivo pregledane, a telesna masa životinja praćena. Evaluacija neurološkog deficita sprovedena je svakodnevno korišćenjem sledeće skale:

0, odsustvo znakova bolesti; 0,5, gubitak tonusa distalnog dela repa; 1, potpuni gubitak tonusa repa; 2, slabost zadnjih ekstremiteta; 3, oduzetost zadnjih ekstremiteta; 4, oduzetost zadnjih i prednjih ekstremiteta (kvadriplegija), praćena inkontinencijom mokraće i stolice, moribundno stanje. Za životinje kod kojih je došlo do razvoja klinički manifestne bolesti hrana je izgnječena i zajedno sa vodom postavljena u niži položaj kako bi bile dostupne životinjama u svakom trenutku.

### 3.4. Histopatološka analiza tkiva kićmene moždine

Po tri životinje sa reprezentativnom kliničkom slikom iz svake eksperimentalne grupe odabrane su za histopatološku analizu. Kod ovih životinja je nakon perfuzije fosfatnim puferom, izvršena i perfuzija 4% paraformaldehidom. Pošto su izvađene, kićmene moždine su podeljene na cervikalni, torakalni i lumbo-sakralni segment i ostavljeni da se preko noći fiksiraju u 4% formaldehidu, a zatim procesuirani za svetlosno-mikroskopsku analizu i ukalupljeni u parafin. Transverzalni preseći tkiva debljine 5 µm dobijeni korišćenjem mikrotoma (Leica RM 2155, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemaćka) deparafinisani su upotrebom ksilola, a zatim hidratisani u seriji alkohola opadajuće koncentracije i potom obojeni hematoksilinom i eozinom. Svaki 50-ti presek kićmene moždine je slikan i analiziran na prisustvo znakova inflamatornog procesa, a prema sledećoj skali: 0, bez prisutnih inflamatornih ćelija; 1, mali broj pojedinaćnih inflamatornih ćelija; 2, organizovani perivaskularni inflamatorni ćelijski infiltrati; 3, ekstenzivni perivaskularni ćelijski infiltrati sa širenjem u okolni subarahnoidalni prostor i parenhim kićmene moždine, (Wraith i sar., 2009). Fotomikrografije su dobijane i analizirane korišćenjem Olympus BH2 mikroskopa (Olympus OpticalCo., Ltd, Tokyo, Japan) opremljenog digitalnom kamerom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Nemaćka) i Analysis FIVE kompjuterskim programom (Olympus Soft Imaging Solutions).

### 3.5. Hemikalije, antitela i imunokonjugati

Da bi se pripremila emulzija za imunizaciju životinja, korišćen je KFA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemaćka) koji je sadržao u 1 ml: 1 mg inaktivisanih *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177), 0,85 ml parafinskog

ulja i 0,15 ml manid monooleata. Takođe, za imunizaciju je korišćena i suspenzija inaktivisanih bakterija *Bordetella pertussis*, dobijena od Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”.

Za histopatološku analizu tkiva kičmene moždine korišćeni su 4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich), ksilol (Zorka Pharmacy, Šabac, Srbija), apsolutni etanol (Alkaloid, Skopje, Makedonija), hematoksilin (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) i eozin (Sigma-Aldrich).

Kako bi se izolovale mononuklearne ćelije iz kičmene moždine korišćen je gustinski gradijent Percoll (Sigma-Aldrich), gustine 1,13 g/ml. Za dobijanje izotoničnog Percoll-a gustine 1,122 g/ml korišćeni su 10 puta koncentrovani fosfatni pufer i komercijalni gustinski gradijent Percoll u odnosu 1:10. Gradijenti gustine 1,085 g/ml (70% Percoll) i gustine 1,048 g/ml (40% Percoll), dobijeni su od izotoničnog gradijenta dodavanjem odgovarajuće količine fosfatnog pufera.

U ovoj studiji korišćena su sledeća monoklonska antitela za obeležavanje membranskih i intracelularnih antigena: fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili fikoeritrinom (PE) konjugovano anti-CD4 (klon OX-38) antitelo; FITC-om/PE-om/alofikocijaninom (APC)/biotinom konjugovano anti-CD8 (klon OX-8) antitelo; peridinin hlorofil proteinom (*engl.* Peridinin chlorophyll protein, PerCP) konjugovano anti-TCR $\alpha\beta$  (klon R73) antitelo; biotinom konjugovana anti-CD134 (klon OX-40), anti-CD45 (klon OX-1) antitela; FITC-om ili biotinom konjugovano anti-CD11b (klon WT.5) antitelo; FITC-om ili PE-om konjugovano anti-CD161a (klon 10/78) antitelo; PE-om konjugovano anti-ED2 (CD163; klon HIS36) antitelo; biotinom konjugovano anti-CD80 (klon 3H5) i anti-CD86 (clone 24F) antitela; FITC-om konjugovana anti-RT1B (MHC II, klon OX-6) i anti-CD44H (klon OX-49) antitela; FITC-om konjugovano anti-IFN- $\gamma$  (klon DB-1) antitelo; PE-om konjugovana anti-IL17A (klon TC11-18H10) i anti-IL-10 (klon A5-4) antitela. Gore navedena monoklonska antitela nabavljena su od BD Biosciences Pharmingen (Mountain View, CA, SAD). Takođe, sekundarna antitela: PerCP-om i PE-om konjugovan streptavidin, PE-om konjugovan magarac anti-zec F(ab')<sub>2</sub> IgG, kao i izotipske IgG kontrole su nabavljeni od BD Biosciences Pharmingen. Korišćena su i sledeća antitela: FITC-om konjugovana anti-IL-17A (klon eBio17B7) i anti-Foxp3 (klon FJK-16s) antitela, tandem konjugatom

---

PerCP-eFluor710 konjugovano anti-CD25 (klon OX-39) antitelo, koja su nabavljena od eBioscience (San Diego, CA, SAD), a od Serotec (Oxford, UK) nabavljeno je FITC-om konjugovano anti-CD11b (klon ED8) antitelo, PE-om konjugovana anti CD45 (klon OX-1) i anti- $\alpha$ E2 podjedinica integrina (anti-OX62 antitelo; klon OX62) antitela. Od BioLegend (San Diego, CA, SAD) nabavljena su Alexa Fluor 647-konjugovano anti-TCR $\alpha\beta$  (klon R73) antitelo i FITC-om konjugovano anti-granzim B (klon GB11) antitelo. Korišćena su i APC-om konjugovano anti-CXCR3 antitelo (klon 868013, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, SAD) i Alexa Fluor 647-konjugovano anti-GM-CSF (klon 83308, Novus Biologicals, Littleton, CO, SAD) antitelo.

Korišćena su i poliklonska antitela tj. nekonjugovano kunić anti-CX3CR1 antitelo i biotinom konjugovano zec anti-IL-1 $\beta$  antitelo, koja su nabavljena od Abcam (Cambridge, UK). Za određivanje procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita, izolovanih iz kičmene moždine pacova, korišćen je FITC-om konjugovan protein aneksin V (*engl.* annexin V) nabavljen od BD Biosciences Pharmingen.

Tokom postupka obeležavanja antigena upotrebljavan je fosfatni pufer, kome su dodati 2% fetalni teleći serum (*engl.* fetal calf serum, FCS) (Gibco, Grand Island, NY, SAD) i 0.09% natrijum-azid (NaN<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich).

Za ispitivanje proliferativnog kapaciteta CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova korišćeni su neuroantigen - rekombinantni MBP (Sigma-Aldrich) i mitogen - ConA (Sigma-Aldrich), a za detektovanje proliferišućih ćelija (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa) 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) (BD Biosciences). S obzirom na to da nuklearni protein Ki-67 ima esencijalnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i da je njegova ekspresija prisutna tokom G1, S, G2 i M faze ćelijskog ciklusa, ali nije detektabilna tokom G0 faze, ovaj protein se koristi kao ćelijski marker proliferacije (Scholzen i Gerdes, 2000; Soares i sar. 2010). Stoga, PE-om konjugovano anti-Ki-67 (klon B56) antitelo (BD Biosciences Pharmingen) korišćeno je za ispitivanje *ex vivo* proliferacije konvencionalnih Foxp3-CD8<sup>+</sup> T-limfocita.

Prilikom određivanja intracelularne ekspresije citokina, za stimulaciju mononuklearnih ćelija kičmene moždine i drenirajućih limfnih čvorova korišćeni su: PMA (Sigma-Aldrich), jonomicin (Sigma-Aldrich), a kao blokator proteinskog

transporta korišćen je brefeldin A (eBioscience). Za određivanje procentualne zastupljenosti IL-17<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita u kulturama mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine, korišćen je MBP za stimulaciju ovih ćelija preko noći. Takođe, ConA i MBP su korišćeni za stimulaciju kultivisanih CD4<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova, a radi određivanja koncentracija IL-17A i IFN- $\gamma$  u supernatantima ovih kultura.

Za kultivisanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine/limfnog čvora upotrebljen je *engl.* Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medijum (Sigma-Aldrich), koji je obogaćen 25 mM N-2-hidroksietilpiperazin N'-2-etansulfonskom kiselinom (HEPES) (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutaminom (Serva, Heidelberg, Nemačka), 1 mM natrijum piruvatom (Serva), 100 i.j./ml penicilinom (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), 100  $\mu$ g/ml streptomycinom (ICN), a dodat je i 10% FCS, prethodno toplotom inaktivisan u vodenom kupatilu.

Za magnetno izdvajanje ćelija (*engl.* magnetic-activated cell sorting, MACS) kičmene moždine i drenirajućih limfnih čvorova, korišćene su LS kolone i odgovarajući Quadro MACS separator, mikročestice (*engl.* MicroBeads) vezane za anti-CD8 (klon G28) i anti-CD6 (klon OX-52) antitela, kao i anti-biotin mikročestice nabavljeni od Miltenyi Biotec (Gladbach, Nemačka). U proceduri je korišćen i MACS pufer koji je sadržao fosfatni pufer uz dodatak 2 mM etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) (Fluka AG Chemie GmbH, Buchs SG, Švajcarska) i 0.5% goveđeg serum albumina (*engl.* bovine serum albumine, BSA) (Fluka AG Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland).

Za izolaciju ukupnih RNK iz mononuklearnih ćelija i CD11b<sup>+</sup> ćelija kičmene moždine, kao i mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova korišćen je aparat ABI Prism 6100 Nucelic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i komercijalni komplet reagenasa (Total RNA Chemistry Starter Kit, Applied Biosystems, kojeg čine: rastvori za pranje (Wash Solution 1 i 2), rastvor za spiranje (Elution Solution) i rastvor dezoksiribonukleaze (Absolute RNA Wash Solution).

Za reverznu transkripciju - transkripciju RNK u komplementarnu dezoksiribonukleinsku kiselinu (*engl.* complementary DNA, cDNK) korišćen je komplet komercijalnih reagenasa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription



Kit, Applied Biosystems) kojeg čine: pufer za reverznu transkripciju (10× RT Buffer), rastvori nukleotida (25× dNTP Mix) i nasumičnih prajmera (10× RT Random Primers), reverzna transkriptaza (Multiscribe Reverse Transcriptase) i inhibitor aktivnosti ribonukleaze (RNaze) (RNase inhibitor).

U procedurama vezanim za kvantifikaciju ekspresije gena korišćeni su komercijalna TaqMan smeša reagenasa za merenje ekspresije gena (Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems) i komercijalni TaqMan eseji za merenje ekspresije iRNK pacova: IFN- $\gamma$  (Ifng; Rn00594078\_m1), IL-17a (Il17a; Rn01757168\_m1), IL-12a (Il12a; Rn00584538\_m1), IL-23a (Il23a; Rn00590334\_g1), IL-6 (Il6; Rn99999011\_m1), IL-1 $\beta$  (Il1b; Rn99999009\_m1), hem-oksigenaza (HO)-1 (*engl.* heme oxygenase1, Hmox1; Rn005613787\_m1), TGF- $\beta$  (Tgfb1; Rn00572010\_m1), CD44 (Cd44; Rn01637065\_m1),  $\beta$ -actin (Actb; Rn00667869\_m1) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Gapdh; Rn99999916\_sl). Svi navedeni eseji nabavljeni su od Applied Biosystem.

Za određivanje koncentracije IL-17A ELISA metodom korišćen je komercijalni kit (Rat IL-17A ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend), dok za određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  istom metodom nije korišćen komercijalni kit, već pojedinačno nabavljene komponente: prečišćeno antitelo protiv pacovskog rekombinantnog IFN- $\gamma$  (klon DB1), biotinom konjugovano poliklonsko anti-IFN- $\gamma$  antitelo konjugovano sa biotinom i rekombinantni pacovski IFN- $\gamma$  (eBioscience, Vienna, Austrija), ekstravidin-peroksidaza i orto-fenilendiamin (*engl.* ortho-phenylenediamine, OPD) (Sigma-Aldrich). U ELISA testu za određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  korišćen je karbonatni pufer za razblaživanje antitela kojim su oblagani bazeni mikrotitracione ploče i citratni pufer za rastvaranje OPD-a. Karbonatni pufer pravljen je tako što je 0,8403 g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) i 0,3655 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) rastvarano u 100 ml destilovane vode. Citratni pufer dobijen je tako što su najpre napravljeni rastvori 0.1 M limunske kiseline (Sigma-Aldrich) i 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) u destilovanoj vodi i nakon toga, pomešano je 49 ml rastvora limunske kiseline sa 51 ml rastvora Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), kako bi se dobilo 100 ml pufera. Za ispiranje mikrotitracione ploče, prilikom izvođenja ELISA testa za određivanje koncentracije IL-17A i IFN- $\gamma$  korišćen je pufer koji je sadržavao fosfatni pufer uz dodatak 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich).

### 3.6. Izolacija mononuklearnih ćelija

#### 3.6.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine

Nakon perfuzije životinja fosfatnim puferom izvađene su kičmene moždine iz kičmenog kanala i potom pasirane kroz najlonske mrežice sa porama veličine 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, Erembodegem, Belgija). Sadržaj je prikupljan u Petrijevu šolju, koja je sadržala hladan (+4 °C) RPMI 1640 medijum sa 5% FCS-om. Ćelijske suspenzije su centrifugirane na  $800 \times g$  6 minuta na +4 °C, i potom oprane u RPMI 1640 medijumu sa 5% FCS-om. Dobijeni talog je resuspendovan u 4 ml 40% Percoll-a, i naslojen na 70% Percoll zapremine 2,5 ml. Ćelije su zatim centrifugirane na  $1000 \times g$ , 50 minuta na sobnoj temperaturi, bez kočenja prilikom zasutavljanja centrifuge. Ćelije koje su se izdvojile između dva sloja su pažljivo pokupljene, resuspendovane u RPMI 1640 medijumu sa 5% FCS-om, dva puta isprane centrifugiranjem. i resuspendovane u 200  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 medijuma sa 5% FCS-om. Brojanje živih ćelija izvršeno je uz pomoć vitalne boje tripan plavo (Sigma-Aldrich) u poboljšanom Neubauerovom hemocitometru.

#### 3.6.2. Izolacija mononuklearnih ćelija iz slezine i drenirajućih limfnih čvorova

Tkivo slezine/drenirajućih limfnih čvorova je macerirano i propušteno kroz plastičnu mrežicu (otvori veličine 60  $\mu\text{m}$ ) u epruvetu sa hladnim rastvorom fosfatnog pufera sa 2% FCS-om i 0.09%  $\text{NaN}_3$ . U suspenziji ćelija slezine izvršeno je liziranje dodavanjem (u odnosu 1:4) rastvora amonijum hlorida ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Ćelijske suspenzije slezine/drenirajućih limfnih čvorova su oprane tri puta centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 minuta) u hladnom fosfatnom puferu sa 2% FCS-om i 0.09%  $\text{NaN}_3$ . Žive ćelije su brojane u poboljšanom Neubauerovom hemocitometru.

#### 3.6.3. Magnetno izdvajanje CD11b+ ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD4+ T-limfocita iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine/slezine/drenirajućih limfnih čvorova

Kako bi se izvršilo magnetno izdvajanje CD11b<sup>+</sup> ćelija iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine,  $1 \times 10^7$  ćelija je resuspendovano u 100  $\mu$ l MACS pufera i dodato im je 20  $\mu$ l anti-CD11b (klon WT.5) antitela koje je konjugovano sa biotinom. Posle 30 minuta inkubacije na +4 °C, ćelije su dva puta oprane u 1 ml MACS pufera. Na talog ćelija resuspendovan u 80  $\mu$ l MACS pufera dodato je 20  $\mu$ l anti-biotin mikročestica, i ćelije su inkubirane 15 minuta na +4 °C. Po isteku inkubacije ćelije su oprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene centrifugiranjem resuspendovane u 0,5 ml MACS pufera. Suspenzija ćelija obeleženih mikročesticama je zatim propuštena kroz LS kolonu smeštenu u magnetno polje Quadro MACS separatora. Obeležene CD11b<sup>+</sup> ćelije („pozitivna“ ćelijska frakcija) su se zadržale na koloni, dok su neobeležene CD11b<sup>-</sup> ćelije, posle prolaska kroz kolonu i ispiranja kolone MACS puferom (3 x 3 ml), sakupljene kao „negativna“ frakcija ćelija. U cilju dobijanja CD11b<sup>+</sup> ćelija, LS kolona je uklonjena iz magnetnog polja, dodato je 5 ml MACS pufera i obeležene CD11b<sup>+</sup> ćelije su, pomoću klipa, istisnute iz kolone i sakupljene. Čistoća izdvojene ćelijske frakcije proveravana je obeležavanjem sa anti-CD11b antitelom koje je konjugovano sa FITC-om i metodom protočne citofluorometrije je pokazano da je 90-95% ćelija bilo CD11b<sup>+</sup>, a upotrebom vitalne boje Tripan plavo da su žive ćelije bile zastupljene sa više od 95%.

Dobijena CD11b<sup>-</sup> frakcija ćelija kičmene moždine i na identičan način dobijena CD11b<sup>-</sup> frakcija ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija slezine/drenirajućih limfnih čvorova korišćene su za izdvajanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ćelije CD11b<sup>-</sup> frakcija su resuspendovane u 80  $\mu$ l MACS pufera, dodato je 20  $\mu$ l anti-CD8 mikročestica, i kao što je prethodno opisano izdvajana je “negativna” frakcija ćelija. U daljem postupku izdvajanja u CD8<sup>-</sup> frakciju ćelija dodavano je antitelo protiv pacovskih T-ćelija konjugovano sa mikročesticama. Nakon inkubacije, imunomagnetnim razdvajanjem, na način koji je prethodno opisan, izdvajana je “pozitivna” frakcija ćelija. Posle bojenja antitelom protiv CD4 molekula, metodom protočne citofluorometrije pokazano je da je ovako dobijena “pozitivna” frakcija sadržala 90-95% CD4<sup>+</sup> T-limfocita.

3.6.4. Stimulacija ćelija kičmene moždine i drenirajućih limfnih čvorova za analizu sinteze citokina protočnom citofluorometrijom

Izolovane mononuklearne ćelije kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova, kao i magnetnim izdvajanjem izolovani CD4+ T-limfociti iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova su zasejavane ( $10^6$ /ml) u RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 2 mM L-glutaminom (Serva), 1 mM natrijum piruvatom (Serva), 100 i.j./ml penicillinom (ICN), 100 µg/ml streptomycinom (ICN), i 10% FCS-om. Zasejavano je 500 µl suspenzije ćelija u ploče sa 24 bazena (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nemačka). Suspenzije su sadržavale 200 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) i 400 ng/ml jonomicina (Sigma-Aldrich) i 3 µg/ml blokatora proteinskog transporta brefeldina A (eBioscience). Ploče su inkubirane 4h na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku inkubacionog vremena, suspenzije su prebačene u epruvete, ćelije istaložene centrifugiranjem, prane, te na ovaj način pripremljene za unutarćelijsko bojenje citokina.

3.6.5. Kultivisanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova za analizu sinteze citokina nakon restimulacije MBP-om (*engl.* “recall cytokine production” test)

Mononuklearne ćelije ( $2 \times 10^5$ /bazenu) izolovane iz kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova kultivisane su u pločama sa 96 bazena sa “U” dnom (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> u kompletnom RPMI 1640 medijumu sa ili bez dodatog MBP-a u koncentraciji od 20 µg/ml. Period inkubacije trajao je preko noći u slučaju mononuklearnih ćelija kičmene moždine, odnosno 72h u slučaju ćelija drenirajućeg limfnog čvora. Ćelije drenirajućih limfnih čvorova su potom restimulisane PMA-om i jonomicinom u prisustvu brefeldina A i potom pripremljene za proceduru unutarćelijskog bojenja citokina kao što je opisano u sekciji 3.6.4. Ćelije kičmene moždine inkubirane su sa brefeldinom A poslednja 4h kultivacije, a potom prikupljene u epruvete, istaložene centrifugiranjem, prane, te na ovaj način pripremljene za unutarćelijsko bojenje citokina.

3.6.6. Kultivisanje mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova za analizu proliferacije CD4+ i CD8+ T-limfocita

Mononuklearne ćelije izolovane iz drenirajućih limfnih čvorova ( $2 \times 10^5$ /bazenu) kultivisane su u pločama sa 96 bazena sa "U" dnom (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u RPMI-1640 medijumu sa 10% FCS-om tokom 72h u prisustvu 2.5 µg/ml ConA ili 20 µg/ml MBP-a ili samo u medijumu. Ćelije su inkubirane na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku inkubacije ćelije su istaložene centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 minuta na +4 °C). Ćelije su oprane dva puta i inkubirane sa antitelima specifičnim za CD4 i CD8 obeleženim fluorohromima, da bi se potom pristupilo bojenju 7-aminoaktinomycinom D (7-AAD), bojom koja se vezuje za DNK, i analizi ćelijskog ciklusa prema proceduri opisanoj u sekciji 3.7.3.

### 3.6.7. Analiza fagocitoze lateksnih čestica

Žuto-zelene fluorescentne čestice lateksa prečnika 1 µm, koncentracije  $10^8$  čestica/ml (Sigma-Aldrich) su najpre sonifikovane u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 2 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je 1µl ovih čestica inkubiran sa 100 µl suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine ( $1 \times 10^6$ /ml) u kompletnom RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 5% FCS-a u trajanju od 30 minuta na 37 °C. Fagocitoza je prekidana postavljanjem ćelija na led 5-10 minuta, a onda su ćelije prane hladnim fosfatnim puferom i pristupilo se obeležavanju membranskih antigena, a potom analizi ćelija protočnom citofluorometrijom. Kao kontrola korišćene su ćelije, koje su inkubirane sa lateks česticama na temperaturi od +4 °C.

### 3.6.8. Analiza endocitoze dekstrana

Suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine ( $1 \times 10^6$ /ml) u kompletnom RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 5% FCS-a inkubirana je sa dekstranom koji je obeležen FITC-om (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) 90 minuta na 37 °C. Kao kontrola korišćene su mononuklearne ćelije kičmene moždine inkubirane sa dekstranom koji je obeležen FITC-om na +4 °C. Dodavanjem hladnog fosfatnog pufera sa 2% FCS-om i 0.09% NaN<sub>3</sub> prekinuto je preuzimanje dekstrana. Ćelije su potom oprane dva puta kako bi se uklonio višak dekstrana, da bi se potom pristupilo obeležavanju membranskih antigena. Ćelije su analizirane protočnom citofluorometrijom.

### 3.7. Protočna citofluorometrija

#### 3.7.1. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih antigena

Iz ćelijskih suspenzija izdvajana je zapremina u kojoj je broj ćelija bio  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  ćelija u posebne epruvete, a potom su ćelije taložene centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 minuta,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Na talog ćelija dodavane su odgovarajuće (titracijom određene) zapremine antitela direktno obeleženih fluorohromima i inkubirane 30 minuta, u mraku, na temperaturi  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po isteku inkubacionog vremena ćelije su prane dva puta centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 minuta,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u fosfatnom puferu sa 2% FCS-om i 0.09%  $\text{NaN}_3$  i jednom u fosfatnom puferu sa 0.09%  $\text{NaN}_3$ . Ćelije su zatim resuspendovane u 350  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera sa 0.09%  $\text{NaN}_3$  i analizirane su metodom protočne citofluorometrije. Kad su se u prvom koraku koristila antitela konjugovana biotinom ili neobeležena antitela, u drugom koraku dodavali su se sekundarni reagensi: PerCP-om i PE-om konjugovan streptavidin ili PE-om konjugovan magarac anti-zec F(ab')<sub>2</sub> IgG, a ćelije su potom inkubirane 30 minuta, u mraku, na temperaturi  $+4^\circ\text{C}$ , prane i potom resuspendovane u 350  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera sa 0.09%  $\text{NaN}_3$  i analizirane protočnom citofluorometrijom.

#### 3.7.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije unutarćelijskih antigena

Pošto je izvršeno obeležavanje površinskih antigena (opisano u sekciji 3.7.1.) pristupalo se obeležavanju unutarćelijskih antigena - citokina, Foxp3, Ki-67 i granzima B. Mononuklearne ćelije kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova su fiksirane i njihova membrana je permeabilizovana primenom pufera za fiksaciju/permeabilizaciju iz komercijalnog kita (eBioscience), koji je razblaživan u odnosu 1:4 odgovarajućim rastvaračem, preko noći na temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ćelije su potom prane dva puta u 700  $\mu\text{l}$  pufera za permeabilizaciju iz istog komercijalnog kita (razblažen u odnosu 1:10 fosfatnim puferom) i inkubirane sa odgovarajućim antitelom 30 minuta u mraku (na sobnoj temperaturi, osim u slučaju obeležavanja Foxp3 antigena, kada je inkubacija bila na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Po isteku inkubacionog perioda ćelije su ponovo prane dva puta puferom za permeabilizaciju i zatim resuspendovane u 350  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera sa 0,09%  $\text{NaN}_3$ , da bi potom bile analizirane metodom protočne fluorocitometrije.

### 3.7.3. Analiza ćelijskog ciklusa CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita bojenjem DNK vezujućom bojom 7-AAD

Posle kultivacije u trajanju od 72h, ćelije drenirajućih limfnih čvorova su prane dva puta i potom inkubirane sa antitelima specifičnim za CD4 i CD8 obeleženim fluorohromima. Posle inkubacije ćelije su prane i resuspendovane u 150 µl 50% rastvora FCS-a u fosfatnom puferu sa 0,09% NaN<sub>3</sub>. Ćelije su potom fiksirane i permeabilizovane postepenim dodavanjem hladnog 70% rastvora etanola u zapremini od 450 µl, a onda ostavljene preko noći na temperaturi od +4 °C. Posle inkubacije, ćelije su prane, a zatim im je dodavan 7-AAD u zapremini od 10 µl. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na +4 °C, ćelije su prane i resuspendovane u 350 µl fosfatnog pufera sa NaN<sub>3</sub>. Ćelijski ciklus je analizovan korišćenjem Dean-Jet-Fox modela i platforme za analizu ćelijskog ciklusa FlowJo softvera verzija 7.8. (TreeStar Inc, Ashland, OR, SAD).

### 3.7.4. Određivanje procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima kičmene moždine

Za određivanja procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova, korišćen je Aneksin V komercijalni kit (BD Pharmingen). Nakon inkubacije mononuklearnih ćelija kičmene moždine sa antitelima za membranske antigene, ćelije su oprane jednom u fosfatnom puferu sa 2% FCS-om i 0.09% NaN<sub>3</sub>, i jednom u fosfatnom puferu. Ćelije su nakon toga resuspendovane u 50 µl aneksin V vezujućeg pufera (razblažen dejonizovanom vodom u odnosu 1:10) i zatim je dodavan 1,5 µl aneksin V obeležen FITC-om. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, dodavano je još 250 µl razblaženog aneksin V vezujućeg pufera i zastupljenost apoptotičnih (aneksin V<sup>+</sup>) ćelija je određivana protočnim fluorocitometrom.

### 3.7.5. Analiza uzoraka protočnom citofluorometrijom

U ovoj studiji korišćena su dva protočna citofluorometra: analogni FACSCalibur i digitalni FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD). Po uzorku je

učitavano 20 000-50 000 ćelija. Analiza ćelija iz istog uzorka učitavanog kako na FACSCalibur-u, tako i na FACSVerse-u pokazala je da se podaci dobijeni sa jednog i drugog aparata mogu porediti. Laserski izvori svetlosti kod oba citometra jesu argonski jonski laser talasne dužine 488 nm, kao i diodni laser talasne dužine 635 nm, što je omogućilo analizu do četiri različita parametra (fluorohroma).

Talasna dužina laserskog zraka odgovara talasnoj dužini pobuđivanja fluorohroma koji se koristi. Ćelije iz suspenzije za čije su membranske ili unutarćelijske antigene vezana antitela obeležena fluorohromima, prolaze kroz fokusirani laserski svetlosni snop, te dolazi do ekscitacije fluorohroma i emitovanja fluorescence, koju detektuju fotodetektor citometra. Detektovanjem rasipanja svetlosti u ravni upadnog laserskog zraka dobija se uvid u dimenzije same ćelije, dok se detektovanjem rasipanja svetlosti upravno na upadni laserski zrak dobija informacija o granuliranosti ćelije.

Za određivanje procentualne zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju antigen, tj. ćelija pozitivnih za određeni antigen, korišćen je kompjuterski program FlowJo software v.7.8 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, SAD). Kako bi se detektovalo nespecifično bojenje korišćene su IgG izotipske kontrole ili u slučaju poliklonskih antitela korišćeno je bojenje samo sa sekundarnim antitelom. U slučajevima višekolornog bojenja korišćene su i kontrole, koje obuhvataju sve fluorochrome korišćene u datom bojenju, osim onog koji se meri (*engl.* fluorescence minus one control, FMO), kako bi se omogućilo adekvatno postavljanje granica za selektovanje („gejtovanje“) određenog subseta ćelija.

### **3.8. Određivanje koncentracije citokina enzimskim imunološkim metodama**

Koncentracije citokina IL-17A i IFN- $\gamma$  određivane su u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine. Mononuklearne ćelije kičmene moždine ( $10^6$  ćelija/ml) zasejavane su u 500  $\mu$ l kompletnog RPMI 1640 medijuma obogaćenog 10% FCS-om, a u ploči sa 24 bazena. Medijumu su dodati i 200 ng/ml PMA i 400 ng/ml jonomicina. Ćelije su inkubirane 4h na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, a potom su centrifugirane (350  $\times$  g) i izdvojeni su supernatanti, koji su čuvani na -70 °C do određivanja citokina.



### 3.8.1. Određivanje koncentracije IL-17A

Dan pre izvođenja testa potreban broj bazena ploče sa 96 bazena obložen je sa 100 µl razblaženog (1:200) antitela specifičnog za pacovski IL-17A, pokriveni adhezivnim filmom i inkubirani na temperaturi 2-8 °C preko noći. Po isteku inkubacionog vremena bazeni su isprani četiri puta puferom za ispiranje, a višak ovog pufera je eliminisan okretanjem i tapkanjem ploče na apsorptivni papir. Potom je dodato 200 µL komercijalnog rastvarača za standard i ploča je inkubirana 1h uz neprekidno mešanje na sobnoj temperaturi. Bazeni su zatim ispirani i dodavano je 100 µl standarda (pacovski IL-17A), odnosno supernatanta. Nakon inkubacije od 2h uz mešanje na sobnoj temperaturi dodavano je anti-IL-17A antitelo za detekciju konjugovano biotinom (100 µl, razblaženo 1:200) i nastavljena je inkubacija u istim uslovima još 1h. Peroksidaza rena konjugovana avidinom (*engl.* avidin-horseradish peroxidase, HRP) razblažena u odnosu 1:1000, i u zapremini od 100 µl, dodavana je u isprane bazene. Po isteku inkubacije od 30 minuta, u isprane bazene je dodat rastvor supstrata. Razvijanje boje je trajalo 15 minuta u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl tzv. stop rastvora, odnosno 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzitet boje je meren na spektrofotometru na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija citokina je određivana na osnovu standardne krive. Standardi su korišćeni u sedam različitih, dvostruko opadajućih, koncentracija počev od 1000 pg/ml, dok je kao nula korišćen komercijalni rastvarač za standard i uzorke. Minimalna koncentracija IL-17A koju je moguće detektovati ovim testom iznosi 8 pg/ml.

### 3.8.2. Određivanje koncentracije IFN-γ

Dan pre izvođenja testa potreban broj bazena mikrotitracione ploče sa 96 bazena (Nunc Maxisorp™) obložen je sa 50 µl anti-IFN-γ antitela (1 µg/ml), pokriven adhezivnim filmom i inkubiran na temperaturi 2-8 °C preko noći. Potom je po odlivanju sadržaja, bazenima dodat fosfatni pufer sa 1% albuminom goveđeg seruma (*engl.* bovine serum albumine, BSA) (Fluka AG Chemie GmbH, Buchs SG, Švajcarska) u zapremini od 200 µl. Po isteku inkubacije od 1h na sobnoj temperaturi, bazeni su tri puta isprani sa 200 µl fosfatnog pufera kome je dodato 0,05% Tween 20. Standardi (rekombinantni pacovski IFN-γ) ili uzorci su dodavani u isprane bazene u zapremini od

50  $\mu$ l i inkubirani 1h na sobnoj temperaturi. Anti-IFN- $\gamma$  antitelo konjugovano biotinom (2  $\mu$ g/ml, zapremine 50  $\mu$ l) dodavano je u isprane bazene, koji su ponovo inkubirani 1h na sobnoj temperaturi. Potom je u isprane bazene dodavano 50  $\mu$ l ekstravidin peroksidaze razblažene u fosfatnom puferu sa 1% BSA u odnosu 1:1000 i inkubirano je 1h. Za razvijanje boje bilo je dovoljno 15 minuta inkubacije sa 50  $\mu$ l supstrata ( $H_2O_2$  + OPD). Zaustavljanje reakcije ostvareno je dodavanjem 4 N  $H_2SO_4$ . Intenzitet boje je meren na spektrofotometru na talasnoj dužini od 492 nm. Koncentracija IFN- $\gamma$  je određivana na osnovu standardne krive. Minimalna koncentracija IFN- $\gamma$  koja se može detektovati ovim testom iznosi 5,6 pg/ml.

### **3.9. Relativna kvantifikacija ekspresije gena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu**

3.9.1. Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine/slezine/drenirajućih limfnih čvorova i CD11b+ ćelija kičmene moždine

Mononuklearne ćelije kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova ili CD11b+ ćelije kičmene moždine ( $10^5$ ) su lizirane u 200  $\mu$ l rastvora za prečišćavanje nukleinskih kiselina i lizati su čuvani na  $-70^\circ C$ . Izolovanje ukupne RNK iz lizata ćelija obavljeno je upotrebom aparata ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation i komercijalnih reagenasa u okviru Total RNA chemistry starter kit, koji su opisani detaljnije u sekciji 3.5.

3.9.2. Prevođenje ukupne RNK u cDNK

Svaka reakcija reverzne transkripcije je sadržala: 10  $\mu$ l prečišćene RNK, 2  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju, 0,8  $\mu$ l mešavine nukleotida, 2  $\mu$ l smeše nasumičnih prajmera, 1  $\mu$ l reverzne transkriptaze, 1  $\mu$ l inhibitora RNaze i 3,2  $\mu$ l vode prečišćene od nukleinskih kiselina i nukleaza. Reakcija reverzne transkripcije RNK se odvijala kroz inkubacije od 10 minuta na  $25^\circ C$ , zatim 120 minuta na  $37^\circ C$  i 5 sekundi na  $85^\circ C$ , na aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. Sintetisana cDNK korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena metodom RT-qPCR.

### 3.9.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu predstavlja kombinaciju klasičnog umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze i fluorimetrije, u kojoj postoji korelacija između koncentracije produkta reakcije i intenziteta fluorescence. RT-qPCR reakcija je okarakterisana vremenskom tačkom (PCR ciklus) u kojoj se amplifikacija ciljnog produkta prvi put detektuje. Ova vrednost se uobičajeno definiše kao ciklus u kojem je intenzitet fluorescence značajno veći od nivoa šuma, tzv. pragovnog ciklusa (*engl.* threshold cycle, Ct), i meri se u eksponencijalnoj fazi reakcije. Vrednost Ct zavisi od polaznog broja kopija ciljne sekvence i koristi se za izračunavanje eksperimentalnih rezultata.

Reakcije RT-qPCR postavljane su u triplikatu, u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ l (5  $\mu$ l cDNK, 12,5  $\mu$ l smeše ragenasa za merenje ekspresije gena, 1,25  $\mu$ l eseja specifičnog za gensku sekvencu od interesa i 6,25  $\mu$ l vode). Reakcije su se odvijale pod standardnim uslovima definisanim za korišćeni aparat i podrazumevali su: inkubacije od 2 minuta na 50 °C, zatim od 10 minuta na 95 °C, i 40 ciklusa od po 15 sekundi na 95 °C i inkubaciju od jednog minuta na 60 °C. U slučaju mononuklearnih ćelija kičmene moždine i drenirajućih limfnih čvorova za endogenu kontrolu, tj. referentni gen, izabran je  $\beta$ -aktin, dok je za splenocite kao referentni gen korišćen gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (*engl.* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Referentni geni su korišćeni sa ciljem normalizacije razlika u količini polaznog materijala i izabrani su na osnovu optimalne stabilnosti ekspresije u različitim eksperimentalnim uslovima, koja je utvrđena kompjuterskim programom NormFinder v0.953 software (<http://moma.dk/normfinder-software>; Andersen et al., 2004).

Kvantifikacija ekspresije gena od interesa izvršena je pomoću kompjuterskog programa SDS software v.1.4.0., korišćenjem komparativne (dCt) metode. Relativne količine iRNK od interesa izražene su kao  $2^{-dCt}$  vrednosti, gde je  $dCt = Ct$  ciljnog gena –  $Ct$  referentnog gena.

### 3.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka u okviru ove doktorske disertacije korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (*engl.* two-way analysis of variance, two-way ANOVA).

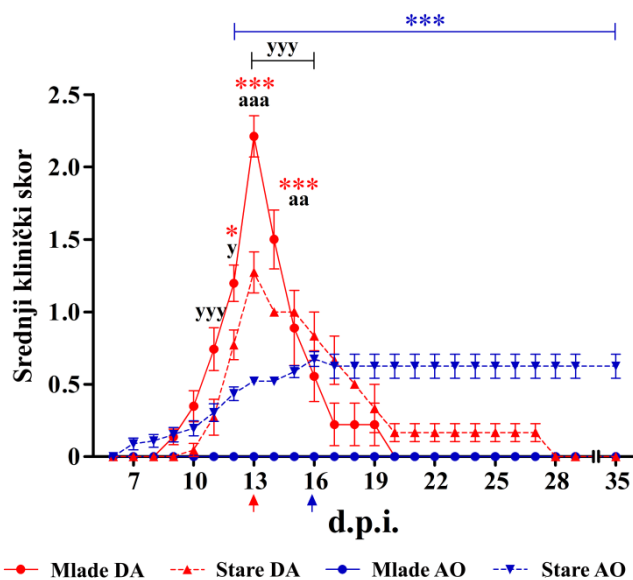
Kako bi smo utvrdili između kojih eksperimentalnih grupa je postojala statistički značajna razlika korišćen je naknadni Bonferroni test (*engl.* Bonferroni test for post-hoc comparisons). Za utvrđivanje statistički značajnih razlika u ekspresiji CD44 na CD4+ T-splenocitima, kao i zastupljenosti CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ T-splenocita kod DA pacova, primenjen je Studentov t-test za neuparene uzorke (*engl.* unpaired Student's t-test). Statistička obrada podataka urađena je statističkim programom GraphPad Prism v 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (*engl.* standard error of the mean, SEM). Razlike su smatrane statistički značajnim za p vrednost  $\leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uticaj starenja na kliničku i histološku sliku EAE-a kod pacova DA i AO soja

#### 4.1.1. Starenje smanjuje osetljivost DA pacova na indukciju EAE-a, a povećava osetljivost AO pacova na indukciju EAE-a

Pacovi DA soja obe starosti razvili su akutnu monofaznu bolest sa vrhuncem ostvarenim 13. d.p.i. i spontanom oporavkom (Slika 1). Svi mladi pacovi DA soja ispoljili su klinički manifestnu bolest, dok je incidencija klinički manifestne bolesti kod starih pacova ovog soja bila 33,3% (Tabela 1). Između mladih i starih DA pacova nije bilo razlike u dužini asimptomatske faze bolesti (Tabela 1), ali je maksimalni klinički skor (zbir najvećih kliničkih znakova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj pacova sa kliničkim znacima EAE-a u grupi) bio značajno veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih u odnosu na stare DA pacove (Tabela 1).



**Slika 1. Uticaj starenja na osetljivost DA i AO pacova na indukciju EAE-a.** Linijski dijagram prikazuje dnevni klinički skor EAE-a kod DA i AO pacova iz četiri eksperimenta (kod DA pacova i starih AO pacova srednji klinički skor je računat tako što je zbir kliničkih skorova svih bolesnih životinja podeljen sa brojem obolelih životinja). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. U prvom eksperimentu (9 mladih i 11 starih DA pacova; 13 mladih i 13 starih AO pacova) prisustvo neuroloških znakova je praćeno do 35. d.p.i. U naredna tri eksperimenta, DA pacovi (6 životinja svakog uzrasta po eksperimentu) su žrtvovani na vrhuncu bolesti, 13. d.p.i. (označeno crvenom strelicom), a AO pacovi (6 životinja svakog uzrasta po eksperimentu) 16. d.p.i. kada je neurološki skor dostigao plato (označeno plavom strelicom). DA mlade vs DA stare: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; AO mlade vs AO stare: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; AO stare vs DA stare: aa  $p \leq 0,01$ , aaa  $p \leq 0,001$ ; AO mlade vs DA mlade: y  $p \leq 0,05$ , yyy  $p \leq 0,001$ .

Kod mladih pacova AO soja nije bilo onih sa kliničkim znakom, dok je kod starih pacova incidencija bolesti bila 62,5% (Tabela 1). Bolest je kod starih AO pacova bila produženog trajanja i dostigla je plato 16. d.p.i. (Slika 1). Dan početka bolesti nije se razlikovao između starih AO i DA pacova, a maksimalni klinički skor bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) kod starih DA pacova (Tabela 1).

**Tabela 1. Uticaj starenja na incidenciju, početak bolesti i maksimalni klinički skor EAE-a kod DA i AO pacova.**

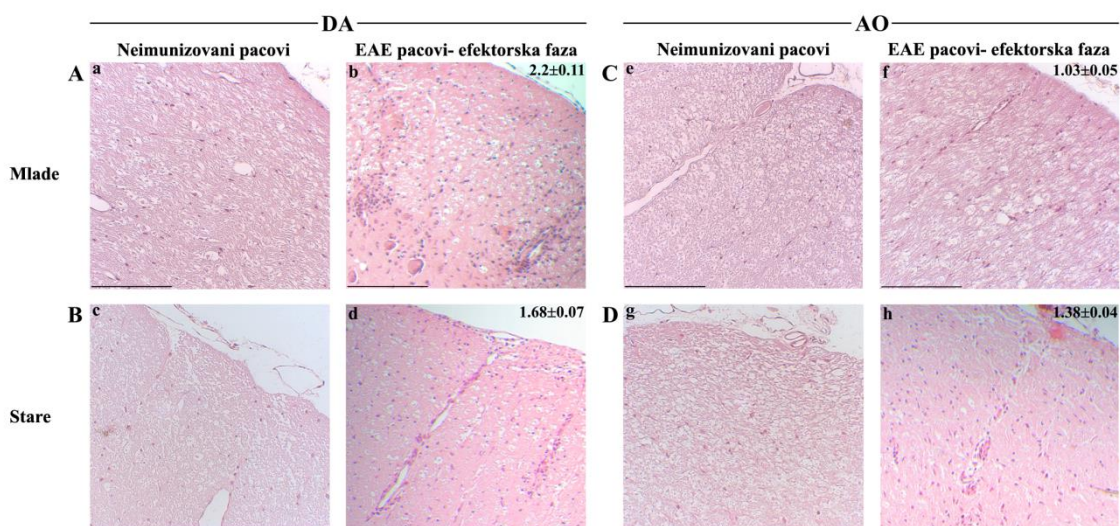
	<b>Incidencija<sup>a</sup></b>	<b>Početak bolesti<sup>b</sup> (d.p.i.)</b>	<b>Maksimalni klinički skor<sup>c</sup></b>
<b>Mlade DA</b>	24/24 (100%)	10,7 ± 0,29	2,33 ± 0,10
<b>Mlade AO</b>	0/24 (0%)	/	/
<b>Stare DA</b>	8/24 (33,3%)	11,7 ± 0,21	1,25 ± 0,16 *** vs mlade DA
<b>Stare AO</b>	15/24 (62,5%)	10,4 ± 0,70	0,63 ± 0,06 *** vs stare DA

<sup>a</sup> Broj pacova sa kliničkim znacima EAE-a/ukupan broj imunizovanih pacova u grupi; <sup>b</sup> Dan posle imunizacije (d.p.i.) kada su pacovi ispoljili prve kliničke znake EAE-a; <sup>c</sup> suma maksimalnih kliničkih znakova svih pacova u eksperimentalnoj grupi/broj pacova sa kliničkim znacima EAE-a u grupi. Svi podaci predstavljeni su kao srednja vrednost ± SEM iz tri nezavisna eksperimenta. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.2. Uticaj starenja na histološku sliku EAE-a kod DA i AO pacova je sojno zavisano

Histološka analiza transverzalnih preseka kičmene moždine, obojenih hematoksilinom i eozinom, pacova imunizovanih radi indukcije EAE-a, bila je u skladu sa kliničkim nalazima. Nađeni su ekstenzivni perivaskularni infiltrati i značajna infiltracija parenhima kičmene moždine mononuklearnim ćelijama kod mladih DA pacova na vrhuncu bolesti (Slika 2). Ove promene bile su najizraženije u lumbosakralnom regionu. Kod mladih AO pacova inflamatorne ćelije retko su se mogle videti perivaskularno ili u parenhimu kičmene moždine (Slika 2). Srednji histološki skor je bio značajno veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova ( $2,2 \pm 0,11$ ) u poređenju sa onim kod mladih AO pacova ( $1,03 \pm 0,05$ ). Na presecima kičmene moždine starih pacova oba soja, perivaskularni infiltrati sastavljeni od mononuklearnih ćelija bili su retki, a infiltracija parenhima kičmene moždine ovim ćelijama siromašna (Slika 2). Srednji

histološki skor je ukazivao na izraženiju ( $p \leq 0,01$ ) inflamaciju kod starih DA ( $1,68 \pm 0,07$ ) u odnosu na stare AO ( $1,38 \pm 0,04$ ) pacove.



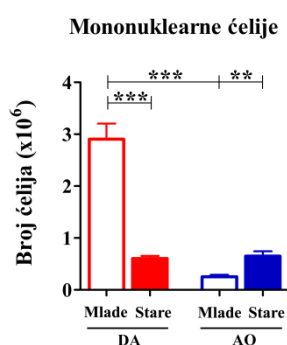
**Slika 2. Starenje utiče na patohistološke karakteristike EAE-a kod DA i AO pacova.** Na hematoksilinom i eozinom obojenim transverzalnim presecima lumbalnog dela kičmene moždine (a,c,e,g) neimunizovanih i (b,d,f,h) EAE imunizovanih (gore) mladih i (dole) starih (A,B) DA i (C,D) AO pacova analizovano je prisustvo mononuklearnog ćelijskog infiltrata. Tkivo za analizu od imunizovanih DA pacova je uzimano na vrhuncu bolesti, (13. d.p.i.), a od AO pacova kada je klinički skor dostigao plato (16. d.p.i.). (A,C) Reprezentativne fotomikrografije prikazuju (b) ekstenzivnu perivaskularnu infiltraciju mononuklearnim ćelijama i njihovo značajno prisustvo u parenhimu kičmene moždine imunizovanih mladih DA pacova i (f) retke mononuklearne ćelije u perivaskularnom prostoru i parenhimu kičmene moždine imunizovanih mladih AO pacova, a (a,e) odsustvo inflamatornog infiltrata u kičmenim moždinama neimunizovanih mladih pacova oba soja. (B,D) Reprezentativne fotomikrografije prikazuju retke perivaskularne infiltrate i siromašnu infiltraciju parenhima kičmene moždine imunizovanih starih pacova oba soja, sa neznatno izraženijom infiltracijom kod (d) DA u poređenju sa (h) AO pacovima, a odsustvo inflamatornog infiltrata u kičmenim moždinama (c,g) neimunizovanih pacova istog uzrasta. Histopatološke promene su kvantifikovane na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Brojevi na fotomikrografijama predstavljaju srednji skor  $\pm$  SEM (n=3 životinje/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za srednji skor imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=45,6; p \leq 0,001$ ]. DA mlade vs DA stare, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; AO mlade vs AO stare, \*\*  $p \leq 0,01$ ; AO stare vs DA stare, aa  $p \leq 0,01$ ; AO mlade vs DA mlade, yyy  $p \leq 0,001$ . Merna dužina, 200  $\mu$ m

#### 4.2. Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a

Imajući u vidu da težina neurološkog deficita u EAE-u zavisi od veličine infiltracije kičmene moždine limfocitima i drugim imunskim ćelijama (monociti) (Constantinescu i sar., 2011), određena je veličina mononuklearnog infiltrata u kičmenoj moždini.

#### 4.2.1. Uzasne i sojne razlike u ukupnom broju mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine

Iz kičmene moždine mladih DA pacova izolovan je značajno veći ( $p \leq 0,001$ ) ukupan broj mononuklearnih ćelija u odnosu na mlade AO pacove (Slika 3). Kod starih DA pacova ukupan broj mononuklearnih ćelija u kičmenoj moždini bio je manji ( $p \leq 0,001$ ) nego kod mladih pacova istog soja, dok je kod starih pacova AO soja bio veći ( $p \leq 0,01$ ) nego kod mladih životinja ovog soja (Slika 3). Nije bilo razlike u broju ovih ćelija kod starih DA i AO pacova (Slika 3).



**Slika 3. Uticaj starenja na broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Histogram prikazuje broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine mladih i starih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=71,33$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

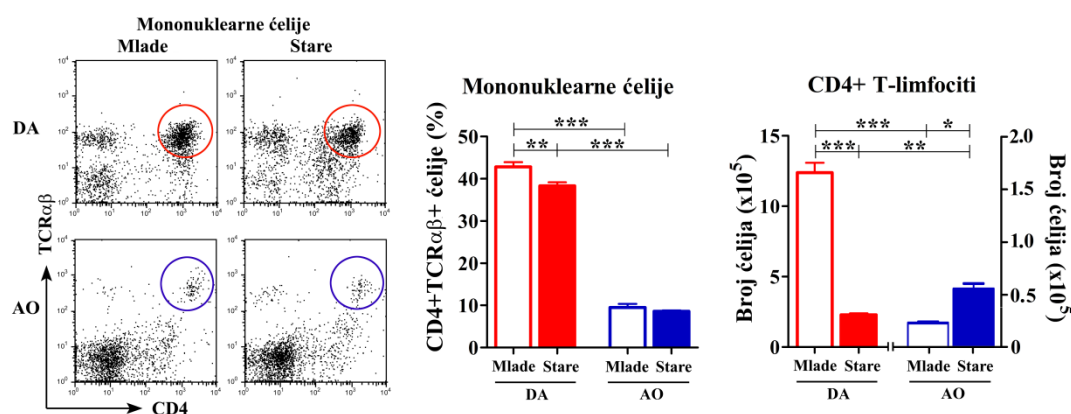
#### 4.2.2. Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama fenotipskih i funkcijskih karakteristika CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a

##### 4.2.2.1. Uzasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine i njihovom ukupnom broju

Ključnu ulogu u pokretanju i razvoju neuroinflamacije u modelu EAE-a imaju neuroantigen-specifični CD4<sup>+</sup> T-limfociti (Constantinescu i sar., 2011). Aktivirani u perifernim limfnim organima, CD4<sup>+</sup> T-limfociti prolaze kroz krvno-moždanu barijeru i infiltriraju CNS, gde njihova reaktivacija vodi produkciji proinflamatornih citokina i omogućava ulazak drugih ćelija iz krvi dovodeći do oštećenja tkiva i razvoja inflamacije (Fletcher i sar., 2010). Analiza procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova pokazala je veću ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost ovih ćelija kod mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 4). Starenjem se njihova procentualna zastupljenost smanjivala



( $p \leq 0,01$ ) kod DA pacova, dok se kod AO pacova nije menjala (Slika 4). Posledično, procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih starih DA pacova bila je značajno veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u okviru ovih ćelija izolovanih iz kičmene moždine starih AO pacova (Slika 4).



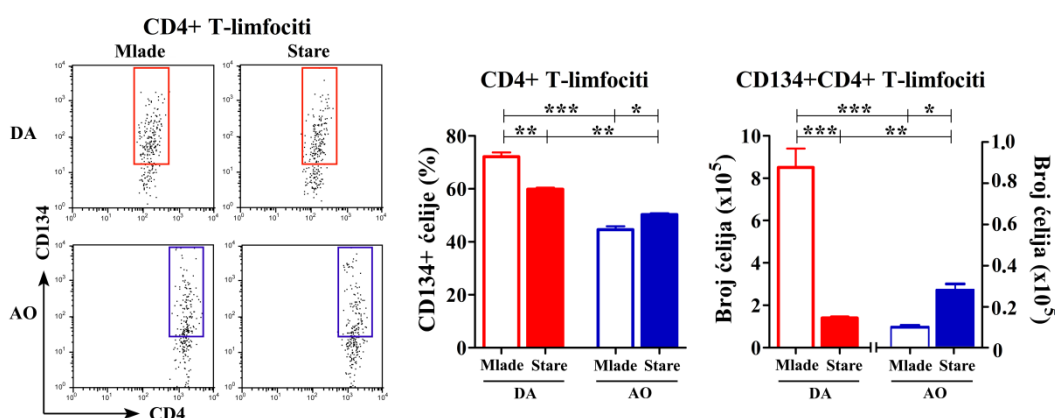
**Slika 4. Starenje utiče na zastupljenost CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD4 vs TCRαβ imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD4+TCRαβ+ limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova i (desno) ukupan broj CD4+TCRαβ+ limfocita koji infiltriraju kičmene moždine ovih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD4+TCRαβ+ limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. [F(1,20)=4,43; p≤0,05] i za ukupan broj ovih ćelija [F(1,20)=216,4; p≤0,001]. \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001.

Broj CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine mladih DA pacova bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) od onog izolovanog iz kičmene moždine mladih AO i starih DA pacova (Slika 4). Za razliku od pacova DA soja, kod pacova AO soja starenje je dovelo do infiltracije kičmene moždine značajno većim ( $p \leq 0,05$ ) brojem CD4+ T-limfocita. Međutim, kao i kod mladih pacova, broj ovih ćelija bio je veći ( $p \leq 0,01$ ) kod starih DA nego kod starih AO pacova (Slika 4).

4.2.2.2. *Uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti aktivisanih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini pacova izolovanih u efektorskoj fazi EAE-a*

Aktivisani efektorski CD4<sup>+</sup> T-limfociti ushodno regulišu CD134 (OX 40 receptor) (Carboni i sar., 2003; Flügel i sar., 2001). Pokazano je i da encefalitogeni efektorski CD4<sup>+</sup> T-limfociti nishodno regulišu ekspresiju aktivacionih markera pre prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (Carboni i sar., 2003), tako da njihovo prisustvo na površini CD4<sup>+</sup>T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine ukazuje na uspešnost reaktivacije CD4<sup>+</sup>T-limfocita posle ulaska u kičmenu moždinu (Flügel i sar., 2001). Imajući ovo u vidu, analizirali smo procentualnu zastupljenost CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita i njihov ukupni broj u kičmenoj moždini pacova imunizovanih u cilju indukcije EAE-a.

Procentualna zastupljenost CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita i njihov ukupni broj u kičmenoj moždini bili su značajno veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod mladih AO pacova (Slika 5). Starenje je kod DA pacova uticalo na smanjenje kako procentualne zastupljenosti ( $p \leq 0,01$ ) CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita, tako i ukupnog broja ( $p \leq 0,001$ ) ovih ćelija (Slika 5). Suprotno ovome, starenjem je kod AO pacova došlo do povećanja ( $p \leq 0,05$ ) i procentualne zastupljenosti i ukupnog broja ovih ćelija (Slika 5). Kod starih pacova procentualna zastupljenost CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita bila je veća ( $p \leq 0,01$ ) kod starih DA pacova (Slika 5). Osim toga, više ( $p \leq 0,01$ ) ovih ćelija je izolovano iz kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa onim izolovanim iz starih AO pacova (Slika 5).

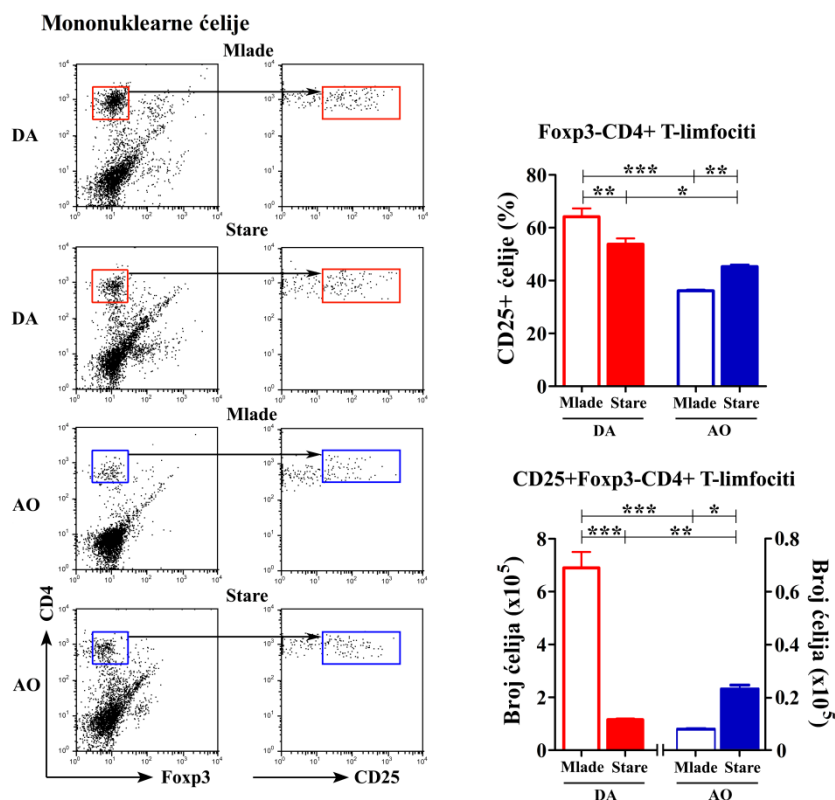


**Slika 5. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD134<sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita i ukupan broj CD134<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje CD134 u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita kičmene moždine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova (koje su izdvojene – “gejtovane” kao što je ilustrovano na

slici 4). CD134+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita kičmene moždine imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj CD134+CD4+ T-limfocita koji infiltriraju njihove kičmene moždine. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita [ $F_{(1,20)}=17,93$ ;  $p\leq 0,001$ ] i za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=64,96$ ;  $p\leq 0,001$ ] u kičmenoj moždini imunizovanih životinja. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

U skladu sa prethodnim nalazima, kod mladih pacova procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju aktivacioni marker CD25 (CD25+) u okviru subseta konvencionalnih Foxp3-CD4+ T-limfocita bila je značajno veća ( $p\leq 0,001$ ) kod DA nego kod AO pacova (Slika 6). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p\leq 0,01$ ) zastupljenosti ovih ćelija u okviru konvencionalnih CD4+ T-limfocita kod DA pacova (Slika 6). Za razliku od DA pacova, kod AO pacova je starenjem došlo do povećanja ( $p\leq 0,01$ ) njihove zastupljenosti u okviru konvencionalnih CD4+ T-limfocita kod AO pacova (Slika 6). Međutim, i kod starih DA pacova procentualna zastupljenost CD25+ ćelija u okviru Foxp3-CD4+ T-limfocita je ostala veća ( $p\leq 0,05$ ) nego kod AO pacova istog uzrasta (Slika 6).

U skladu sa analizom ukupnog broja CD134+CD4+ T-limfocita, veći ( $p\leq 0,001$ ) ukupni broj aktivisanih CD25+ Foxp3-CD4+ ćelija nađen je u kičmenoj moždini mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 6). Kod DA pacova došlo je do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) ukupnog broja ovih ćelija sa starenjem, dok je kod AO pacova njihov broj bio veći ( $p\leq 0,05$ ) kod starih AO u odnosu na mlade pacove istog soja (Slika 6). Iz kičmene moždine starih DA pacova izolovan je veći ( $p\leq 0,01$ ) broj ovih ćelija nego iz kičmene moždine starih AO pacova (Slika 6).

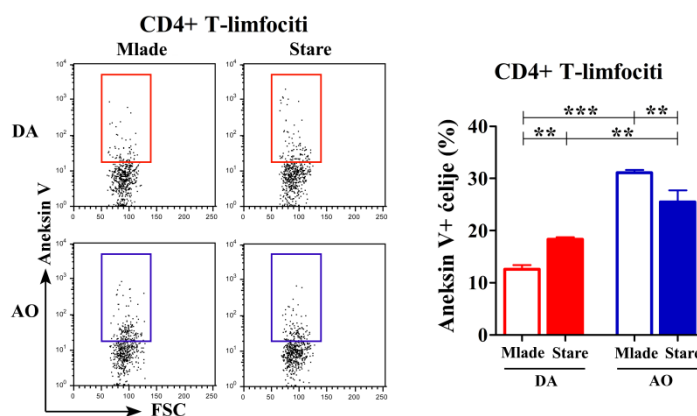


**Slika 6. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u okviru Foxp3-CD4+ ćelija i ukupan broj CD25+Foxp3-CD4+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (levo) prikazuju CD4 vs Foxp3 imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija kičmene moždine (Foxp3-CD4+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), i (desno) bojenje CD25+ ćelija u subsetu Foxp3-CD4+ ćelija kičmene moždine (CD25+ ćelije uokvirene su na svakom profilu). Histogrami prikazuju (gornji) procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu Foxp3-CD4+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih mladih i starih DA i AO pacova i (donji) ukupan broj CD25+Foxp3-CD4+ ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu Foxp3-CD4+ ćelija kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova [ $F_{(1,20)}=25,36$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj CD25+ Foxp3-CD4+ ćelija u njihovim kičmenim moždinama [ $F_{(1,20)}=95,97$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.2.3. Uzasne i sojne razlike u zastupljenosti apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a

U skladu sa većim brojem CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine mladih DA pacova nego mladih AO pacova, bio je manji ( $p \leq 0,001$ ) procenat apoptotičnih aneksin V+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita mladih DA u odnosu na mlade AO pacove (Slika 7). Starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,01$ ) zastupljenosti apoptotičnih ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita DA pacova,

odnosno, do smanjenja ( $p \leq 0,01$ ) njihove zastupljenosti kod AO pacova (Slika 7). U skladu sa većim brojem CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih DA pacova u odnosu na stare AO pacove, nađen je manji ( $p \leq 0,01$ ) procenat apoptotičnih aneksin V+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa starim AO pacovima (Slika 7).



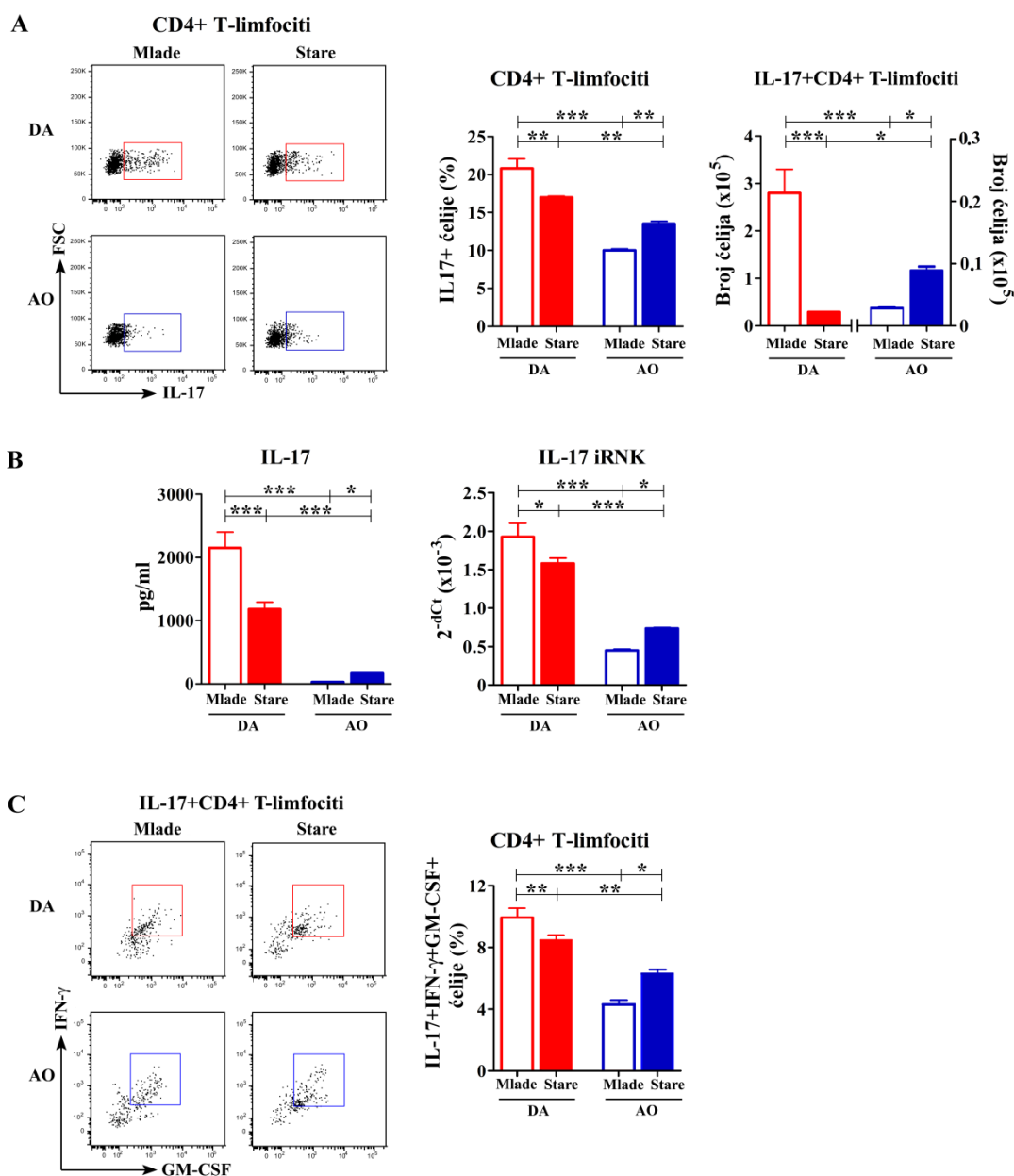
**Slika 7. Uticaj starenja na zastupljenost apoptotičnih (Aneksin V+) ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (levo) prikazuju imunocitohemijsko bojenje fluorescentnom bojom obeleženim aneksinom V CD4+ T-limfocita (koji su izdvojeni – “gejtovani” kao što je ilustrirano na slici 4). Aneksin V+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost Aneksin V+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost Aneksin V+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita [ $F_{(1,20)}=21,43$   $p \leq 0,001$ ]. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.2.4. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 u CD4+ T-limfocitima DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a

U razvoju EAE-a indukovanoj mijelinskim antigenima emulgovanim u KFA dominantnu ulogu ima IL-17 (Komiyama i sar., 2006; Damsker i sar., 2010), pri čemu CD4+ T-limfociti predstavljaju glavni izvor ovog citokina (Komiyama i sar., 2006). Imajući ove podatke u vidu, ispitana je zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita i njihov ukupni broj u kičmenoj moždini imunizovanih pacova u efektorskoj fazi EAE-a.

Procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima ( $p \leq 0,01$ ), kao i njihov ukupni broj ( $p \leq 0,001$ ), bili su značajno veći u kičmenoj moždini mladih DA

pacova nego u kičmenoj moždini mladih AO pacova (Slika 8A). Starenje je uticalo na smanjenje kako procentualne zastupljenosti ( $p \leq 0,01$ ) tako i ukupnog broja ( $p \leq 0,001$ ) IL-17+ CD4+ T-limfocita kod DA pacova, dok je kod AO pacova dovelo do povećanja i procenta ( $p \leq 0,01$ ) i ukupnog broja ( $p \leq 0,05$ ) ovih ćelija (Slika 8A). Ipak, procenat IL-17+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita ( $p \leq 0,01$ ), kao i ukupan broj IL-17+CD4+ T-limfocita ( $p \leq 0,05$ ), bio je veći kod starih DA pacova u poređenju sa starim AO pacovima (Slika 8A).



**Slika 8. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a. (Panel A)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje IL-17+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita kičmene moždine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IL-17+ ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima kičmene moždine imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj IL17+CD4+ T-limfocita izolovan iz kičmene moždine ispitivanih životinja. **(Panel B)** Histogrami prikazuju (levo) koncentraciju IL-17 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA i AO pacova restimuliranih 4h PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode) i (desno) ekspresiju iRNK za IL-17 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. **(Panel C)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ u IL-17+CD4+ T-limfocitima. IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. CD4+ T-limfociti su izdvojeni iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova metodom magnetnog izdvajanja (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode), a IL17+CD4+ T-limfociti su izdvojeni – “gejtovani” kao što je ilustrovano na panelu A. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova, a koja je izračunata na osnovu podataka o procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima, kao i o procentualnoj zastupljenosti IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u IL-17+CD4+ T-limfocitima. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima [ $F_{(1,20)}=30,08$ ;  $p\leq 0,001$ ] i za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=26,4$ ;  $p\leq 0,001$ ] u kičmenoj moždini imunizovanih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Rezultati ekspresije iRNK za IL-17 izraženi su kao  $2^{-dCt}$  vrednosti [ $n=6$ /grupa (mlade) i  $n=9$ /grupa (stare)]. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima [ $F_{(1,20)}=30,08$ ;  $p\leq 0,001$ ], ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=26,4$ ;  $p\leq 0,001$ ] u kičmenoj moždini imunizovanih životinja, koncentraciju IL-17 [ $F_{(1,20)}=16,34$ ;  $p\leq 0,001$ ] u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova, ekspresiju iRNK za IL-17 [ $F_{(1,26)}=13,84$ ;  $p\leq 0,001$ ] u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova i procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija [ $F_{(1,20)}=30,08$ ;  $p\leq 0,001$ ] u CD4+ T-limfocitima kičmene moždine imunizovanih pacova. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Pored analize procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T limfocita, ispitana je i koncentracija ovog citokina u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova i restimuliranih PMA-om i jonomicinom. Uzasne i sojne razlike u koncentraciji IL-17A u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova i restimuliranih PMA-om i jonomicinom korespondirale su sa procentualnom zastupljenošću IL-17+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T limfocita. Naime, veća ( $p\leq 0,001$ ) koncentracija IL-17A izmerena je u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 8B). Starenje je dovelo do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) koncentracije IL17A u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA pacova (Slika 8B). S druge strane, starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,05$ ) koncentracije ovog citokina u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine AO pacova (Slika 8B).

Međutim, veća ( $p \leq 0,001$ ) koncentracija IL17A izmerena je u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa kulturama ovih ćelija starih AO pacova (Slika 8B).

Ispitana je i ekspresija iRNK za IL-17A u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova u efektorskoj fazi. Ekspresija iRNK za IL-17A bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 8B). Starenjem se kod DA pacova smanjivala ( $p \leq 0,05$ ) ekspresija iRNK za IL-17A u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, dok je kod AO pacova ekspresija iRNK za ovaj citokin rasla ( $p \leq 0,05$ ) u ovim ćelijama (Slika 8B). Ipak, ekspresija iRNK za IL-17A bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA nego starih AO pacova (Slika 8B).

Imajući u vidu podatke koji ukazuju na to da: 1) CD4+IL-17+ T-limfociti pokazuju visok stepen plastičnosti, tj. imaju sposobnost da diferenciraju u subsetove ćelija različitih fenotipskih odlika i patogenog kapaciteta (McGeachy i sar., 2007; Kaufmann i sar., 2012; Zielinski i sar., 2012); 2) kod miša i čoveka CD4+IL-17+ T-limfociti koji koeksprimiraju IFN- $\gamma$  i GM-CSF imaju najveći patogeni kapacitet (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011; Sheng i sar., 2014; McWilliams i sar., 2015) ispitana je procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u IL-17+CD4+ T-limfocitima. Na osnovu podataka o procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima, kao i o procentualnoj zastupljenosti IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u IL-17+CD4+ T-limfocitima, izračunata je procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima. Kod mladih DA pacova nađena je veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 8C). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,01$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u CD4+ T-limfocitima DA pacova ( $p \leq 0,01$ ). Nasuprot tome, starenjem se povećavala ( $p \leq 0,05$ ) procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima AO pacova (Slika 8C). Međutim, bez obzira na suprotan uticaj starenja na procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T limfocita, njihova procentualna zastupljenost je ostala veća ( $p \leq 0,01$ ) kod starih DA pacova u poređenju sa starim AO pacovima (Slika 8C).



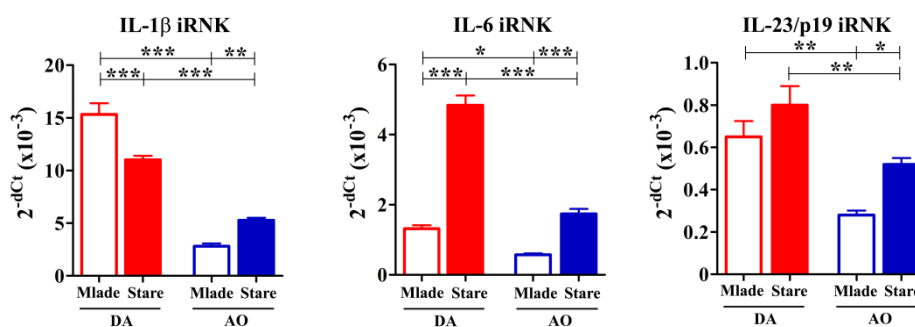
---

U narednom koraku ispitana je ekspresija iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-6, kao i za IL-23/p19, citokine koji obezbeđuju usmeravanje diferencijacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita u Th17 ćelije, njihovo preživljavanje, umnožavanje i sticanje patogenog potencijala, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine (Ghoreschi i sar., 2010; McGeachy i sar., 2007; Zhou i sar., 2009).

Ekspresija iRNK za IL-1 $\beta$  u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u odgovarajućim ćelijama mladih AO pacova (Slika 9). Kod DA pacova starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$ , a kod AO pacova do njenog povećanja ( $p \leq 0,01$ ) (Slika 9). Međutim, ekspresija iRNK za IL-1 $\beta$  bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova u odnosu na ekspresiju iRNK za ovaj citokin u odgovarajućim ćelijama starih AO pacova (Slika 9).

Kod mladih pacova utvrđena je veća ( $p \leq 0,05$ ) ekspresija iRNK za IL-6 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA nego AO pacova (Slika 9). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije iRNK za IL-6 u ovim ćelijama kod pacova oba soja. U mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova ekspresija iRNK za IL-6 bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u ovim ćelijama starih AO pacova (Slika 9).

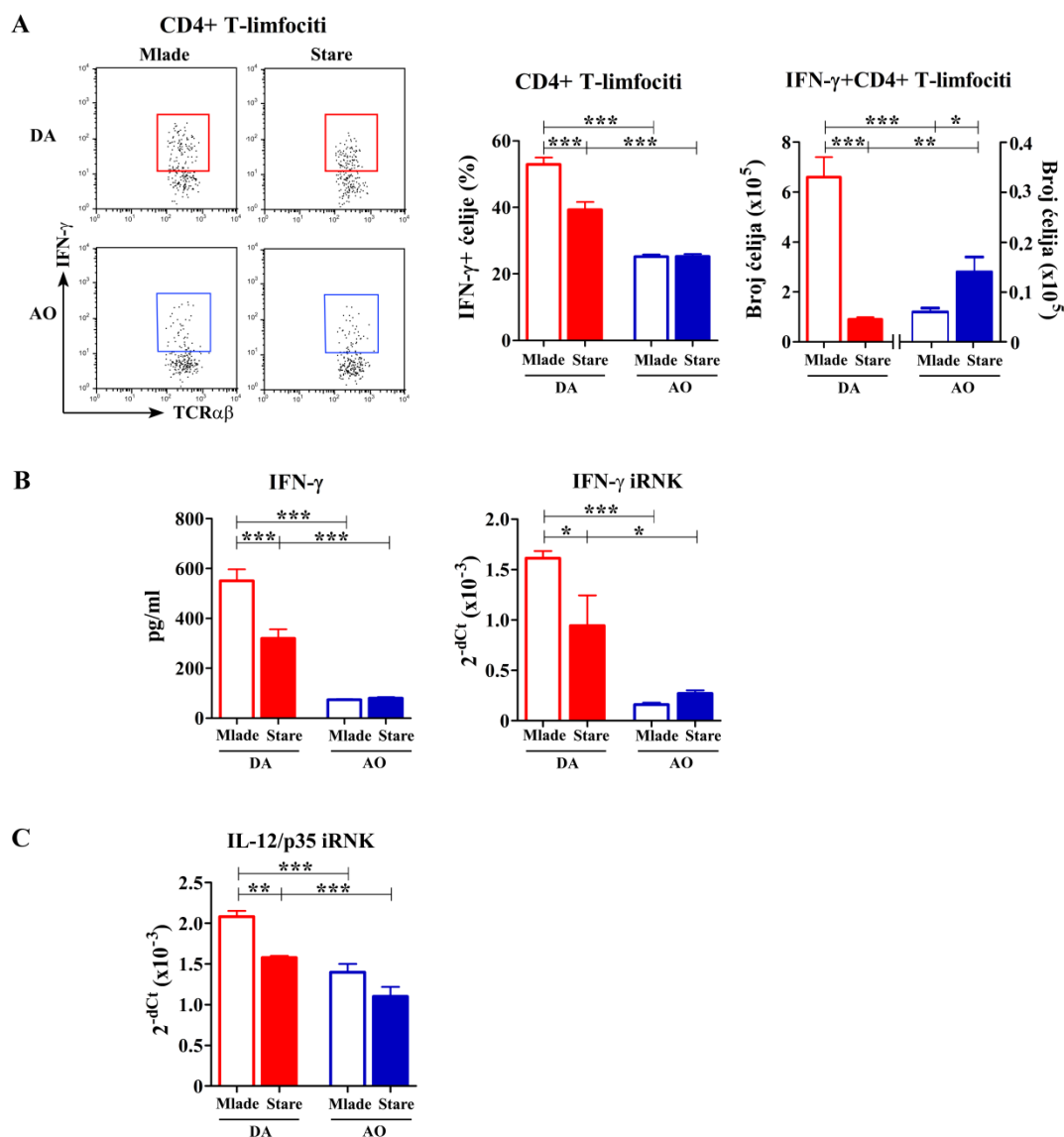
Ispitivanje ekspresije iRNK za IL-23/p19 u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova u efektorskoj fazi pokazalo je kod mladih pacova veću ( $p \leq 0,01$ ) ekspresiju iRNK za ovaj citokin kod DA pacova u poređenju sa AO pacovima (Slika 9). Ekspresija iRNK za ovaj citokin u izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova se starenjem nije menjala, dok je u ovim ćelijama AO pacova rasla ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 9). Sledstveno, ekspresija iRNK za IL-23/p19 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,01$ ) u odnosu na onu u ovim ćelijama starih AO pacova (Slika 9).



**Slika 9. Ekspresija iRNK za citokine značajne za polarizaciju Th17 ćelija u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Histogrami prikazuju redom (s leva na desno) ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-6 i IL-23/p19 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. Rezultati su izraženi kao 2<sup>-dCt</sup> vrednosti [n=6/grupa (mlade) i n=9/grupa (stare)]. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  [ $F_{(1,26)}=41,2$ ;  $p\leq 0,001$ ] i IL-6 [ $F_{(1,26)}=34,05$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

#### 4.2.2.5. Uticaj starenja na ekspresiju IFN- $\gamma$ u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a

Iako je pokazano da IFN- $\gamma$  nije neophodan za razvoj EAE-a (Ferber i sar., 1996), brojni podaci ukazuju na značaj ovog citokina u razvoju EAE-a (Merrill i sar., 1992; Olsson, 1992; Sanvito i sar., 2010). Imajući ovo u vidu ispitana je zastupljenost IFN- $\gamma$ +ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita. U subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$  + ćelija bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 10A). Takođe, broj IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine mladih DA pacova bio je značajno veći ( $p\leq 0,001$ ) u poređenju sa onim izolovanim iz kičmene moždine mladih AO pacova (Slika 10A). Kod DA pacova starenje je uticalo na smanjenje ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita, kao i njihovog ukupnog broja, u kičmenoj moždini (Slika 10A). Za razliku od DA pacova, kod AO pacova starenje nije dovelo do promene u procentualnoj zastupljenosti ovih ćelija, ali jeste do povećanja ( $p\leq 0,05$ ) njihovog ukupnog broja u kičmenoj moždini (Slika 10A). Međutim, veća ( $p\leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita, kao i veći ( $p\leq 0,01$ ) broj IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T-limfocita nađen je kod starih DA pacova u odnosu na stare AO pacove (Slika 10A).



**Slika 10. Uticaj starenja na ekspresiju IFN- $\gamma$  u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a. (Panel A)** Reprerentativni protočnocytofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD4+ T-limfocita kičmene moždine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IFN- $\gamma$ + ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD4+ T-limfocitima kičmene moždine imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita izolovan iz kičmene moždine ispitivanih životinja. **(Panel B)** Histogrami prikazuju (levo) koncentraciju IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA i AO pacova restimulisanih 4h PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode) i (desno) ekspresiju iRNK za IFN- $\gamma$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. **(Panel C)** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za IL12/p35, citokina značajnog za diferencijaciju Th1 ćelija, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Rezultati ekspresije iRNK za IFN- $\gamma$  i IL12/p35 izraženi su kao  $2^{-\Delta Ct}$  vrednosti [ $n=6$ /grupa (mlade) i  $n=9$ /grupa (stare)]. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$  + ćelija u CD4+ T-limfocitima [ $F_{(1,20)}=17,27$ ;  $p\leq 0,001$ ], ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=51,47$ ;  $p\leq 0,001$ ] u kičmenoj moždini imunizovanih životinja, koncentraciju IFN- $\gamma$  [ $F_{(1,20)}=15,75$ ;  $p\leq 0,001$ ] u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova, ekspresiju iRNK

---

za IFN- $\gamma$  [ $F_{(1,26)}=4,25$ ;  $p\leq 0,05$ ] u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

U skladu sa imunofenotipskom analizom, koncentracija IFN- $\gamma$  bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine restimuliranih PMA-om i jonomicinom mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 10B). Koncentracija IFN- $\gamma$  bila je manja ( $p\leq 0,001$ ) u supernatantima kultura ćelija starih DA pacova u poređenju sa koncentracijom ovog citokina u supernatantima ćelijskih kultura mladih pacova istog soja (Slika 10B). Za razliku od DA pacova, starenje nije uticalo na koncentraciju IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine AO pacova (Slika 10B). U supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih DA pacova izmerena je veća ( $p\leq 0,001$ ) koncentracija IFN- $\gamma$  nego u odgovarajućim supernatantima starih AO pacova (Slika 10B).

Konzistentno rezultatima dobijenim imunofenotipskim analizama i ispitivanjem koncentracije IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine restimuliranih PMA-om i jonomicinom, ekspresija iRNK za IFN- $\gamma$  bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih DA pacova u odnosu na AO pacove ovog uzrasta (Slika 10B). Starenje je dovelo do povećanja ( $p\leq 0,05$ ) ekspresije iRNK za IFN- $\gamma$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA pacova, ali nije imalo uticaja na ekspresiju iRNK za ovaj citokin u ovim ćelijama AO pacova (Slika 10B). Ekspresija iRNK za IFN- $\gamma$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova bila je veća ( $p\leq 0,05$ ) nego u ovim ćelijama starih AO pacova (Slika 10B).

S obzirom na to da je pokazano da je IL-12 od esencijalnog značaja za diferencijaciju Th1 ćelija (Prochazkova i sar., 2012), ispitana je i ekspresija iRNK za IL12/p35 u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Rezultati koji su dobijeni korelirali su sa analizom procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita (Slika 10C). Ekspresija iRNK za IL12/p35 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih DA pacova bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u odnosu na onu u ovim ćelijama mladih AO pacova (Slika 10C). Starenje je dovelo do smanjenja ( $p\leq 0,01$ ) ekspresije iRNK za ovaj citokin u mononuklearnim ćelijama

---

kičmene moždine DA pacova, ali nije imalo uticaja na njegovu ekspresiju u ovim ćelijama AO pacova (Slika 10C). Mononuklearne ćelije kičmene moždine starih DA pacova pokazivale su ushodnu regulaciju ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije iRNK za IL12/p35 u poređenju sa ovim ćelijama starih AO pacova (Slika 10C).

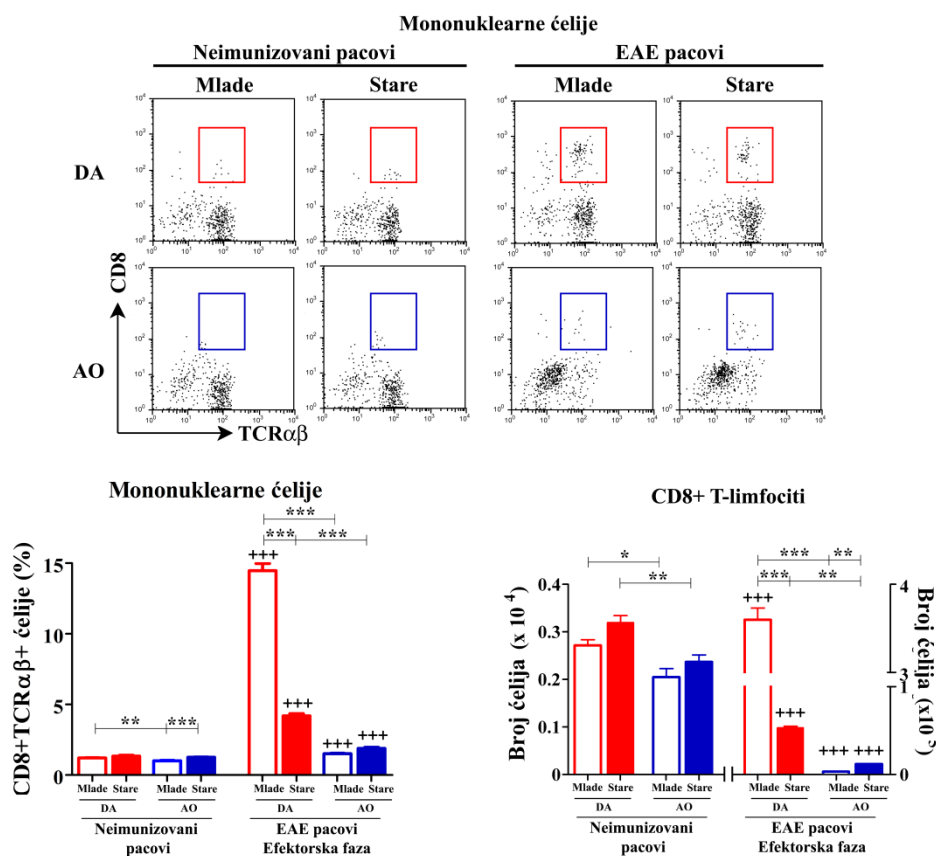
#### 4.2.3. Sojne razlike u uticaju starenja na fenotipske i funkcijske karakteristika CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a

S obzirom na to da je pokazano da, osim CD4+ T-limfocita, oštećenju CNS-a u EAE-u doprinose i CD8 T-limfociti (Sobottka i sar., 2009; Huber i sar., 2015; Ritzel i sar., 2016), ispitali smo i procentualnu zastupljenost CD8+ T limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine, kao i njihov ukupni broj.

Kod mladih pacova utvrđena je veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CD8+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova u odnosu na AO pacove (Slika 11). Takođe, i broj ovih ćelija bio je značajno veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod mladih AO pacova (Slika 11). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) kako procentualne zastupljenosti, tako i ukupnog broja CD8+ T-limfocita kod DA pacova (Slika 11). S druge strane, kod AO pacova starenje nije uticalo na procentualnu zastupljenost CD8+ T-limfocita, ali je ukupni broj ovih ćelija bio veći ( $p \leq 0,01$ ) kod starih AO pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 11). Međutim, procentualna zastupljenost CD8+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija kičmene moždine ( $p \leq 0,001$ ), kao i ukupan broj ovih ćelija u mononuklearnom infiltratu ( $p \leq 0,01$ ) bio je veći kod starih DA pacova u poređenju sa AO pacovima istog uzrasta (Slika 11).

Procentualna zastupljenost CD8+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine, kao i njihov ukupni broj kod imunizovanih pacova bili su veći ( $p \leq 0,001$ ) nego kod neimunizovanih pacova istog soja i uzrasta (Slika 11). Kod mladih neimunizovanih pacova procentualna zastupljenost CD8+ T-limfocita u mononuklearnom infiltratu ( $p \leq 0,01$ ), kao i ukupan broj ovih ćelija ( $p \leq 0,05$ ) bili su veći kod DA nego kod AO pacova (Slika 11). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti CD8+ T-limfocita u mononuklearnom infiltratu kod neimunizovanih AO pacova, dok kod neimunizovanih DA pacova starenje nije uticalo

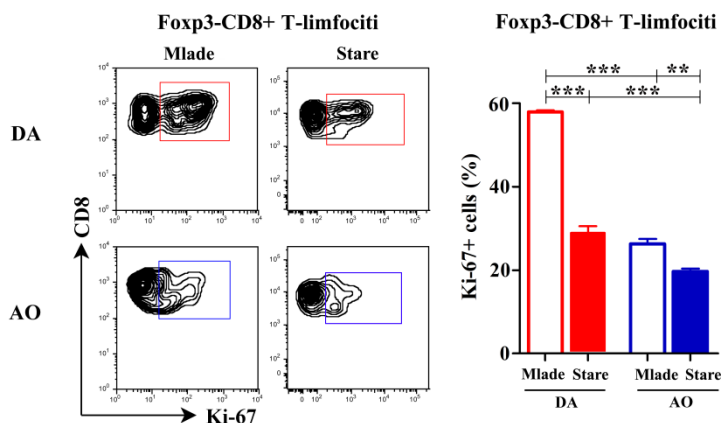
na procentualnu zastupljenost ovih ćelija (Slika 11). Starenjem se nije značajno menjao broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita u mononuklearnom infiltratu izolovanom iz kičmene moždine ni DA ni AO pacova (Slika 11). Procentualna zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita nije se razlikovala u mononuklearnom infiltratu neimunizovanih starih DA i AO pacova (Slika 11). Međutim, manje ( $p \leq 0,01$ ) CD8<sup>+</sup> T-limfocita je izolovano iz kičmene moždine AO nego DA pacova (Slika 11).



**Slika 11. Uticaj starenja na zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD8 vs TCRαβ imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija kičmene moždine (CD8+TCRαβ<sup>+</sup> ćelije su uokvirene na svakom profilu). Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine neimunizovanih i imunizovanih pacova i (desno) ukupan broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine neimunizovanih i imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=382,6$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=107,5$ ;  $p \leq 0,001$ ] u kičmenoj moždini imunizovanih životinja. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . + EAE pacovi vs neimunizovani pacovi odgovarajućeg uzrasta i soja; +++  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.3.1. Uzasne i sojne razlike u proliferaciji CD8+ T limfocita izolovanih iz kičmene moždine

Imajući u vidu da je aktivacija i klonska ekspanzija antigen-specifičnih CD8+ T-ćelija neophodna za njihovu funkciju (Curtsinger i sar., 2003), u subpopulaciji konvencionalnih Foxp3-CD8+ T-limfocita analizirana je zastupljenost ćelija koje ispoljavaju Ki-67. Ki-67 je nuklearni protein koji ispoljavaju ćelije tokom svih faza procesa deobe, ali ne i u stanju mirovanja (Soares i sar. 2010). Nađeno je da je procentualna zastupljenost Ki67+ ćelija u okviru subpopulacije konvencionalnih Foxp3-CD8+ T-limfocita mladih DA pacova bila veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u okviru ove subpopulacije ćelija mladih AO pacova (Slika 12). Starenjem se smanjivala zastupljenosti Ki-67+ ćelija u okviru subpopulacije konvencionalnih Foxp3-CD8+ T-limfocita i DA ( $p \leq 0,001$ ) i AO ( $p \leq 0,01$ ) pacova (Slika 12). Međutim, procenat ovih ćelija ostao je veći ( $p \leq 0,001$ ) u okviru Foxp3-CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa onim nađenim u subpopulaciji ovih ćelija izovanih iz kičmene moždine AO pacova (Slika 12).



**Slika 12. Uticaj starenja na proliferaciju CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju bojenje Ki-67+ ćelija u subsetu Foxp3-CD8+ ćelija kičmene moždine. Ki-67+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost Ki67+ ćelija u okviru Foxp3-CD8+ T-limfocita u kičmenoj moždini imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost Ki67+ ćelija u okviru Foxp3-CD8+ T-limfocita [ $F_{(1,20)}=107.5$ ;  $p \leq 0,001$ ] imunizovanih pacova. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.3.2. Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine

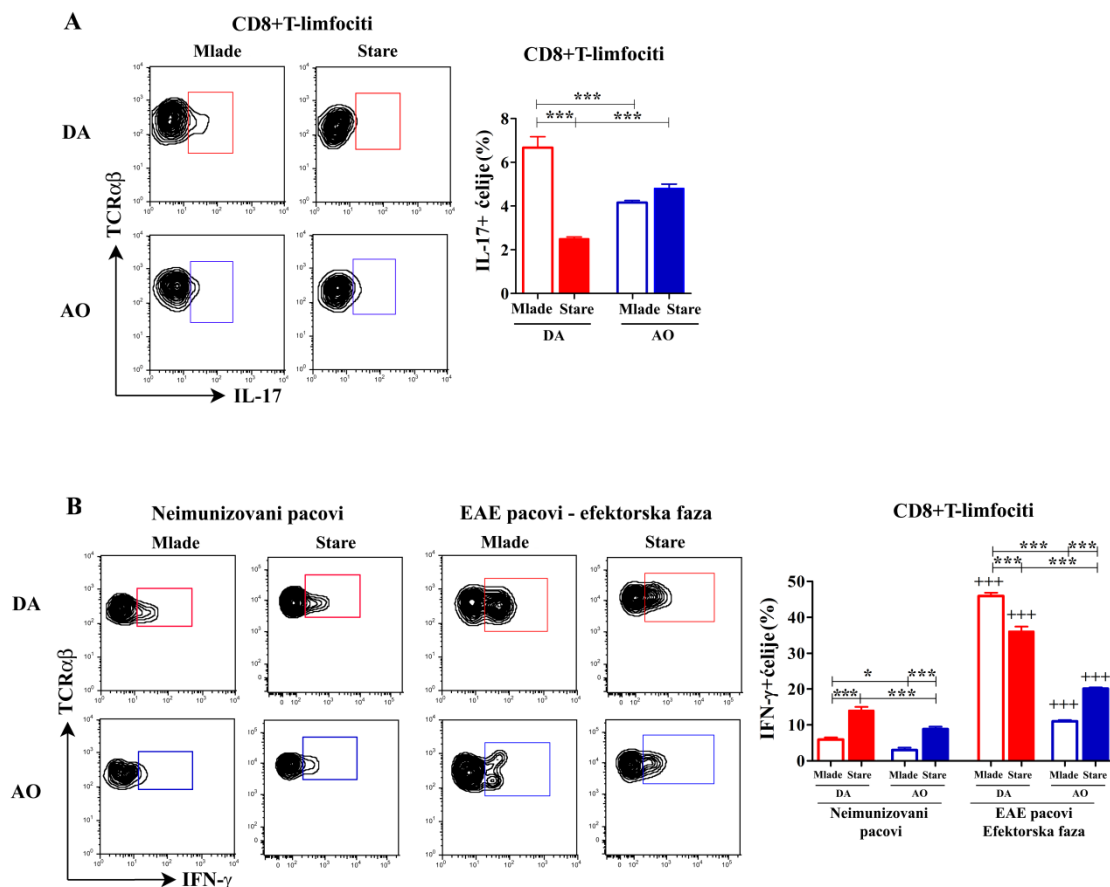
Imajući u vidu podatke koji ukazuju da bi ulogu u imunopatogenezi, ne samo humane bolesti, već i EAE-a mogli imati CD8+ T-limfociti koji sintetišu IFN- $\gamma$  i IL-17 (Ifergan i sar., 2011; Srenathan i sar., 2016), analizirana je procentualna zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-ćelija sveže izolovanih iz kičmene moždine pacova oba soja i uzrasta.

Zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih imunizovanih DA pacova nego kod mladih imunizovanih AO pacova (Slika 13A). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija kod imunizovanih DA pacova, ali ne i na njihovu zastupljenost kod imunizovanih AO pacova (Slika 13A). Sledstveno, veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija je nađena kod imunizovanih starih AO u poređenju sa imunizovanim starim DA pacovima (Slika 13A). Kod mladih neimunizovanih pacova procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita bila je jako niska tj. ispod 0,3%, dok ove ćelije nisu detektovane kod neimunizovanih starih pacova.

Zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja bila je značajno veća ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 13B). Starenje je imalo suprotan uticaj na procentualnu zastupljenost ovih ćelija u subpopulaciji CD8+ T-ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova. Naime, starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD8+ T-ćelija DA pacova, a povećalo ( $p \leq 0,001$ ) njihovu procentualnu zastupljenost u ovoj subpopulaciji ćelija AO pacova (Slika 13B). Međutim, procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-limfocita ostala je značajno veća ( $p \leq 0,001$ ) kod starih DA pacova u odnosu na njihovu zastupljenost u ovoj subpopulaciji ćelija starih AO pacova (Slika 13B). Kod imunizovanih pacova procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine bila je veća nego kod sojno i uzrasno odgovarajućih neimunizovanih pacova (Slika 13B). Veća ( $p \leq 0,05$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija detektovana je kod



neimunizovanih mladih DA pacova nego kod neimunizovanih mladih AO pacova (Slika 13B). Starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima kako kod DA, tako i kod AO pacova (Slika 13B). Kod starih neimunizovanih pacova veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija nađena je kod DA pacova (Slika 13B).



**Slika 13. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 i IFN- $\gamma$  u CD8+ T-limfocitima izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a. (Panel A)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru CD8+ T-limfocita kičmene moždine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IL-17+ ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine imunizovanih pacova. **(Panel B)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD8+ T-limfocita kičmene moždine mladih i starih neimunizovanih (levo) i imunizovanih (desno) DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IFN- $\gamma$ + ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine neimunizovanih i imunizovanih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija [ $F_{(1,20)}=79.53$ ;  $p \leq 0.001$ ] i IFN- $\gamma$ + ćelija [ $F_{(1,20)}=130.4$ ;  $p \leq 0.001$ ] u

---

okviru CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . + EAE pacovi vs neimunizovani pacovi odgovarajućeg uzrasta i soja; +++  $p \leq 0,001$ .

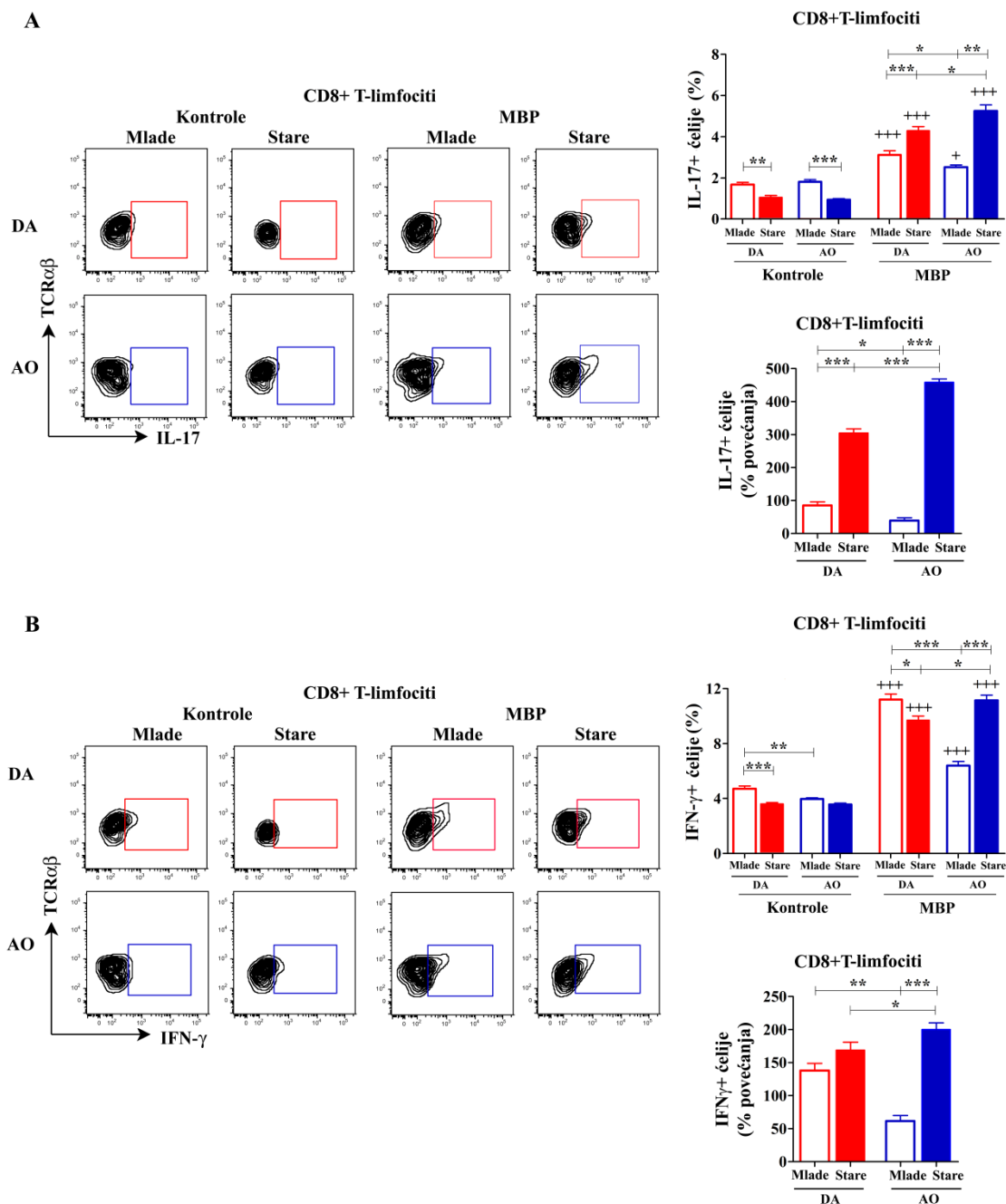
Sledeći zadatak bio je da se ispita antigenska specifičnost CD8+ T-limfocita izolovanih iz CNS-a. Kako bi se ostvario ovaj zadatak ispitana je promena procentualne zastupljenosti i IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u kulturama mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine i stimulisanih mijelin baznim proteinom (MBP+ kulture) u odnosu na kontrolne kulture, u koje nije dodavan ovaj protein (MBP- kulture). Najpre je određena procentualna zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama i kontrolnim kulturama mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova. U kontrolnim kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih pacova nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita (Slika 14A). Starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,01$ ) procentualne zastupljenosti IL17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima u kontrolnim kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine kod pacova oba soja (Slika 14A). Posledično, nije bilo razlike u zastupljenosti ovih ćelija u CD8+ T-limfocitima u odgovarajućim kulturama starih pacova (Slika 14A). Procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine bila je veća ( $p \leq 0,05$  za kulture mononuklearnih ćelija kičmene moždine AO mladih i  $p \leq 0,001$  za kulture mononuklearnih ćelija kičmene moždine pacova ostalih eksperimentalnih grupa) nego u odgovarajućim kontrolnim kulturama (Slika 14A). Veća ( $p \leq 0,05$ ) zastupljenost IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima bila je u MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih DA pacova nego u odgovarajućim kulturama mladih AO pacova (Slika 14A). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,01$ ) procentualne zastupljenosti IL17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine pacova oba soja (Slika 14A). U MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih DA pacova utvrđena je manja ( $p \leq 0,05$ ) procentualna zastupljenost IL17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima nego u odgovarajućim kulturama starih AO pacova (Slika 14A). Procentualno povećanje zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine mladih DA pacova bilo je veće ( $p \leq 0,05$ ) nego u kulturama ovih ćelija mladih AO pacova (Slika 14A). Više izraženo ( $p \leq 0,001$ )

---

procentualno povećanje zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima bilo je u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine starih pacova nego u kulturama ovih ćelija mladih pacova oba soja (Slika 14A). U MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine starih DA pacova utvrđeno je manje procentualno povećanje IL-17+ ćelija u CD8+ T-limfocitima nego u odgovarajućim kulturama starih AO pacova (Slika 14A).

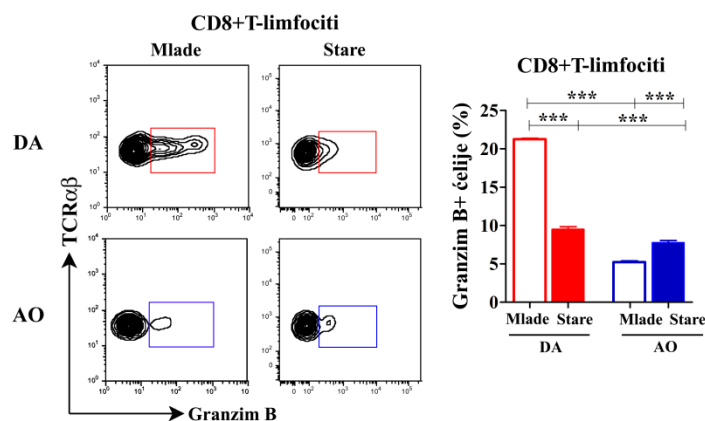
Procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima bila je veća ( $p \leq 0,05$ ) u kontrolnim kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih DA nego mladih AO pacova (Slika 14B). U kontrolnim kulturama ćelija kičmene moždine starih DA pacova bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima nego u odgovarajućim kulturama mladih DA pacova, dok u kontrolnim kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih i mladih AO pacova nije bilo promene u zastupljenosti ovih ćelija (Slika 14B). Nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u kontrolnim kulturama starih pacova (Slika 14B). Procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u odgovarajućim kontrolnim kulturama (Slika 14B). U MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima nego u odgovarajućim kulturama mladih AO pacova (Slika 14B). Starenje je uticalo na promenu u zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u suprotnom smeru u MBP+ kulturama DA i AO pacova. Kod DA pacova starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,05$ ) zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama, dok je kod AO pacova starenje dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenosti ovih ćelija u odgovarajućim kulturama (Slika 14B). Posledično, manja procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima utvrđena je u MBP+ kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih DA pacova nego u odgovarajućim kulturama starih AO pacova (Slika 14B). Procentualno povećanje IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima bilo je izraženije ( $p \leq 0,01$ ) u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine mladih DA pacova u odnosu na ono utvrđeno u odgovarajućim kulturama mladih AO pacova (Slika 14B). Starenje nije dovelo do promene u procentualnom povećanju zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine DA pacova (Slika 14B). Procentualno povećanje zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima

u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine starih AO pacova bilo je izraženije ( $p \leq 0,001$ ) nego u MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine mladih AO pacova (Slika 14B). U MBP+ kulturama ćelija kičmene moždine starih pacova utvrđeno je izraženije ( $p \leq 0,05$ ) procentualno povećanje  $\text{IFN-}\gamma^+$  ćelija u  $\text{CD8}^+$  T-limfocitima u kulturama starih AO pacova nego u odgovarajućim kulturama starih DA pacova (Slika 14B).



**Slika 14. Uticaj starenja na zastupljenost MBP specifičnih CD8+ T-limfocita u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje (**Panel A**) IL-17 i (**Panel B**) IFN- $\gamma$  u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine kultiviranih preko noći (levo) bez MBP-a (kontrolne) i (desno) sa MBP-om (MBP+ kulture) (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). Histogrami prikazuju (gornji) procentualnu zastupljenost (**Panel A**) IL-17+ ćelija i (**Panel B**) IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine u kontrolnim i MBP+ kulturama i (donji) (**Panel A**) procenat povećanja zastupljenosti IL-17+ i (**Panel B**) IFN- $\gamma$ + ćelija u MBP+ kulturama u odnosu na zastupljenost ovih ćelija u kontrolnim kulturama. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u MBP+ kulturama [ $F_{(1,8)}=13.26$ ;  $p\leq 0.01$ ] i IFN- $\gamma$ + ćelija u kontrolnim [ $F_{(1,8)}=7.613$ ;  $p\leq 0.05$ ] i MBP+ kulturama [ $F_{(1,8)}=13.26$ ;  $p\leq 0.01$ ], kao i za procenat povećanja zastupljenosti IL-17+ [ $F_{(1,8)}=91.7$ ;  $p\leq 0.001$ ] i IFN- $\gamma$ + [ $F_{(1,8)}=25.67$ ;  $p\leq 0.001$ ] ćelija u CD8+ T-limfocitima u MBP+ kulturama u odnosu na kontrolne kulture. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ . + MBP+ kulture vs kontrolne kulture; +  $p\leq 0.05$ ; +++  $p\leq 0.001$ .

Imajući u vidu da CD8+ T-limfociti koji sintetišu IFN- $\gamma$  mogu da produkuju i granzime i perforin (Vukmanovic-Stejic i sar., 2000), i tako doprinesu razvoju lezija CNS-a u EAE-u, analizirana je procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu granzim B (granzim B+) u subpopulaciji CD8+ T-limfocita. Nađena je veća ( $p\leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija kod mladih DA u odnosu na mlade AO pacove (Slika 15). Starenjem je došlo do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita DA pacova, a povećanja njihove procentualne zastupljenosti ( $p\leq 0,001$ ) u ovoj subpopulaciji T-limfocita AO pacova (Slika 15). Međutim, procentualna zastupljenost ovih ćelija je ipak ostala veća ( $p\leq 0,001$ ) u subpopulaciji CD8+ T-limfocita starih DA pacova nego u ovoj subpopulaciji starih AO pacova (Slika 15).



**Slika 15. Uticaj starenja na zastupljenost granzim B+ ćelija u CD8+ T-limfocitima izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju granzim B vs TCR $\alpha\beta$  imunocitohemijsko bojenje CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova. Granzim B+TCR $\alpha\beta$ + ćelije su

uokvirene na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost granzim B+ ćelija u CD8+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost granzim B+ ćelija [ $F_{(1,20)}=798.6$ ;  $p \leq 0.001$ ] u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

4.2.4. Uticaj starenja na zastupljenost i funkcijske karakteristike subpopulacija limfocita sa protektivnim ulogom u patogenezi EAE u kičmenoj moždini DA i AO pacova izolovanih u efektorskoj fazi bolesti

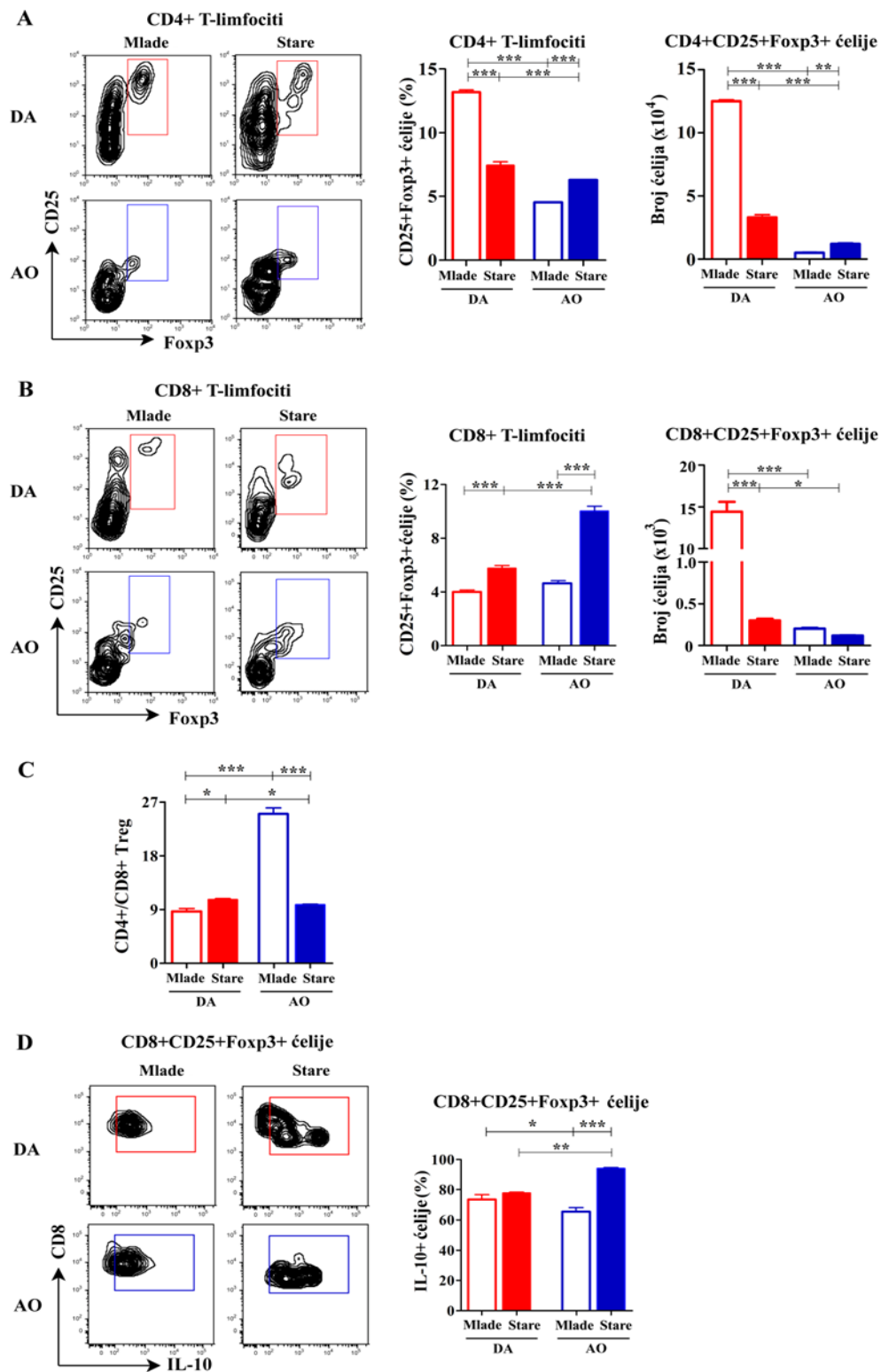
U sledećem koraku ispitivana je zastupljenost limfocita sa protektivnom ulogom – CD25+Foxp3+T-ćelija i NK ćelija u imunopatogenezi EAE-a u kičmenoj moždini mladih i starih pacova DA i AO soja.

#### 4.2.4.1. Uticaj starenja na zastupljenost T-limfocita regulatornog CD25+Foxp3+ fenotipa u kičmenoj moždini DA i AO pacova

Marker kako prirodnih, tako i inducibilnih regulatornih T-ćelija kod pacova jeste transkripcioni faktor Foxp3 (Fontenot i sar., 2005). Imajući u vidu da je pokazana akumulacija Foxp3+ ćelija u kičmenoj moždini pacova, kod kojih je indukovana akutni monofazni oblik EAE-a (Almolda i sar., 2011), kao i značaj njihove funkcije u razvoju EAE-a (McGeachy i sar., 2005), ispitana je zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocita. Takođe, s obzirom na to da je ukazano i na značaj CD8+CD25+Foxp3+ T-limfocita za razvoj bolesti i težinu kliničke slike EAE-a (Sinha i sar., 2014), određena je i njihova zastupljenost u kičmenoj moždini DA i AO pacova.

U mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE-a, ispitana je procentualna zastupljenost ćelija regulatornog CD25+Foxp3+ fenotipa u subpopulaciji CD4+ T-limfocita sveže izolovanih iz kičmene moždine pacova DA i AO soja, kao i njihov broj. Kod mladih pacova veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija bila je u ovoj subpopulaciji DA pacova u odnosu na AO pacove (Slika 16A). Starenje je imalo suprotan efekat na zastupljenost ovih ćelija kod DA i AO pacova. Starenjem je došlo do smanjenja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita DA pacova, a povećanja ( $p \leq 0,001$ ) u ovoj subpopulaciji AO pacova (Slika 16A). Bez obzira na suprotan smer promena u procentualnoj zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD4+

T-limfocita DA i AO pacova, njihova zastupljenost je ostala veća ( $p \leq 0,001$ ) u ovoj subpopulaciji starih DA pacova (Slika 16A).



**Slika 16. Uticaj starenja na zastupljenost CD4+ i CD8+ Treg limfocita i njihov međusobni odnos u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju (**Panel A**) CD25 vs Foxp3 imunocitohemijsko bojenje CD4+ T-limfocita kičmene moždine (CD25+Foxp3+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), (**Panel B**) CD25 vs Foxp3 imunocitohemijsko bojenje CD8+ T-limfocita kičmene moždine (CD25+Foxp3+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), i (**Panel D**) imunocitohemijsko bojenje IL-10+ ćelija u okviru CD8+CD25+Foxp3+ ćelija kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova (IL10+ ćelije su uokvirene na svakom profilu). Histogrami prikazuju (**Panel A**) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita (levo) i ukupan broj CD4+CD25+Foxp3+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja (desno), (**Panel B**) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD8+ T-limfocita (levo) i ukupan broj CD8+CD25+Foxp3+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja (desno), (**Panel C**) količnik broja CD4+ i CD8+ Treg i (**Panel D**) procentualnu zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru CD8+ CD25+Foxp3+ ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ [ $F_{(1,20)}=511.1$ ;  $p \leq 0,001$ ] i CD8+ [ $F_{(1,20)}=58,84$ ;  $p \leq 0,001$ ] T-limfocita, količnik CD4+/CD8+ Treg [ $F_{(1,20)}=228,1$ ;  $p \leq 0,001$ ] i procentualnu zastupljenost IL-10+ ćelija u CD8+CD25+Foxp3+ ćelija [ $F_{(1,20)}=35,03$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Analizirana je i procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine DA i AO pacova. Nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine mladih DA i AO pacova (Slika 16B). Starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita pacova oba soja, ali je ovo povećanje bilo izraženije kod AO pacova (Slika 16B). Posledično, njihova procentualna zastupljenost je bila manja ( $p \leq 0,001$ ) u subpopulaciji CD8+ T-limfocita starih DA pacova nego u ovoj subpopulaciji starih AO pacova (Slika 16B).

Veći ( $p \leq 0,001$ ) broj CD4+CD25+Foxp3+, kao i CD8+CD25+Foxp3+ T-ćelija, izolovan je iz kičmene moždine mladih DA pacova u odnosu na broj ovih ćelija izolovanih iz kičmene moždine mladih AO pacova (Slika 16A,B). Kod DA pacova starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) broja CD4+CD25+Foxp3+ i CD8+CD25+Foxp3+ T-ćelija, dok je kod AO pacova uticalo na povećanje ( $p \leq 0,01$ ) broja CD4+CD25+Foxp3+ T-ćelija, ali nije imalo uticaja na broj CD8+CD25+Foxp3+ T-ćelija (Slika 16A,B). Veći broj CD4+CD25+Foxp3+ ( $p \leq 0,001$ ) i CD8+CD25+Foxp3+ T-ćelija ( $p \leq 0,05$ ) izolovan je iz kičmene moždine starih DA pacova nego starih AO pacova (Slika 16A,B).



Na osnovu ukupnog broja CD4+CD25+Foxp3+ i CD8+CD25+Foxp3+ T-ćelija u suspenzijama mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova, izračunat je njihov odnos. Ovaj odnos je kod mladih pacova bio manji ( $p \leq 0,001$ ) kod DA nego kod AO pacova, dok je kod starih DA pacova bio veći ( $p \leq 0,05$ ) nego kod starih AO pacova (Slika 16C). Ovakva promena odnosa CD4+/CD8+ T regulatornih ćelija u kičmenoj moždini imunizovanih pacova reflektovala je manje izraženo povećanje ( $p \leq 0,001$ ) broja regulatornih CD8+ T-ćelija starenjem kod DA nego kod AO pacova (Slika 16C).

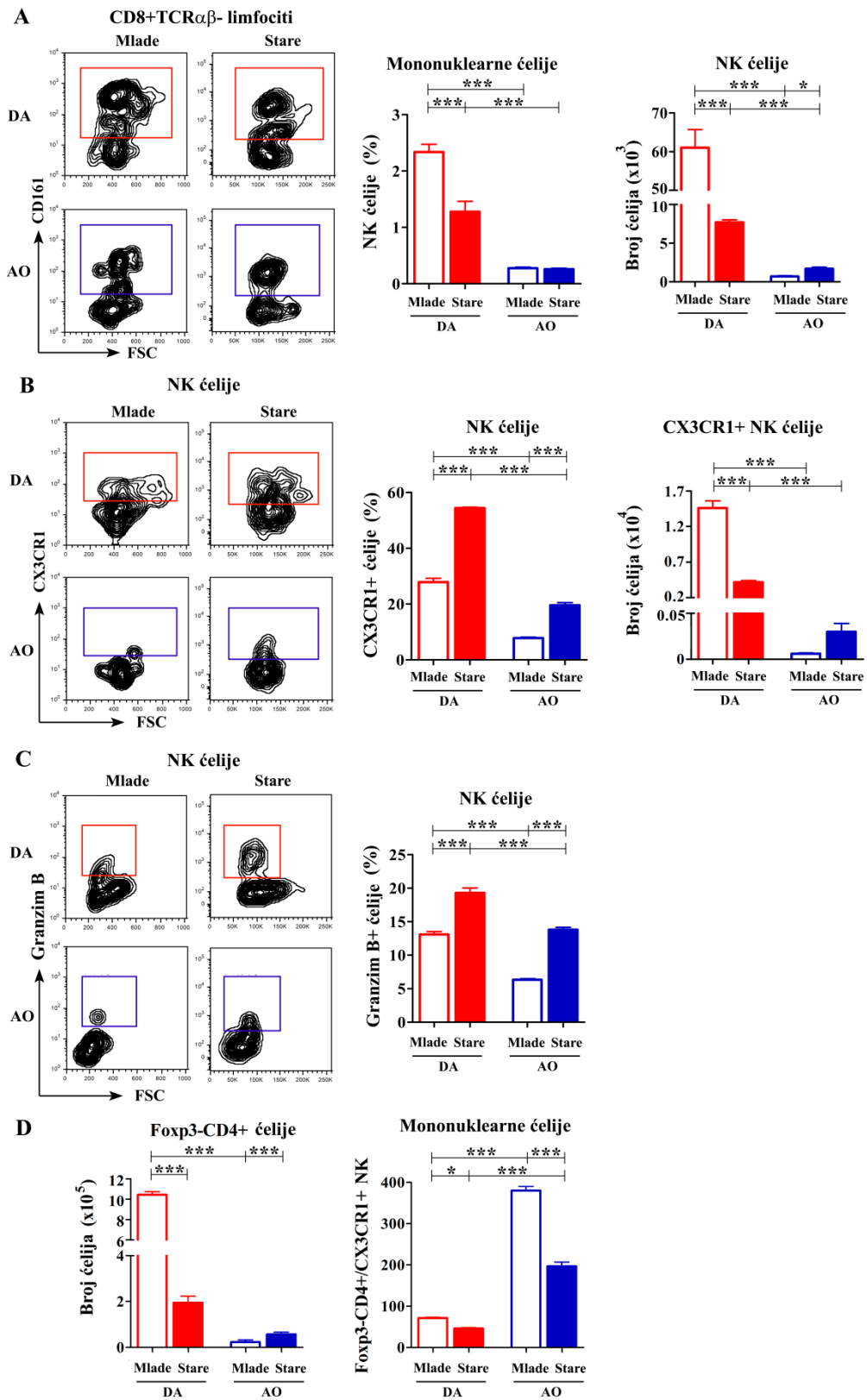
Imajući u vidu da je pokazano da CD8+CD25+Foxp3+ T-limfociti svoju regulatornu funkciju ostvaruju delom posredstvom IL-10 koji sintetišu (Noble i sar., 2006), ispitana je i procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 u okviru subseta CD8+CD25+Foxp3+ T-limfocita. Analiza je pokazala veću ( $p \leq 0,05$ ) procentualnu zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 u okviru ovog subseta ćelija mladih DA pacova u odnosu na mlade AO pacove (Slika 16D). Starenje nije imalo uticaja na procentualnu zastupljenosti ovih ćelija u okviru subseta CD8+CD25+Foxp3+ T-limfocita DA pacova, ali je kod AO pacova dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihove procentualne zastupljenosti (Slika 16D). Procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 bila je manja ( $p \leq 0,01$ ) u subsetu CD8+CD25+Foxp3+ T-limfocita starih DA nego u ovom subsetu ćelija starih AO pacova (Slika 16D).

#### *4.2.4.2. Uticaj starenja na zastupljenost NK ćelija u kičmenoj moždini DA i AO pacova i njihove fenotipske karakteristike*

Imajući u vidu podatke koji impliciraju ulogu NK ćelija koje ekspimiraju CX3CR1 molekul u ograničavanju inflamacije u kičmenoj moždini miševa kod kojih je indukovano EAE (Huang i sar., 2006; Hertwig i sar., 2016), ispitana je i njihova zastupljenost u kičmenoj moždini pacova oba soja.

Rezultati su pokazali da su procentualna zastupljenost NK ćelija, kao i njihov ukupni broj, veći ( $p \leq 0,001$ ) u populaciji mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 17A). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) kako procentualne zastupljenosti NK ćelija, tako i njihovog ukupnog broja, u populaciji mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene

moždine DA pacova (Slika 17A). Kod AO pacova starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,05$ ) ukupnog broja NK ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu, ali nije imalo uticaja na njihovu procentualnu zastupljenost u suspenziji mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine (Slika 17A). Kod starih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) i procentualna zastupljenost i ukupni broj NK ćelija u populaciji mononuklearnih ćelija kičmene moždine nego u ovoj populaciji ćelija AO pacova (Slika 17A).



**Slika 17. Uticaj starenja na broj NK ćelija i njihove fenotipske karakteristike, i na količnik ukupnog broja Foxp3-CD4+ i CX3CR1+ NK ćelija u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju (**Panel A**) imunocitohemijsko bojenje CD161+ ćelija u okviru CD8+TCR- ćelija kičmene moždine (CD161+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), (**Panel B**) imunocitohemijsko bojenje CX3CR1+ ćelija u okviru NK ćelija kičmene moždine (CX3CR1+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), (**Panel C**) imunocitohemijsko bojenje granzim B+ ćelija u okviru NK ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova (granzim B+ ćelije su uokvirene na svakom profilu). Histogrami prikazuju (**Panel A**) procentualnu zastupljenost CD161+CD8+TCR $\alpha\beta$ - NK ćelija u okviru mononuklearnih ćelija (levo) i ukupan broj CD161+CD8+TCR $\alpha\beta$ - NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja (desno), (**Panel B**) procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru NK ćelija (levo) i ukupan broj CX3CR1+ NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja (desno), (**Panel C**) procentualnu zastupljenost granzim B+ ćelija u okviru NK ćelija i (**Panel D**) broj Foxp3-CD4+ ćelija (Foxp3-CD4+ ćelije izdvojene su kao što je ilustrovano na slici 6) izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja (levo) i količnik broja Foxp3-CD4+ i CX3CR1+ NK ćelija kičmene moždine imunizovanih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za (A) procentualnu zastupljenost CD161+CD8+TCR $\alpha\beta$ - NK ćelija u okviru mononuklearnih ćelija [ $F_{(1,20)}=20,92$ ;  $p\leq 0,001$ ] i broj CD161+CD8+TCR $\alpha\beta$ - NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine [ $F_{(1,20)}=132,6$ ;  $p\leq 0,001$ ], (B) procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru NK ćelija [ $F_{(1,20)}=74,54$ ;  $p\leq 0,001$ ] i broj CX3CR1+ NK ćelija [ $F_{(1,20)}=108$ ;  $p\leq 0,001$ ], (D) količnik ukupnog broja Foxp3-CD4+ i CX3CR1+ NK ćelija [ $F_{(1,20)}=123,7$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

U okviru NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine mladih DA pacova utvrđena je veća ( $p\leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CX3CR1+ ćelija u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 17B). Takođe, i veći ( $p\leq 0,001$ ) broj CX3CR1+ NK ćelija je izolovan iz kičmene moždine mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 17B). Starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u okviru NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine DA pacova, ali je manje ( $p\leq 0,001$ ) ovih ćelija izolovano iz kičmene moždine starih nego mladih DA pacova (Slika 17B). Kod AO pacova starenje je dovelo do povećanja ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u populaciji NK ćelija, ali nije imalo uticaja na broj ovih ćelija (Slika 17B). U kičmenoj moždini starih DA pacova nađena je veća ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru NK ćelija, kao i veći ( $p\leq 0,001$ ) broj ovih ćelija, nego u kičmenoj moždini starih AO pacova (Slika 17B).

S obzirom na to da je pokazano da NK ćelije koje eksprimiraju CX3CR1, delujući citotoksično na efektorske ćelije koje infiltriraju kičmenu moždinu (Hertwig i sar., 2016), imaju ključnu ulogu u smanjenju neurološkog oštećenja u EAE-u (Huang i sar., 2006, Hertwig i sar., 2016), ispitana je procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu granzim B u okviru populacije NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova u efektorskoj fazi. Mladi AO pacovi su imali manju ( $p\leq 0,001$ )

zastupljenost ovih ćelija u okviru populacije NK ćelija (Slika 17C). Starenjem se procentualna zastupljenost ovih ćelija povećala ( $p \leq 0,001$ ) kod pacova oba soja (Slika 17C). Međutim, kod starih DA pacova nađena je veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost granzim B + ćelija u okviru populacije NK ćelija u odnosu na stare AO pacove (Slika 17C).

Imajući u vidu ulogu CX3CR1+ NK ćelija u ograničavanju neuroinflamacije (Hertwig i sar., 2016), određivan je broj konvencionalnih Foxp3-CD4+ T-limfocita i analiziran odnos broja konvencionalnih Foxp3-CD4+ T-limfocita i CX3CR1+ NK ćelija u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine.

Broj Foxp3-CD4+ T-limfocita bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod mladih AO pacova (Slika 17D). Manje ( $p \leq 0,001$ ) Foxp3-CD4+ T-limfocita izolovano je iz kičmene moždine starih nego mladih DA pacova, ali više ( $p \leq 0,001$ ) iz kičmene moždine starih nego mladih AO pacova (Slika 17D). Broj ovih ćelija se nije razlikovao u kičmenoj moždini starih DA i AO pacova (Slika 17D).

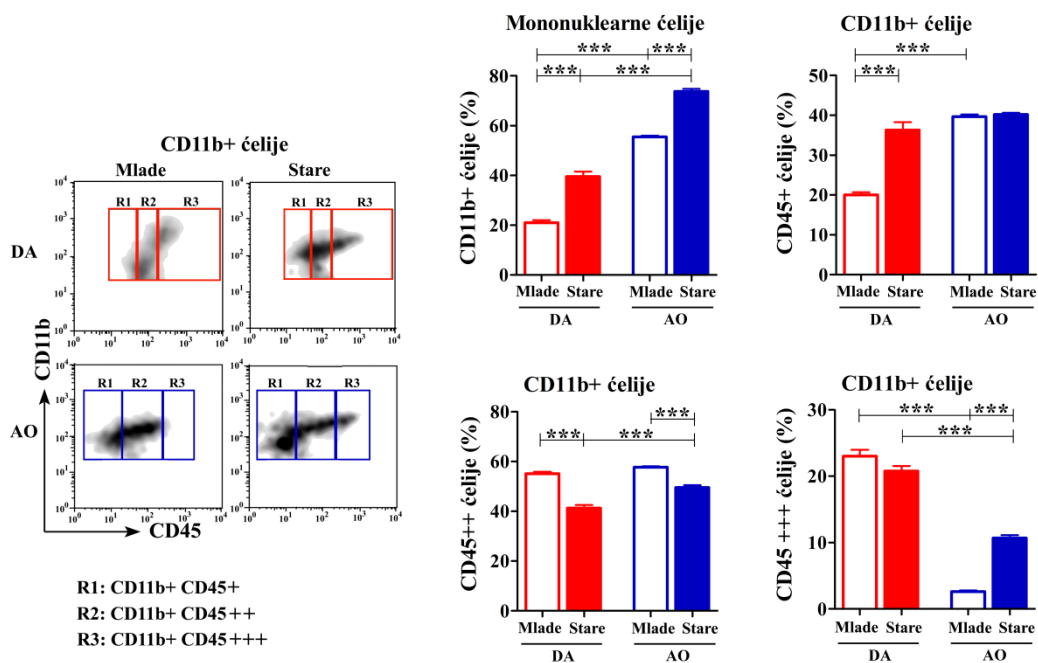
Količnik broja Foxp3-CD4+ i CX3CR1+ NK ćelija bio je manji ( $p \leq 0,001$ ) u kičmenoj moždini mladih DA u odnosu na mlade AO pacove (Slika 17D). Starenje je uticalo na smanjenje ovog količnika kod DA ( $p \leq 0,05$ ) pacova, ukazujući na efikasniju kontrolu encefalitogenih CD4+ T-limfocita od strane NK ćelija kod starih DA pacova. Ovaj količnik se starenjem smanjivao ( $p \leq 0,001$ ) i kod AO pacova, ali je ipak kod starih AO pacova on ostao veći ( $p \leq 0,001$ ) nego kod starih DA pacova (Slika 17D), što je impliciralo efikasniju kontrolu efektorskih CD4+ T-limfocita od strane NK ćelija kod starih DA pacova u odnosu na stare AO pacove.

#### 4.2.5. Uticaj starenja na fenotipske karakteristike CD11b+ ćelija u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a

Na osnovu površinske ekspresije CD11b molekula mogu se identifikovati ćelije urođene imunosti u CNS-u (Perry i Teeling, 2013), dok se na osnovu površinske ekspresije CD45 molekula mogu razdvojiti neaktivisane ćelije mikroglije, koje se karakterišu veoma niskim nivoom ekspresije CD45 (CD45+ ćelije) i aktivisane ćelije mikroglije, koje imaju veću površinsku ekspresiju CD45 (CD45++ ćelije) (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009). Aktivacija mikroglije karakteriše patogenezu kako EAE-a,

tako i multiple skleroze (Benveniste i sar., 1997). Njena uloga može biti dvojaka budući da je pokazano da aktivisana mikroglia može imati ulogu ne samo u reaktivaciji CD4+ T-limfocita (Murphy i sar., 2010), već i u ograničavanju oštećenja CNS-a i autoimunske neuroinflamacije (Goldmann i Prinz, 2013). Najviši nivo ekspresije CD45 (CD45+++ ćelije) pokazuju ćelije monocitnog porekla (inflamatorni makrofagi i dendritske ćelije), koje iz periferne krvi ulaze u kičmenu moždinu (Zhang i sar., 2002 Croxford i sar., 2015a). Treba napomenuti da ovakvu ekspresiju može pokazati i jako aktivisana mikroglia (Greter i sar., 2015).

Mladi DA pacovi imali su manju ( $p \leq 0,001$ ) procentualnu zastupljenost CD11b+ ćelija u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 18). Starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija kod pacova oba soja (Slika 18). Međutim, kao i kod mladih pacova, manja ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija nađena je kod starih DA u poređenju sa starim AO pacovima (Slika 18).



**Slika 18. Uticaj starenja na zastupljenost CD11b+ ćelija u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a i na ekspresiju CD45 molekula na ovim ćelijama.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski gustinski profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje CD45+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova. Histogrami prikazuju (gornji) procentualnu zastupljenost CD11b+ ćelija u okviru mononuklearnih ćelija kičmene moždine DA i AO pacova (levo) i procentualnu zastupljenost CD45+ ćelija u CD11b+ ćelijama (desno) i (donji) procentualnu zastupljenost CD45++ (levo) i CD45+++ (desno) ćelija u okviru CD11b+ ćelija kičmene moždine DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja

vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD45+ [ $F_{(1,20)}=52,71$ ;  $p\leq 0,001$ ], CD45++ [ $F_{(1,20)}=9,6$ ;  $p\leq 0,01$ ] i CD45+++ [ $F_{(1,20)}=61,01$ ;  $p\leq 0,001$ ] ćelija u CD11b ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Kod mladih pacova procentualna zastupljenost CD45+ ćelija je bila manja ( $p\leq 0,001$ ) u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine DA pacova nego AO pacova (Slika 18). Starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenosti CD45+ ćelija u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine DA pacova, dok nije imalo uticaja na njihovu procentualnu zastupljenost u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine AO pacova (Slika 18). Nije bilo razlike u zastupljenosti ovih ćelija u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine starih DA i AO pacova (Slika 18)

Procentualna zastupljenost CD45++ ćelija, koje većinski odgovaraju ćelijama aktivisane mikrogije (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009), nije se razlikovala u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih pacova DA i AO soja (Slika 18). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenosti CD45++ ćelija u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine pacova oba soja (Slika 18). Međutim, kod starih pacova značajno veća ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenost ovih ćelija otkrivena je u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine AO pacova u odnosu na DA pacove (Slika 18).

Značajno veća ( $p\leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CD45+++ ćelija, većinski inflamatorni monociti i dendritske ćelije (Zhang i sar., 2002), nađena je u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine mladih DA pacova nego u ovoj populaciji mladih AO pacova (Slika 18). Starenje nije imalo uticaja na procentualnu zastupljenost ovih ćelija u populaciji CD11b+ ćelija kičmene moždine DA pacova, ali je dovelo do povećanja ( $p\leq 0,001$ ) njihove procentualne zastupljenosti u ovoj populaciji ćelija AO pacova (Slika 18). Posledično, procentualna zastupljenost CD45+++ ćelija bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u populaciji CD11b+ ćelija starih DA nego AO pacova (Slika 18).

#### *4.2.5.1. Uzasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u okviru ćelija mikrogije*

Pokazano je da je za protektivnu ulogu mikrogije u ograničavanju autoimunske neuroinflamacije ključna interakcija proteina fraktalkina (CX3CL1) i njegovog

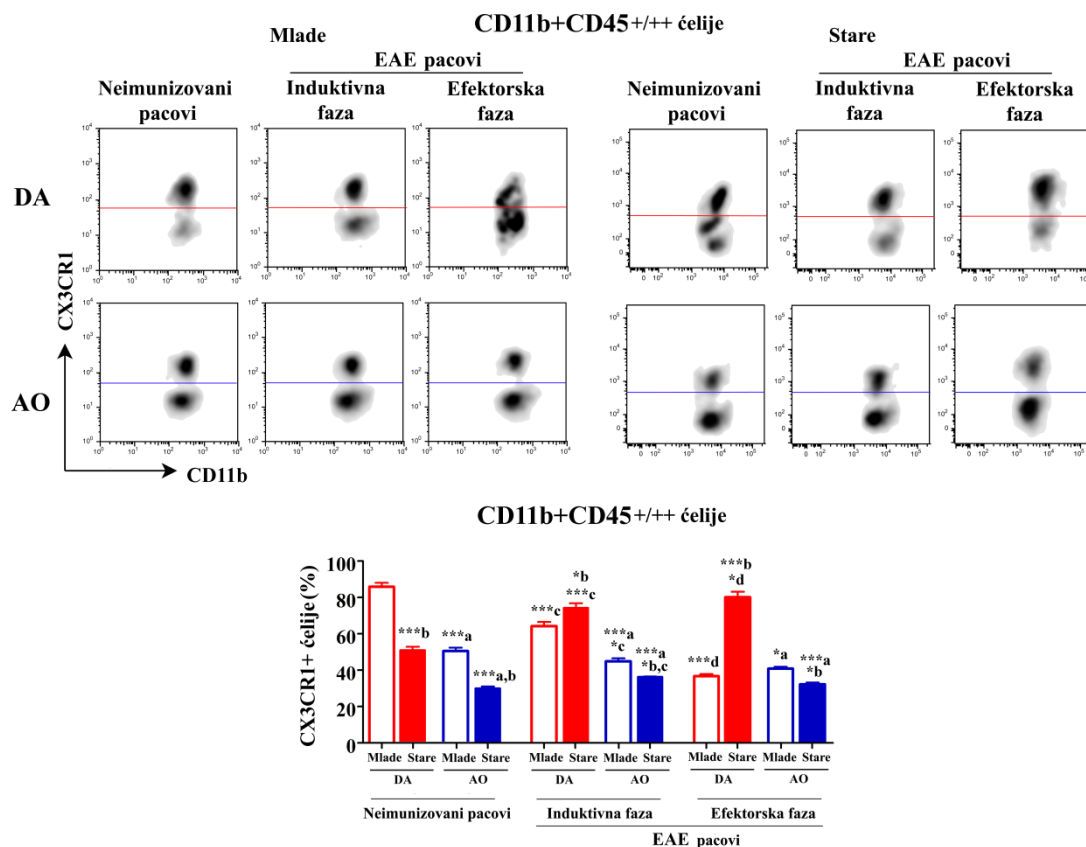
---

receptora CX3CR1 eksprimiranog na ćelijama mikroglije (Cardona i sar., 2006; Lyons i sar., 2009; Zujovic i sar., 2000). Imajući u vidu i da ekspresija CX3CR1 na ćelijama mikroglije pre nego što je izvršena imunizacija životinja može imati reperkusije na dešavanja u CNS-u nakon indukcije EAE-a (Corona i sar., 2010; Ritzel i sar., 2015), ispitana je procentualna zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru mikroglije izolovane kako iz kičmene moždine imunizovanih pacova u efektorskoj fazi bolesti, tako i iz kontrolnih neimunizovanih pacova odgovarajućeg uzrasta i soja.

Bez obzira na uzrast, kod neimunizovanih pacova procentualna zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija koje su izolovane iz kičmene moždine bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) kod AO nego DA pacova (Slika 19). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u okviru mikroglije kod neimunizovanih pacova oba soja (Slika 19).

Sa indukcijom bolesti, kod mladih pacova i DA ( $p \leq 0,001$ ) i AO ( $p \leq 0,05$ ) soja je došlo je do smanjenja procentualne zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u populaciji CD11b+CD45+/++ ćelija, da bi se u efektorskoj fazi kod mladih DA pacova smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija nastavilo, dok se kod mladih AO pacova procentualna zastupljenost ovih ćelija nije menjala. (Slika 19). S obzirom na to da je ovo smanjenje bilo značajno manje izraženo kod mladih AO nego mladih DA pacova, posledično je u efektorskoj fazi bolesti zastupljenost ovih ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija mikroglije bila veća ( $p \leq 0,05$ ) kod AO nego kod DA pacova (Slika 19). Za razliku od mladih pacova, kod imunizovanih starih DA pacova zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45-/+ ćelija mikroglije se kontinuirano povećavala sa progresijom bolesti ( $p \leq 0,001$  induktivna faza u poređenju sa neimunizovanim životinjama i  $p \leq 0,05$  efektorska faza u poređenju sa induktivnom fazom) (Slika 19). U odnosu na neimunizovane životinje, kod imunizovanih starih AO pacova došlo je do blagog povećanja ( $p \leq 0,05$ ) zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija mikroglije u induktivnoj fazi, dok u efektorskoj fazi nije bilo promene u zastupljenosti ovih ćelija u odnosu na induktivnu fazu (Slika 19). Stoga, u efektorskoj fazi, suprotno u odnosu na mlade pacove, kod starih pacova zastupljenost CX3CR1+ ćelija je bila veća ( $p \leq 0,001$ ) u populaciji CD11b+CD45+/++ ćelija mikroglije DA nego u ovoj populaciji AO pacova (Slika 19).



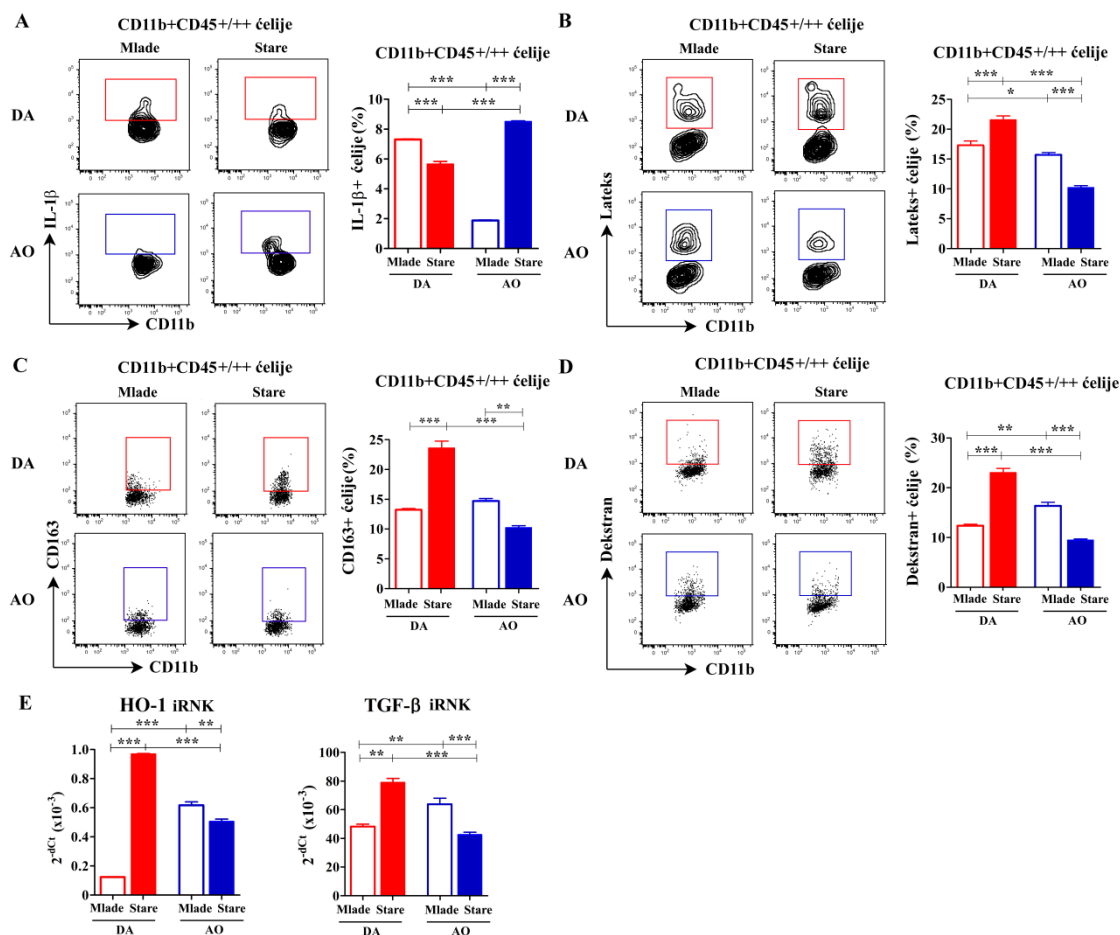


**Slika 19. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru ćelija mikroglije DA i AO pacova u induktivnoj i efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočnocitofluorometrijski gustinski profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija (izdvojenih kao što je ilustrirano na slici 18) izolovanih iz kičmene moždine (gornji) DA i (donji) AO pacova i (levi) mladih i (desni) starih imunizovanih i neimunizovanih pacova. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija kičmene moždine imunizovanih i neimunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija [F(1,20)=234,6; p $\leq$ 0,001] izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova u efektorskoj fazi. \* p $\leq$ 0,05; \*\*\* p $\leq$ 0,001. a AO vs DA pacovi odgovarajućeg uzrasta, b stari vs mladi pacovi odgovarajućeg soja, c induktivna faza EAE-a vs neimunizovani pacovi, d efektorska faza vs induktivna faza EAE-a.

#### 4.2.5.2. Uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje sintetišu IL-1 $\beta$ u okviru mikroglije

S obzirom na to da je pokazano da je za neuroprotektivni uticaj mikroglije ključna nishodna regulacija sinteze IL-1 $\beta$  (Bhaskar i sar., 2010), ispitana je sinteza IL-1 $\beta$  u CD11b+CD45+/++ ćelijama kičmene moždine. Kod mladih pacova veća (p $\leq$ 0,001) procentualna zastupljenost ćelija koje su sintetisale IL-1 $\beta$  detektovana je u mikrogliji DA pacova nego u mikrogliji AO pacova (Slika 20A). Starenje je uticalo na smanjenje

( $p \leq 0,001$ ) zastupljenosti ovih ćelija u mikrogliji DA pacova, dok je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihove zastupljenosti u mikrogliji AO pacova (Slika 20A). Posledično, manja ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost ćelija koje su sintetisale IL-1 $\beta$  bila je u mikrogliji starih DA pacova nego u mikrogliji starih AO pacova (Slika 20A).



**Slika 20. Uticaj starenja na zastupljenost ćelija koje sintetisaju IL-1 $\beta$  u okviru mikroglije, fagocitnu sposobnost mikroglijalnih ćelija i ekspresiju iRNA za HO-1 i TGF- $\beta$  u CD11b+ ćelijama mikroglije u kičmenoj moždini DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje (Panel A) IL-1 $\beta$ + ćelija, (Panel B) lateks+ ćelija, (Panel C) CD163+ ćelija i (Panel D) dekstran+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija (izdvojenih kao što je ilustrovano na slici 18) DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost (Panel A) IL-1 $\beta$ + ćelija, (Panel B) lateks+ ćelija, (Panel C) CD163+ ćelija i (Panel D) dekstran+ ćelija u okviru CD11b+CD45+/++ ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). (Panel E) Histogrami prikazuju ekspresiju iRNA za HO-1 (levo) i TGF- $\beta$  (desno) u CD11b+ mikroglijalnim ćelijama izdvojenim magnetnom separacijom (detaljnije objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su izraženi kao 2<sup>-dCt</sup> vrednosti (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-1 $\beta$ + [ $F_{(1,20)}=1772$ ;  $p \leq 0,001$ ], latexin+ [ $F_{(1,20)}=141,9$ ;  $p \leq 0,001$ ], CD163+ [ $F_{(1,20)}=145,8$ ;  $p \leq 0,001$ ] i dekstran+ [ $F_{(1,20)}=240,1$ ;  $p \leq 0,001$ ] ćelija u CD11b+CD45+/++ ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova i za ekspresiju iRNA za HO-1 [ $F_{(1,20)}=126,6$ ;  $p \leq 0,001$ ] i TGF- $\beta$  [ $F_{(1,20)}=72,73$ ;  $p \leq 0,001$ ] u CD11b+ ćelijama mikroglije. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.5.3. Uzasne i sojne razlike u fagocitnoj sposobnosti ćelija mikroglije

Veživanje CX3CL1 za receptor na ćelijama mikroglije podstiče fagocitnu sposobnost ovih ćelija (Huang i sar., 2016). Shodno ovom nalazu ispitana je i fagocitna sposobnost ćelija mikroglije izolovanih u efektorskoj fazi EAE korišćenjem čestica lateksa. Procentualna zastupljenost ćelija koje su fagocitovale čestice lateksa bila je veća ( $p \leq 0,05$ ) u ćelijama mikroglije mladih DA pacova u poređenju sa ovom u ćelijama mikroglije mladih AO pacova (Slika 20B). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ćelija mikroglije DA pacova koje su fagocitovale čestice lateksa (Slika 20B). Nasuprot ovome, procentualna zastupljenost ćelija koje su fagocitovale lateks bila je značajno manja ( $p \leq 0,001$ ) u populaciji ćelija mikroglije starih u poređenju sa ćelijama mladih AO pacova (Slika 20B). Posledično, procentualna zastupljenost ovih ćelija bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u mikrogliji starih DA pacova u poređenju sa ovom u mikrogliji starih AO pacova (Slika 20B).

Podaci iz literature ukazuju na ushodnu regulaciju ekspresije CD163 molekula na fagocitujućim ćelijama (Zhang i sar., 2011), kao i na ključnu ulogu CD163+ ćelija mikroglije u ograničavanju neuroinflamacije u modelima akutnog EAE-a (Ahn et al., 2012). Imajući ovo u vidu, ispitana je i procentualna zastupljenost CD163+ ćelija u okviru ćelija mikroglije izolovanih iz kičmene moždine pacova u efektorskoj fazi EAE. Kao što je očekivano (Zhang i sar., 2011), zastupljenost CD163+ ćelija u okviru mikroglije izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova pokazala je obrazac razlika sličan onom pokazanom za procentualnu zastupljenost ćelija koje su fagocitovale čestice lateksa. Dakle, kod mladih pacova oba soja nije bilo značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD163+ ćelija u okviru ćelija mikroglije (Slika 20C). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija mikroglije DA pacova (Slika 20C). S druge strane, starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,01$ ) njihove zastupljenosti u ćelijama mikroglije AO pacova (Slika 20C). U ćelijama mikroglije starih DA pacova nađena je veća ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost CD163+ ćelija nego u ćelijama mikroglije starih AO pacova (Slika 20C).

S obzirom na to da je pokazano da ćelije mikroglije koje pokazuju protektivni M2 fenotip ekspimiraju manozni receptor (Régnier-Vigouroux, 2003; Martinez i sar., 2006), ispitano je i preuzimanje dekstrana endocitozom od strane ćelija mikroglije

izolovanih u efektorskoj fazi EAE-a. Kod mladih pacova uočeno je veće ( $p \leq 0,01$ ) preuzimanje dekstrana od strane mikroglije AO pacova u odnosu na mikrogliju DA pacova (Slika 20D). Mikroglija starih DA pacova pokazala je veću ( $p \leq 0,001$ ) sposobnost preuzimanja dekstrana u odnosu na mikrogliju mladih DA pacova (Slika 20D). Suprotno ovome, mikroglija starih AO pacova imala je manju ( $p \leq 0,001$ ) sposobnost preuzimanja dekstrana u poređenju sa mikroglijom mladih AO pacova (Slika 20D). Procenat ćelija koje su preuzele dekstran (dekstran+ ćelija) bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) među ćelijama mikroglije koje su izolovane iz kičmene moždine starih DA pacova nego iz kičmene moždine starih AO pacova (Slika 20D).

#### 4.2.5.4. Uzrasne i sojne razlike u ekspresiji iRNK za faktor transformacije rasta-beta ( $TGF-\beta$ ) i hem-oksigenazu ( $HO$ )-1 u $CD11b^+$ ćelijama mikroglije

Pokazano je da mikroglija ograničava neuroinflamaciju ushodnom regulacijom nuklearnog faktora Nrf2 { *engl.* nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 }, koji dovodi do transkripcije gena koji kodira sintezu HO-1, enzima koji posreduje u rezoluciji inflamatornog procesa (Lastres-Becker i sar., 2014; Syapin, 2008). Smatra se da ključnu ulogu u smanjenju proinflamatornog fenotipa mikroglije ima fraktalkin/Nrf2/HO-1 osovina (Lastres-Becker i sar., 2014). Imajući ovo u vidu, ispitana je ekspresija iRNK za HO-1 u  $CD11b^+$  ćelijama koje su izolovane magnetnom separacijom iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova. Ekspresija iRNK za HO-1 bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u  $CD11b^+$  ćelijama izolovanim iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine mladih AO pacova u poređenju sa onom u  $CD11b^+$  ćelijama kičmene moždine mladih DA pacova (Slika 20E). Starenje je imalo suprotan efekat na ekspresiju HO-1 u  $CD11b^+$  ćelijama DA i AO pacova. Naime, starenjem se povećavala ( $p \leq 0,001$ ) ekspresija iRNK za HO-1 u  $CD11b^+$  ćelijama DA pacova, a smanjivala ( $p \leq 0,01$ ) u ovim ćelijama AO pacova (Slika 20E). Ekspresija iRNK za HO-1 bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u  $CD11b^+$  ćelijama starih DA pacova nego u ovim ćelijama AO pacova istog uzrasta (Slika 20E).

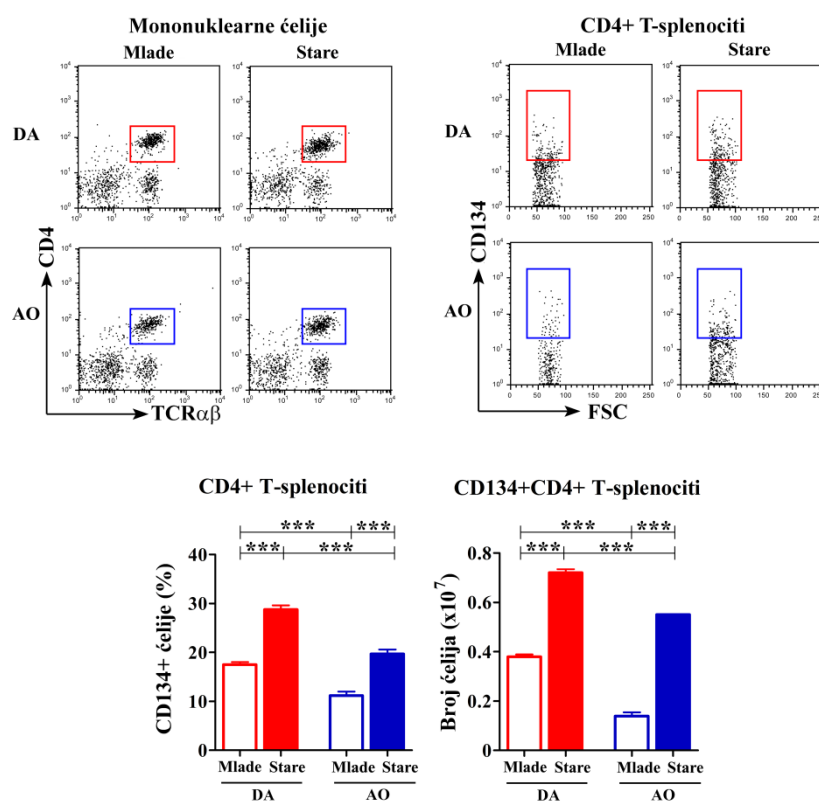
Budući da tokom različitih inflamatornih procesa u CNS-u,  $TGF-\beta$ , indukujući ekspresiju CX3CR1 na ćelijama mikroglije, ima ključnu ulogu u postizanju tzv. „mirujućeg“ fenotipa ovih ćelija (Abutbul i sar., 2012; Wynne i sar., 2010), analizirana

je i ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  u CD11b+ ćelijama izolovanim iz suspenzije mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih pacova. Kod mladih pacova, veća ( $p \leq 0,01$ ) ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  detektovana je u CD11b+ ćelijama izolovanim iz kičmene moždine AO pacova nego DA pacova (Slika 20E). Starenje je, slično ekspresiji iRNK za HO-1, dovelo do ushodne regulacije ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije iRNK za TGF- $\beta$  u CD11b+ ćelijama kičmene moždine DA pacova, a nishodne regulacije ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije iRNK za ovaj citokin u CD11b+ ćelijama kičmene moždine AO pacova (Slika 20E). Posledično, veća ( $p \leq 0,001$ ) ekspresija iRNK za TGF- $\beta$  nađena je u CD11b+ ćelijama kičmene moždine starih DA pacova nego starih AO pacova (Slika 20E).

#### **4.3. Uticaj starenja na zadržavanje CD4+ T-limfocita u slezini DA i AO pacova imunizovanih u cilju indukcije EAE-a**

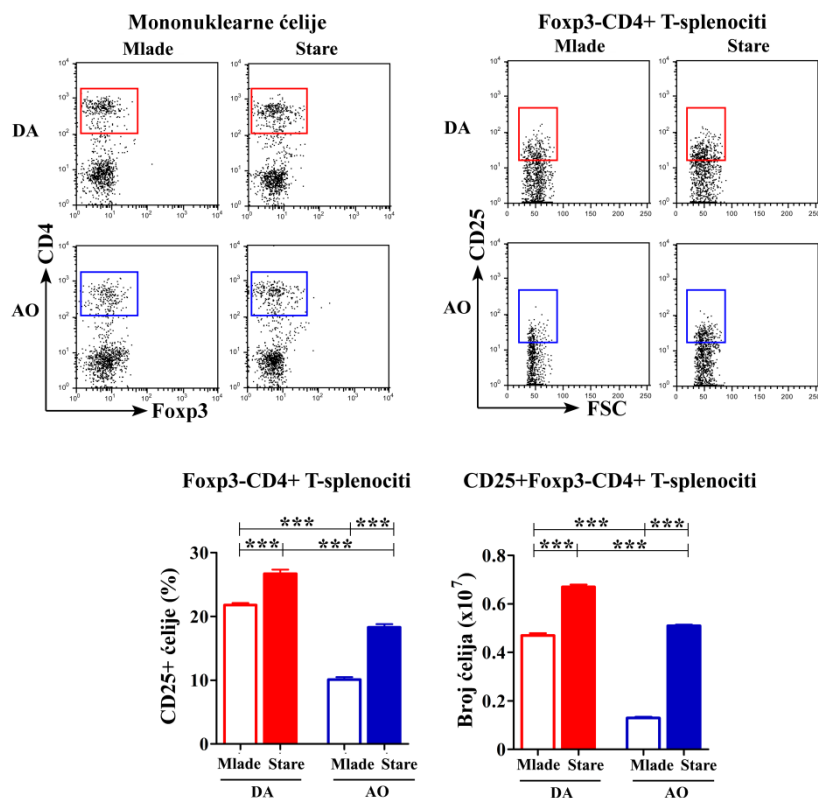
Imajući u vidu da se broj CD4+ T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu razlikuje u zavisnosti od soja i uzrasta pacova, i da je pokazano da CD4+ T-limfociti specifični za neuroantigene, a indukovani u drenirajućem limfnom čvoru, pre ulaska u kičmenu moždinu prolaze kroz slezinu gde se mogu zadržati (Flügel i sar., 2001; Staykova i sar., 2002; Yang i sar., 2002; Tischner i sar., 2006 ), ispitana je zastupljenost aktivisanih CD4+ T-limfocita u slezini.

Analiza ekspresije aktivacionog markera CD134 na CD4+ T-splenocitima izolovanim u efektorskoj fazi EAE-a pokazala je da je procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-splenocita mladih DA pacova bila veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u ovoj subpopulaciji mladih AO pacova. Starenje je kod oba soja pacova povećavalo ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost ovih ćelija u okviru CD4+ T-splenocita (Slika 21). Procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-splenocita starih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u ovoj subpopulaciji starih AO pacova (Slika 21). Identičan obrazac uzrasnih i sojnih razlika pokazao je i broj CD134+CD4+ T-splenocita (Slika 21).



**Slika 21. Starenje utiče na zastupljenost CD134+ T-limfocita u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju (levo) CD4 vs TCR $\alpha\beta$  imunocitoheмиjsko bojenje mononuklearnih ćelija slezine mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova (CD4+TCR $\alpha\beta$ + ćelije su uokvirene na svakom profilu) i (desno) imunocitoheмиjsko bojenje CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-splenocita mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. CD134+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-splenocita imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj CD134+CD4+ T-splenocita. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=8,77$ ;  $p\leq 0,01$ ] u slezini imunizovanih životinja. \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

U sledećem koraku ispitana je ekspresija CD25+ u subsetu konvencionalnih Foxp3-CD4+ T-splenocita. Procentualna zastupljenost aktivisanih CD25+ ćelija u okviru ovog subseta CD4+ T-splenocita bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) kod mladih DA nego kod mladih AO pacova (Slika 22). Starenjem se procentualna zastupljenost ovih ćelija povećavala ( $p\leq 0,001$ ) u subsetu Foxp3-CD4+ T-splenocita oba soja pacova. Procentualna zastupljenost CD25+ u subsetu Foxp3-CD4+ T-splenocita je kod starih DA pacova bila veća ( $p\leq 0,001$ ) nego kod starih AO pacova (Slika 22). Sojne i uzrasne razlike u ukupnom broju CD25+Foxp3-CD4+ T-ćelija u slezini pratile su razlike u procentualnoj zastupljenosti CD25+ ćelija u Foxp3-CD4+ T-splenocitima (Slika 22).



**Slika 22. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u okviru Foxp3-CD4+ ćelija i ukupan broj CD25+Foxp3-CD4+ ćelija izolovanih iz slezine DA i AO pacova u efektorskoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (levo) prikazuju CD4 vs Foxp3 imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija slezine (Foxp3-CD4+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), i (desno) bojenje CD25+ ćelija u subsetu Foxp3-CD4+ ćelija slezine (CD25+ ćelije uokvirene su na svakom profilu). Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu Foxp3-CD4+ ćelija izolovanih iz slezine imunizovanih mladih i starih DA i AO pacova i (desni) ukupan broj CD25+Foxp3-CD4+ ćelija izolovanih iz slezine. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu CD4+Foxp3- splenocita imunizovanih DA i AO pacova [ $F_{(1,20)}=8,21$ ;  $p\leq 0,01$ ] i za ukupan broj CD25+CD4+Foxp3- ćelija izolovanih iz slezina imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=140,3$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Imajući u vidu da iako se starenjem kod AO pacova procentualna zastupljenost aktivisanih ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-splenocita povećavala, kao i njihov broj u slezini, i infiltracija kičmene moždine CD4+ T-limfocitima se starenjem povećavala kod AO pacova i sledstveno su se javljali neurološki znaci bolesti, te se moglo pretpostaviti da povećano zadržavanje aktivisanih CD4+ T-limfocita u slezini nije značajno kompromitovalo povećanje osetljivosti AO pacova na indukciju EAE-a. S druge strane analiza ekspresije aktivacionih markera na CD4+ T-splenocitima DA pacova pokazala je da se starenjem kod ovih životinja povećavalo zadržavanje

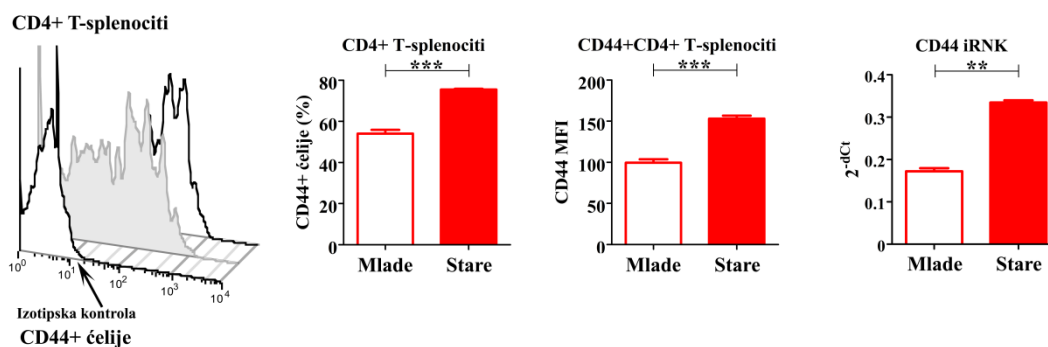
---

aktivisanih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini, te da bi taj mehanizam mogao da doprinese njihovom smanjenom ulasku u kičmenu moždinu i sledstveno manjoj osetljivosti na indukciju EAE-a. Shodno tome, u sledećoj fazi ispitivanja ispitivali smo mehanizme koji bi mogli da učestvuju u povećanju broja aktivisanih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini DA pacova.

#### 4.3.1. Starenje povećava ekspresiju CD44 na CD4<sup>+</sup> T-splenocitima

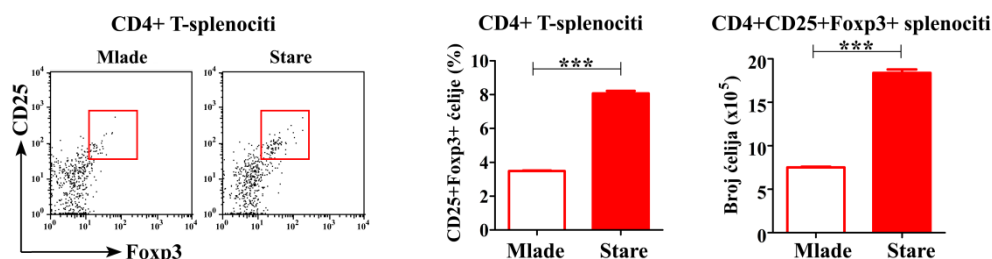
Imajući u vidu da povećana ekspresija adhezivnog molekula CD44 na encefalitogenim T-limfocitima dovodi do povećanog zadržavanja ovih ćelija u slezini i na taj način ograničava njihovu migraciju u CNS (Yang i sar., 2002; Rigolio i sar., 2008), ispitana je procentualna zastupljenost CD44<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-splenocita, kao i gustina ovog molekula na površini CD4<sup>+</sup> T-splenocita izolovanih u efektorskoj fazi bolesti. Ekspresija CD44 molekula ispitivana je protočnom fluorocitometrijom nakon obeležavanja ovog molekula monoklonskim antitelom OX-49 koje je bilo vezano za fluorohrom. Ovo antitelo reaguje sa glikoproteinom CD44H, koji se još označava i kao CD44s, a koji je eksprimiran na većini leukocita i čija se površinska ekspresija na T i B limfocitima povećava aktivacijom (Pure i Cuff, 2001; Baaten i sar., 2010). Ovo antitelo prepoznaje jedan epitop na standardnoj izoformi CD44 molekula (CD44s) kao i na varijantnoj izoformi (CD44v) (Camp i sar., 1991; van Weering i sar., 1993; Naor i sar., 2007). Ovo je važno budući da su CD44s i CD44v izoforme uključene u regulaciju migracije limfocita i njihovo preživljavanje (Camp i sar., 1991; van Weering i sar., 1993; Pure i Cuff, 2001; Baaten i sar., 2010). Imajući u vidu promene u MFI (Kamath i sar., 1998), starenjem se povećavala ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CD44<sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-splenocita, kao i gustina ekspresije ovog molekula na CD44<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-splenocitima (Slika 23). U skladu sa ovim nalazima ekspresija iRNK za CD44 bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u CD4<sup>+</sup> T-splenocitima starih DA pacova u odnosu na mlade životinje istog soja (Slika 23).





**Slika 23. Uticaj starenja na zastupljenost CD44+ ćelija u okviru CD4+ T-splenocita kod DA pacova na vrhuncu bolesti.** Protočno-citofluorometrijski histogrami prikazuju imunocitohemijsko bojenje CD44+ ćelija u okviru CD4+ T-splenocita (izdvajani kao što je ilustrirano na slici 22) kod mladih i starih DA pacova na vrhuncu bolesti. Histogrami prikazuju redom (s leva na desno) procentualnu zastupljenost CD44+ ćelija u okviru CD4+ T-splenocita, srednji intenzitet fluorescencije (MFI) za molekul CD44 na CD44+CD4+ T-splenocitima i ekspresiju iRNK za CD44 u CD4+ T-splenocitima izdvojenim magnetnom separacijom (detaljnije opisano u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

S obzirom na to da je pokazano da povećanje broja regulatornih CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocita u sekundarnim limfnim organima može bitno ograničiti infiltraciju CNS-a encefalitogenim T limfocitima (Tischner i sar., 2006), ispitana je procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-splenocita u efektorskoj fazi EAE-a, kao i njihov broj. Analiza je pokazala da se starenjem povećavala ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-splenocita, kao i njihov broj u slezini (Slika 24).



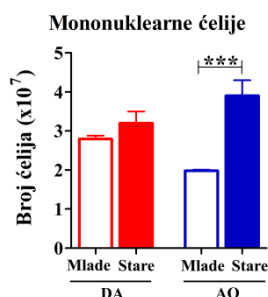
**Slika 24. Uticaj starenja na zastupljenost CD4+ Treg u slezini kod DA pacova na vrhuncu bolesti.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD25 vs Foxp3 imunocitohemijsko bojenje CD4+ T-splenocita (izdvajani kao što je ilustrirano na slici 22) kod mladih i starih DA pacova na vrhuncu bolesti (CD25+Foxp3+ ćelije uokvirene su na svakom profilu). Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u CD4+ T-splenocitima i (desno) ukupan broj CD4+CD25+Foxp3+ ćelija izolovanih iz slezine mladih i starih DA pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). \*\*\* $p \leq 0.001$ .

#### 4.4. Uticaj sojnih razlika na starenjem uslovljene promene fenotipskih i funkcijskih karakteristika mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a

##### 4.4.1. Uticaj starenja na ukupni broj CD4+ T-limfocita, njihov aktivacioni status i proliferaciju

U sledećem koraku ispitvano je da li u izmenjenoj osetljivosti starih pacova na indukciju EAE-a u poređenju sa mladim životinjama istog soja učestvuju i promene u primarnom odgovoru na imunizaciju u drenirajućim limfnim čvorovima.

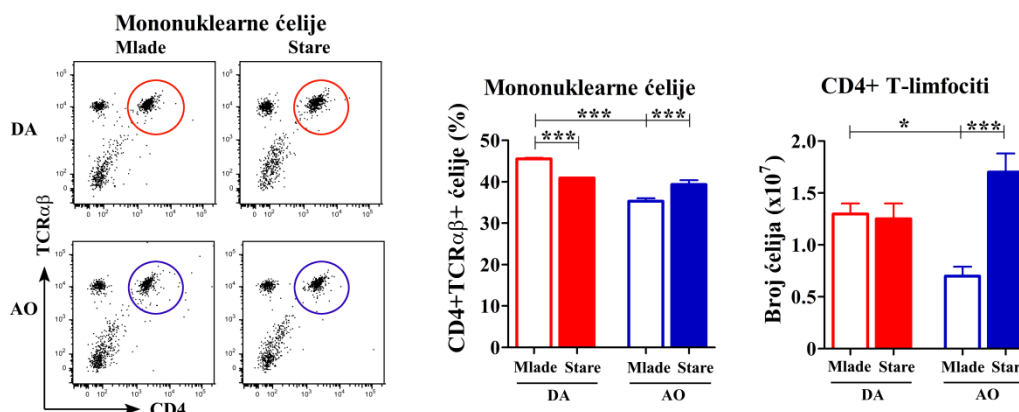
Kod mladih pacova nije bilo razlike u broju mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova (Slika 25). Starenje nije imalo uticaja na promenu u ukupnom broju mononuklearnih ćelija kod DA pacova, ali jeste dovelo do porasta ( $p \leq 0,001$ ) broja ovih ćelija kod AO pacova (Slika 25). Nije bilo značajne razlike u ukupnom broju mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnim čvorovima starih DA i AO pacova (Slika 25).



**Slika 25. Uticaj starenja na broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Histogram prikazuje broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=8,98$ ;  $p \leq 0,01$ ]. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izolovanih iz limfnih čvorova imunizovanih životinja u induktivnoj fazi EAE-a bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih AO pacova nego kod mladih DA pacova (Slika 26). Starenje je imalo suprotan efekat na procentualnu zastupljenost CD4+ T-limfocita u populaciji mononuklearnih ćelija pacova DA i AO soja (Slika 26). Kod DA pacova starenjem je došlo do smanjenja ( $p \leq 0,001$ ), a kod AO pacova do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija (Slika 26). Nije bilo značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD4+ T-limfocita u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova starih DA i AO pacova (Slika 26).

Ukupan broj CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima bio je manji ( $p \leq 0,05$ ) kod mladih AO pacova nego kod mladih DA pacova (Slika 26). Starenje nije uticalo na promenu ukupnog broja ovih ćelija kod DA pacova, dok je kod AO pacova dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihovog ukupnog broja u drenirajućim limfnim čvorovima (Slika 26). Ukupan broj CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA i AO pacova nije se razlikovao (Slika 26).

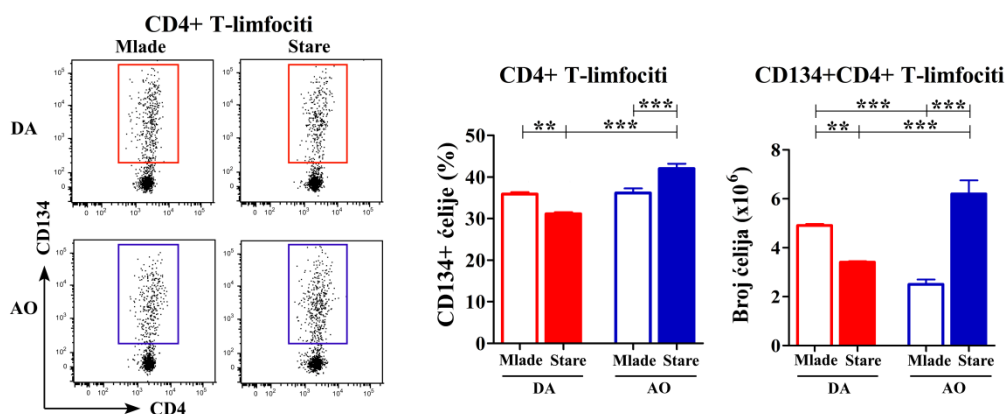


**Slika 26. Starenje utiče na zastupljenost CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD4 vs TCRαβ imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. CD4+TCRαβ+ ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD4+TCRαβ+ limfocita u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova i (desno) ukupan broj CD4+TCRαβ+ limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD4+TCRαβ+ limfocita u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine imunizovanih pacova. [ $F_{(1,20)}=42,89$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=15,10$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Nije bilo značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti aktivisanih CD134+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima mladih pacova DA i AO soja (Slika 27). Kod DA pacova starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,01$ ) njihove procentualne zastupljenosti subpopulaciji CD4+T-limfocita (Slika 27). Suprotno, kod AO pacova starenjem je došlo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihove zastupljenosti (Slika 27). Posledično, procentualna zastupljenost ovih ćelija bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) kod starih DA pacova u odnosu na stare AO pacove (Slika 27).

Kod mladih pacova ukupan broj aktivisanih CD134+CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) kod DA pacova u poređenju sa

AO pacovima (Slika 27). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,01$ ) ukupnog broja ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova, dok je kod AO pacova dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihovog broja (Slika 27). Posledično, ukupan broj aktivisanih CD134+CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova bio je manji ( $p \leq 0,001$ ) nego kod AO pacova (Slika 27).

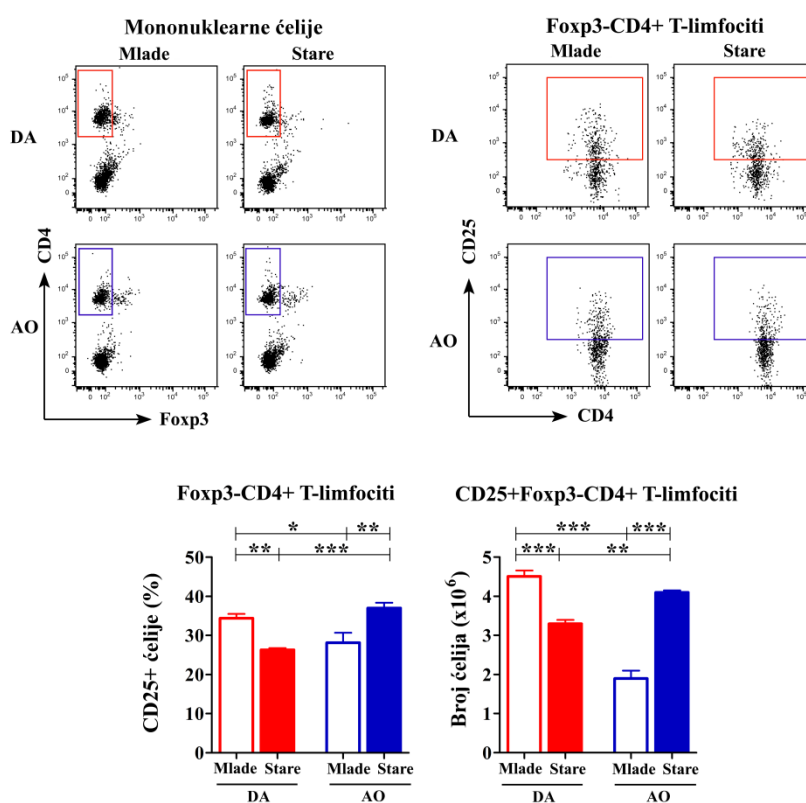


**Slika 27. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita i ukupan broj CD134+CD4+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protocitofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje CD134 u subpopulaciji CD4+ T-limfocita (koje su izdvojene kao što je ilustrovano na slici 26) drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. CD134+ ćelije su uokvirane na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj CD134+CD4+ T-limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD134+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita [ $F_{(1,20)}=37,47$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=77,28$ ;  $p \leq 0,001$ ] u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih životinja. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Analiza aktivacionog statusa CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima uključila je i ispitivanje ekspresije aktivacijskog molekula CD25 na subsetu konvencionalnih Foxp3- ćelija ove subpopulacije. Ova analiza je pokazala sličan obrazac uzrasno i sojno zavisnih razlika onom koji je opisan u ekspresiji CD134 molekula na CD4+ T-limfocitima. Kod mladih pacova procentualna zastupljenost CD25+ ćelija u okviru subeta Foxp3-CD4+ T-limfocita bila je veća ( $p \leq 0,01$ ) kod DA nego kod AO pacova (Slika 28). Starenjem se njihova procentualna zastupljenost smanjivala ( $p \leq 0,01$ ) kod DA pacova, a povećavala ( $p \leq 0,01$ ) kod AO pacova (Slika 28). Posledično, procentualna zastupljenost CD25+ ćelija u okviru Foxp3-CD4+ subeta T-

limfocita bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) kod starih DA u odnosu na stare AO pacove (Slika 28).

Ukupan broj aktivisanih konvencionalnih CD25+Foxp3-CD4+ T-limfocita bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova u poređenju sa AO pacovima istog uzrasta (Slika 28). Starenjem se ukupan broj ovih ćelija kod DA pacova smanjivao ( $p \leq 0,001$ ), dok se kod AO pacova povećavao ( $p \leq 0,001$ ) (Slika 28). Posledično, ukupan broj ovih ćelija je stoga bio manji ( $p \leq 0,01$ ) kod starih DA u odnosu na stare AO pacove (Slika 28).



**Slika 28. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u okviru Fopx3-CD4+ ćelija i ukupan broj CD25+Fopx3-CD4+ ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (levo) prikazuju CD4 vs Fopx3 imunocitohemijsko bojenje mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova (Fopx3-CD4+ ćelije su uokvirene na svakom profilu), i (desno) bojenje CD25+ ćelija u subsetu Fopx3-CD4+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova (CD25+ ćelije uokvirene su na svakom profilu). Histogrami prikazuju (levi) procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu Fopx3-CD4+ ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih mladih i starih DA i AO pacova i (desni) ukupan broj CD25+Fopx3-CD4+ ćelija izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u subsetu CD4+Fopx3- ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA i AO pacova [ $F_{(1,20)}=29,54$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj CD25+CD4+Fopx3- ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima [ $F_{(1,20)}=155$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

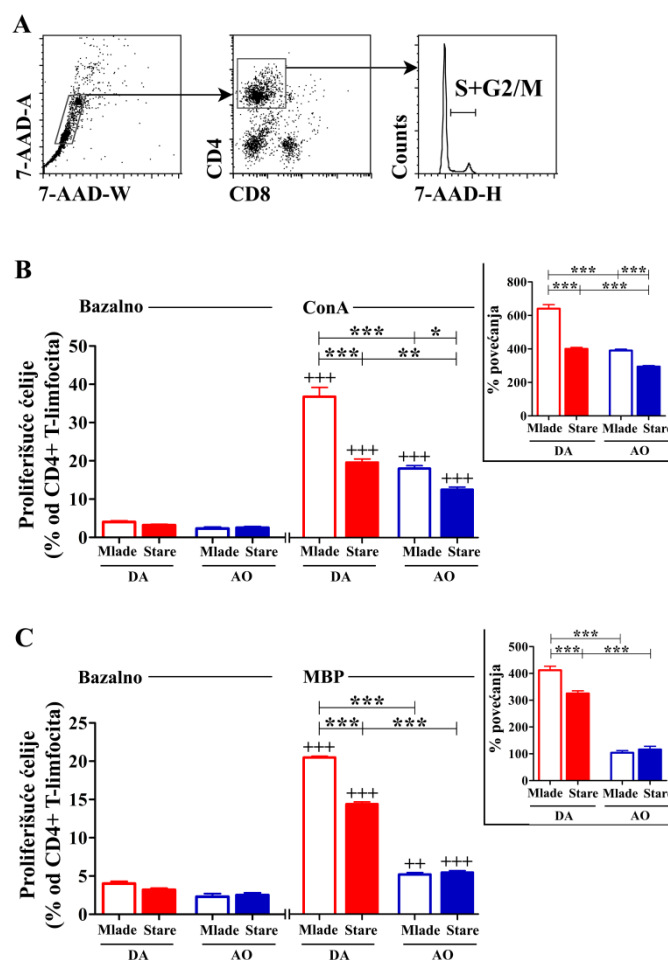
Budući da svi aktivisani CD4<sup>+</sup> T-limfociti neće proliferisati (Laouar i Crispe, 2000; Sojka i sar., 2008), ispitivanja su nastavljena analizom njihove proliferacije u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova u bazalnim uslovima (u odsustvu bilo kakvog poznatog stimulatora-kontrolne kulture), kao i u odgovoru na stimulaciju mitogenom-ConA (ConA<sup>+</sup> kulture) i neuroantigenom-MBP-om (MBP<sup>+</sup> kulture). U odgovoru na stimulaciju i mitogenom i neuroantigenom proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita u svim kulturama drenirajućih limfnih čvorova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture (kulture ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz životinja istog soja i uzrasta) (Slika 29).

U ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova nađena je veća ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost proliferišućih ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita u poređenju sa kulturama ovih ćelija mladih AO pacova (Slika 29). Poređenje kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih pacova pokazalo je da se starenjem smanjuje proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita i DA ( $p \leq 0,001$ ) i AO ( $p \leq 0,05$ ) pacova (Slika 29). Procentualna zastupljenost proliferišućih ćelija u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima bila je veća ( $p \leq 0,01$ ) u ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA nego starih AO pacova (Slika 29). Analiza procentualnog povećanja zastupljenosti proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita u ConA<sup>+</sup> kulturama u odnosu na kontrolne kulture pokazala je da je ono bilo veće ( $p \leq 0,001$ ) u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 29). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualnog povećanja zastupljenosti proliferišućih ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita u ConA<sup>+</sup> kulturama u odnosu na kontrolne kulture ćelija izolovanih iz pacova oba soja, ali je ono ostalo veće ( $p \leq 0,001$ ) u ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova u poređenju sa ConA<sup>+</sup> kulturama ovih ćelija izolovanih iz starih AO pacova (Slika 29).

Proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ispitana je i u odgovoru na MBP. Slično kao u ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova, u MBP<sup>+</sup> kulturama ovih ćelija mladih DA pacova procenat proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) nego u odgovarajućim kulturama mladih AO pacova (Slika 29). Uporedna analiza proliferacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova pokazala je da je, za razliku od ConA<sup>+</sup> kultura, proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita bila uporediva u

---

kulturama ćelija mladih i starih AO pacova (Slika 29). Međutim, u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova procentualna zastupljenost proliferišućih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) nego u odgovarajućim kulturama mladih pacova ovog soja (Slika 29). Kao u ConA+ kulturama, procentualna zastupljenost proliferišućih ćelija u CD4+ T-limfocitima bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u kulturama starih DA pacova nego u odgovarajućim kulturama starih AO pacova (Slika 29). Procentualno povećanje zastupljenosti proliferišućih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na ono u kontrolnim kulturama bilo je veće ( $p \leq 0,001$ ) u MBP+ kulturama mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 29). Takođe, ono je bilo veće ( $p \leq 0,001$ ) u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova nego odgovarajućim kulturama starih DA pacova, dok nije bilo značajne razlike u njenoj vrednosti u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih AO pacova (Slika 29). Posledično, veće ( $p \leq 0,001$ ) procentualno povećanje zastupljenosti proliferišućih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na kontrolne kulture bilo je u MBP+ kulturama ćelija starih DA pacova nego u MBP+ kulturama starih AO pacova (Slika 29).



**Slika 29. Uticaj starenja na zastupljenost proliferišućih ćelija u okviru CD4+ T-limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA i AO pacova. (Panel A)** Protočni-citofluorometrijski histogram prikazuje strategiju za izdvajanje (“gejtovanje”) ćelija u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa, detektovanih bojenjem nuklearnom bojom 7-AAD (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode), u okviru CD4+ limfocita (izdvojenih kao što je ilustrovano na desnom protočno-citofluorometrijskom tačkastom profilu). Levi protočno-citofluorometrijski tačkasti profil prikazuje eliminaciju ćelijskog debrija i dubleta. **(Panel B,C)** Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost proliferišućih ćelija (ćelija u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa) u okviru CD4+ limfocita u **(Panel B,C)** kulturama drenirajućih limfnih čvorova bez dodatog stimulatora i u **(Panel B)** ConA i **(Panel C)** MBP-om stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA i AO pacova. **(Panel B,C umetak)** Histogrami prikazuju procenat povećanja zastupljenosti proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita u **(Panel B)** ConA+ i **(Panel C)** MBP+ kulturama u odnosu na kontrolne kulture ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA i AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za **(Panel B)** procenat zastupljenosti proliferišućih ćelija u okviru CD4+ limfocita u ConA+ kulturama [ $F_{(1,20)}=17,78$ ;  $p \leq 0,001$ ] i procenat povećanja proliferišućih ćelija [ $F_{(1,20)}=27,39$ ;  $p \leq 0,001$ ] i **(Panel C)** procenat zastupljenosti proliferišućih ćelija u okviru CD4+ limfocita u MBP+ kulturama [ $F_{(1,20)}=173,1$ ;  $p \leq 0,001$ ] i procenat povećanja proliferišućih ćelija [ $F_{(1,20)}=18,39$ ;  $p \leq 0,001$ ] \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .+ vs bazalna proliferacija u kulturama drenirajućih limfnih čvorova pacova odgovarajućeg uzrasta i soja. ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ .

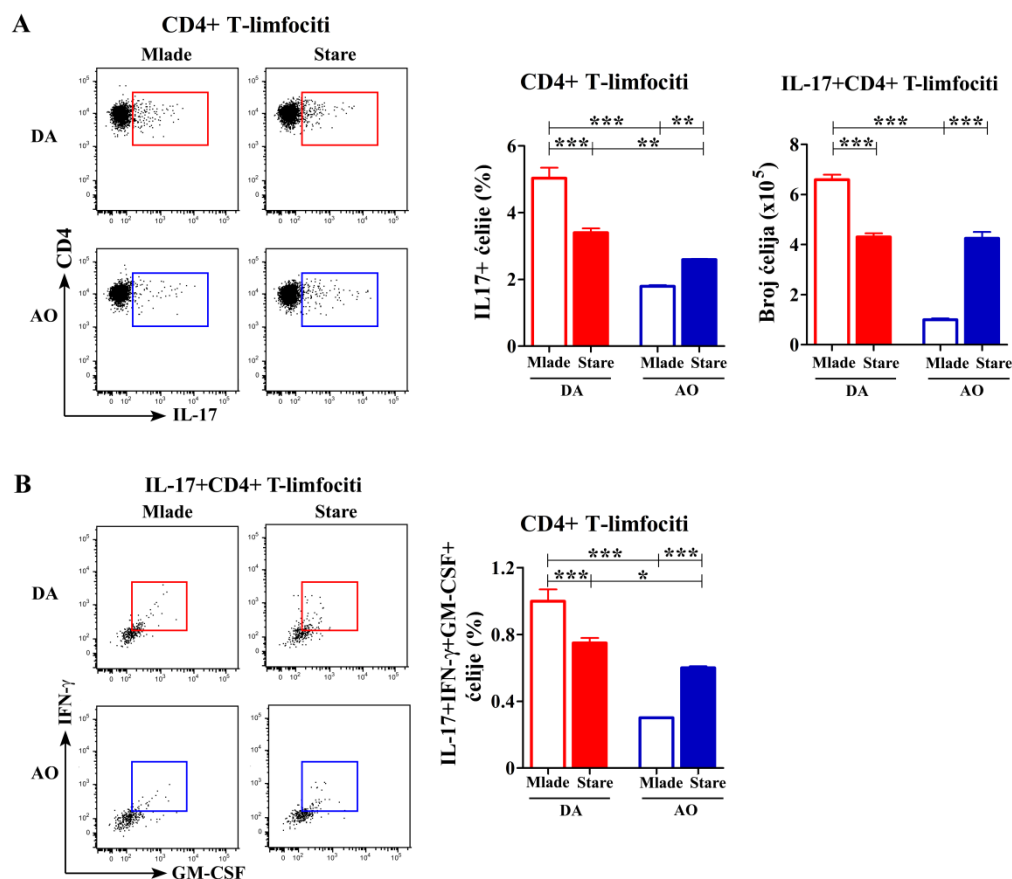


#### 4.4.2. Uticaj starenja na zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova

Imajući u vidu značaj IL-17+ (Komiyama i sar., 2006; Damsker i sar., 2010) i IFN- $\gamma$ + (Merrill i sar., 1992; Olsson, 1992; Sanvito i sar., 2010) CD4+ T-limfocita u razvoju EAE-a, ispitivana je ekspresija ova dva citokina u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.

Dobijeni rezultati su pokazali veću ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova nego mladih AO pacova (Slika 30A). Starenje je imalo suprotan efekat na procentualnu zastupljenost ovih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita DA and AO pacova, budući da se ona smanjila ( $p \leq 0,001$ ) kod DA pacova, a povećala ( $p \leq 0,01$ ) kod AO pacova (Slika 30A). Međutim, bez obzira na suprotan efekat starenja kod DA i AO pacova, kod starih DA pacova nađena je veća ( $p \leq 0,01$ ) procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita nego kod starih AO pacova (Slika 30A).

Ukupan broj IL-17+CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod AO pacova istog uzrasta (Slika 30A). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) ukupnog broja ovih ćelija kod DA pacova, ali je povećalo njihov broj ( $p \leq 0,001$ ) kod AO pacova (Slika 30A). Posledično, ukupan broj IL-17+CD4+ T-limfocita se nije značajno razlikovao između starih DA i AO pacova (Slika 30A).

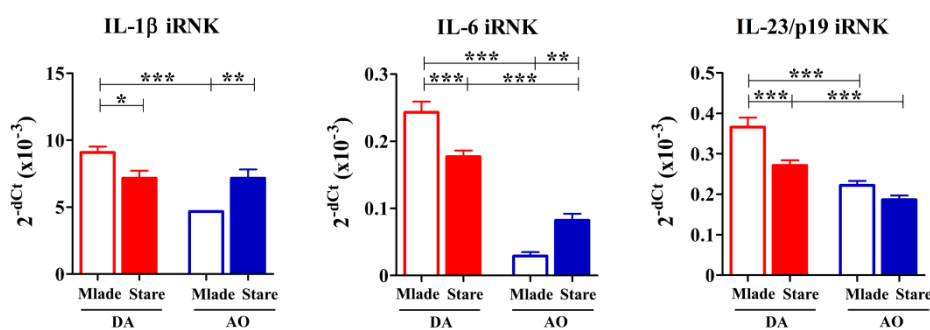


**Slika 30. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a. (Panel A)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje IL-17+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomycinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IL-17+ ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj IL17+CD4+ T-limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja. **(Panel B)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ u IL-17+CD4+ T-limfocitima. IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. CD4+ T-limfociti su izdvojeni iz suspenzije mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova metodom magnetnog izdvajanja (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode), a IL17+CD4+ T-limfociti su izdvojeni ("gejtovani") kao što je ilustrovano na panelu A. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova, a koja je izračunata na osnovu podataka o procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima, kao i o procentualnoj zastupljenosti IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u IL-17+ CD4+ T-limfocitima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima [ $F_{(1,20)}=52,09$ ;  $p \leq 0,001$ ], ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=241,6$ ;  $p \leq 0,001$ ] u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih životinja i procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija [ $F_{(1,20)}=51,26$ ;  $p \leq 0,001$ ] u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Imajući u vidu, kao što je prethodno već rečeno, da najveći stepen patogenosti kod miša i čoveka pokazuju IL-17+CD4+ T-limfociti koji koeksprimiraju IFN- $\gamma$  i GM-CSF (El Behi i sar., 2011; Coddari i sar., 2011; Sheng i sar., 2014; McWilliams i sar., 2015), ispitivana je zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima. Procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima izračunata je iz procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima, kao i procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u IL-17+CD4+ T-limfocitima.

Kod mladih pacova DA soja utvrđena je veća ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost trostruko pozitivnih IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita nego kod mladih AO pacova (Slika 30B). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenosti ovih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita kod DA pacova, a povećavalo ( $p \leq 0,001$ ) njihovu zastupljenost u ovoj subpopulaciji AO pacova (Slika 30B). Stari DA pacovi imali su ipak veću ( $p \leq 0,05$ ) procentualnu zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita nego stari AO pacovi (Slika 30B).

U sledećem koraku ispitivana je ekspresija iRNK za IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23/p19, citokine koji, kao što je već prethodno navedeno, imaju ključnu ulogu u usmeravanju/održavanju diferencijacije Th17 limfocita (Ghoreschi i sar., 2010; McGeachy i sar., 2007; Zhou i sar., 2009). Njihova ekspresija bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova nego u odgovarajućim ćelijama mladih AO pacova (Slika 31). Starenjem se ekspresija iRNK za ove citokine u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova DA pacova smanjivala ( $p \leq 0,001$  za IL-6 i IL23/p19;  $p \leq 0,05$  za IL-1 $\beta$ ), dok je kod AO pacova došlo do povećanja ( $p \leq 0,01$ ) ekspresije iRNK za IL-6 i IL-1 $\beta$ , a ekspresija iRNK za IL23/p19 nije se menjala (Slika 31). Nije bilo razlike u ekspresiji iRNK za IL-1 $\beta$  u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova starih DA i AO pacova (Slika 31). Međutim, ekspresija iRNK za IL-6 i IL23/p19 bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova u poređenju sa njihovom ekspresijom u odgovarajućim ćelijama starih AO pacova (Slika 31).

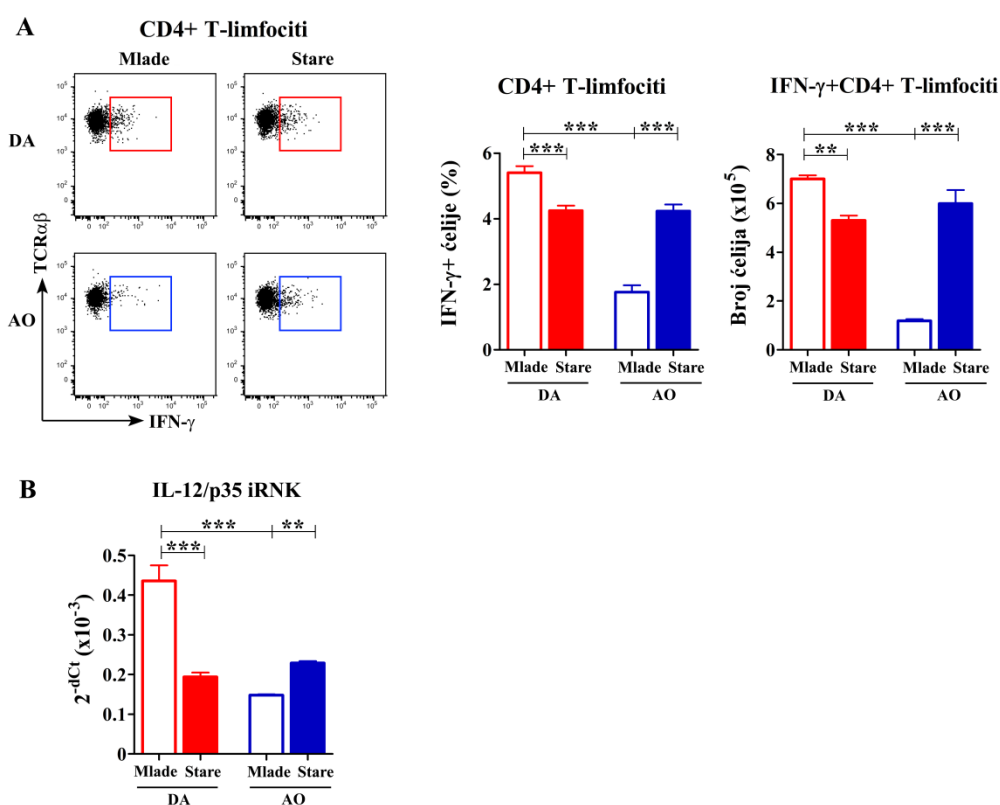


**Slika 31. Ekspresija iRNK za citokine značajne za polarizaciju Th17 ćelija u monoklearnim ćelijama izolovanim iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Histogrami prikazuju redom (s leva na desno) ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-6 i IL-23/p19 u monoklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. Rezultati su izraženi kao  $2^{-dCt}$  vrednosti [n=6/grupa (mlade) i n=9/grupa (stare)]. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za ekspresiju iRNK IL-1 $\beta$  [ $F_{(1,26)}=15,06$ ;  $p\leq 0,001$ ] i IL-6 [ $F_{(1,26)}=30,82$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Imajući u vidu podatke, koji ukazuju da bi IFN- $\gamma$  mogao da ima značajnu modulatornu ulogu u razvoju EAE-a (Arellano i sar., 2015), ekspresija ovog citokina je ispitivana u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova AO i DA pacova oba uzrasta. Procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-limfocita bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova u poređenju sa drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova istog uzrasta (Slika 32). Starenje je u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova dovelo do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD4+T-limfocitima (Slika 32). Nasuprot ovome, starenjem se povećala ( $p\leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova (Slika 32). Kao rezultanta ovih promena, kod starih pacova procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija bila je uporediva u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova AO i DA pacova (Slika 32).

Ukupan broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima bio je veći ( $p\leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod mladih AO pacova (Slika 32). Starenjem se smanjivao ( $p\leq 0,01$ ) ukupan broj ovih ćelija kod DA pacova (Slika 32). Suprotno ovome, starenjem se povećavao ( $p\leq 0,001$ ) broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova (Slika 32). Posledično, ukupan broj ovih ćelija nije se bitno razlikovao u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO i DA pacova (Slika 32).

Imajući u vidu ključnu ulogu IL-12 u diferencijaciji Th1 limfocita (Prochazkova i sar., 2012) u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova AO i DA pacova oba uzrasta kvantifikovana je ekspresija transkripta gena za IL-12. Ekspresija iRNK za IL-12/p35 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova mladih DA pacova bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) nego u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova (Slika 32). Starenje je imalo suprotan efekat na ekspresiju iRNK za ovaj citokin, tako da se ona smanjivala ( $p \leq 0,001$ ) u ćelijama DA pacova, a povećavala ( $p \leq 0,01$ ) u ćelijama AO pacova (Slika 32). Posledično, nije bilo značajne razlike u ekspresiji iRNK za IL-12/p35 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova starih DA i AO pacova (Slika 32).



**Slika 32. Uticaj starenja na ekspresiju IFN- $\gamma$  u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a. (Panel A)** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih imunizovanih DA i AO pacova. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IFN- $\gamma$ + ćelije uokvirene su na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja i (desno) ukupan broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova ispitivanih životinja. **(Panel B)** Histogram prikazuje ekspresiju iRNK za IL12/p35, citokina značajnog za diferencijaciju Th1 ćelija, u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Rezultati ekspresije iRNK za IFN- $\gamma$  i IL12/p35 izraženi su kao  $2^{-\Delta Ct}$  vrednosti [ $n=6$ /grupa (mlade) i  $n=9$ /grupa (stare)]. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja

---

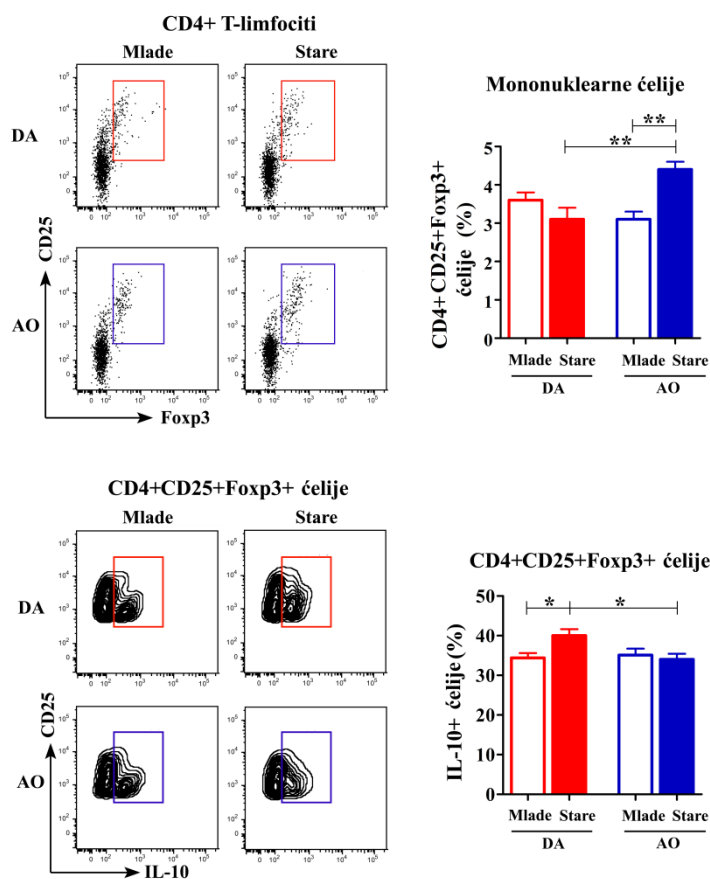
za procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$  + ćelija u CD4+ T-limfocitima [ $F_{(1,20)}=92,47$ ;  $p\leq 0,001$ ], ukupan broj ovih ćelija [ $F_{(1,20)}=114,6$ ;  $p\leq 0,001$ ] u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih životinja i ekspresiju iRNK za IL12/p35 [ $F_{(1,26)}=86,78$ ;  $p\leq 0,05$ ] u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

4.4.3. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a

Imajući u vidu delovanje CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocita na proliferaciju CD4+ T-limfocita, kao i na sintezu citokina od strane ovih ćelija (Sojka i sar., 2008; Schmidt i sar., 2012), ispitana je i procentualna zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova oba uzrasta u induktivnoj fazi EAE-a.

Kod mladih pacova oba soja nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz drenirajućih limfnih čvorova (Slika 33). Starenjem je došlo do blagog smanjenja procentualne zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u okviru mononuklearnih ćelija DA pacova, koje nije bilo statistički značajno. Kod AO pacova starenje je dovelo do povećanja ( $p\leq 0,01$ ) njihove zastupljenosti u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova (Slika 33). Posledično, kod starih pacova veća ( $p\leq 0,01$ ) procentualna zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ ćelija detektovana je u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova AO nego DA pacova (Slika 33).

U narednom koraku ispitana je procentualna zastupljenost IL-10+ ćelija u CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocitima. Kod mladih pacova nije nađena razlika u zastupljenosti ovih ćelija (Slika 33). Starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,05$ ) zastupljenosti IL-10+ ćelija u CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocitima kod DA pacova, ali nije dovelo do promene u njihovoj zastupljenosti kod AO pacova (Slika 33). Posledično, kod starih pacova veća ( $p\leq 0,05$ ) zastupljenost IL-10+ ćelija u CD4+CD25+Foxp3+ T-limfocitima nađena je kod DA pacova u poređenju sa AO pacovima (Slika 33).



**Slika 33. Uticaj starenja na zastupljenost CD4+ Treg limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprerentativni protočnoscitofluorometrijski profili prikazuju (gornji tačkasti) CD25 vs Fxp3 imunocitohemijsko bojenje CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova (CD25+Fxp3+ ćelije su uokvirene na svakom profilu) i (donji konturni) imunocitohemijsko bojenje IL-10+ ćelija u okviru CD4+CD25+Fxp3+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA i AO pacova (IL10+ ćelije su uokvirene na svakom profilu). Histogrami prokazuju (gornji) procentualnu zastupljenost CD4+CD25+Fxp3+ ćelija u okviru mononuklearnih ćelija i (donji) procentualnu zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru CD4+CD25+Fxp3+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD4+CD25+Fxp3+ ćelija u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova [ $F_{(1,20)}=15,43$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za procentualnu zastupljenost IL-10+ ćelija u okviru CD4+CD25+Fxp3+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova [ $F_{(1,20)}=5,06$ ;  $p \leq 0,05$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### 4.4.4. Uticaj starenja na dendritske ćelije izolovane iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a

Dendritske ćelije predstavljaju najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije, i one su uključene u započinjanje (auto)imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima (Ganguly i sar., 2013). S obzirom na to da je pokazano da konvencionalne dendritske

---

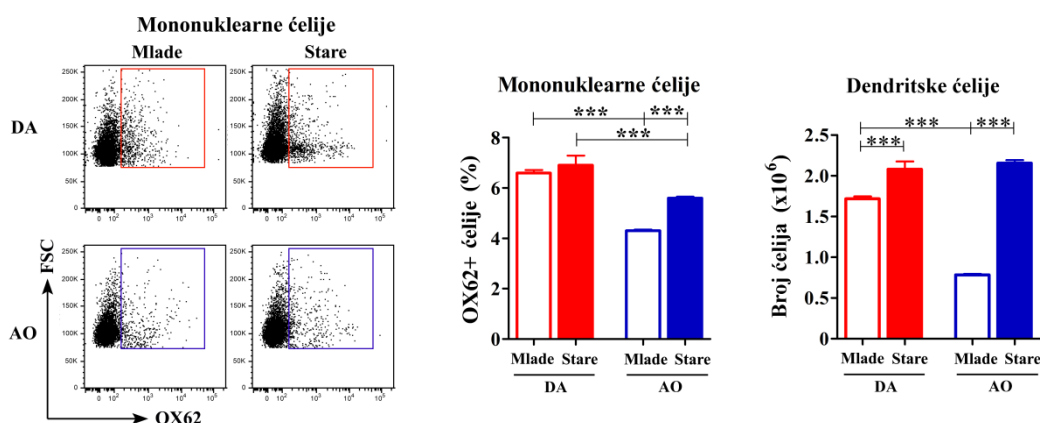
ćelije imaju posebno važnu ulogu u aktivaciji i polarizaciji autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u EAE-u (McMahon i sar., 2005; Greter i sar., 2005), ispitan je i procenat i broj konvencionalnih dendritskih ćelija, kao i njihove fenotipske odlike.

*4.4.4.1. Uticaj starenja na zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim ćvorovima AO i DA pacova u induktivnoj fazi EAE-a i odnos aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija i konvencionalnih CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocita*

Procentualna zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija bila je veća ( $p \leq 0,001$ ) u populaciji mononuklearnih ćelija sveže izolovanih iz drenirajućih limfnih ćvorova mladih DA pacova nego u ovoj populaciji AO pacova istog uzrasta (Slika 34). Starenje nije imalo uticaja na procentualnu zastupljenost ovih ćelija u populaciji mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih ćvorova DA pacova (Slika 34). S druge strane, starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti konvencionalnih dendritskih ćelija u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih ćvorova AO pacova (Slika 34). Ipak, u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih ćvorova starih AO pacova bila je manja ( $p \leq 0,001$ ) procentualna zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija nego u ovim ćelijama starih DA pacova (Slika 34).

Analiza broja konvencionalnih dendritskih ćelija je pokazala da je njihov broj bio veći ( $p \leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim ćvorovima mladih DA nego mladih AO pacova (Slika 34). Starenje je dovelo do porasta ( $p \leq 0,001$ ) broja konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim ćvorovima oba soja pacova, tako da se on nije razlikovao u drenirajućim limfnim ćvorovima starih DA i AO pacova (Slika 34).



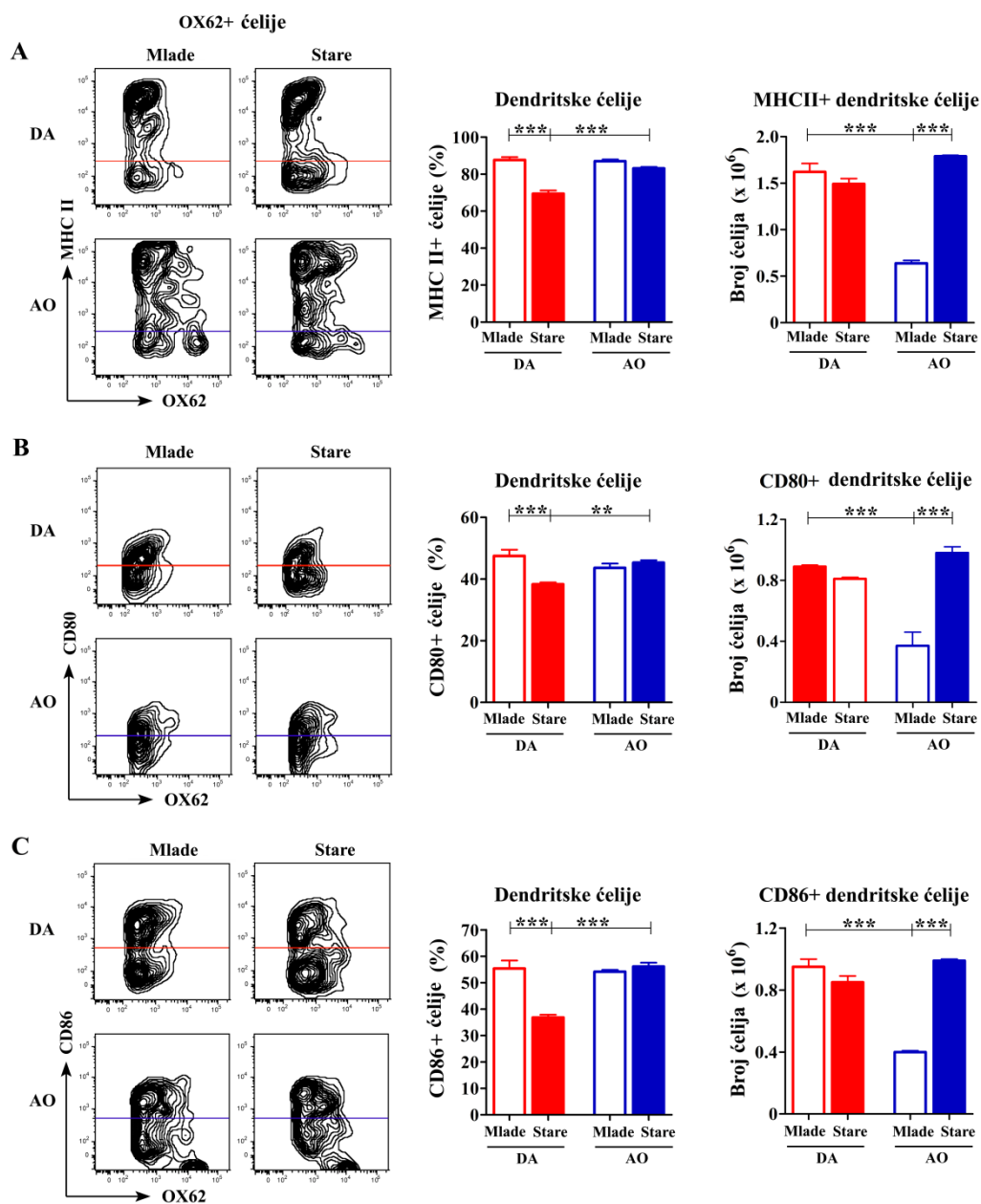


**Slika 34. Uticaj starenja na zastupljenost konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima AO i DA pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje OX62+ dendritskih ćelija u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova. OX62+ dendritske ćelije su uokvirane na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levi) procentualnu zastupljenost OX62+ dendritskih ćelija u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova i (desni) broj OX62+ dendritskih ćelija izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova u induktivnoj fazi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost OX62+ dendritskih ćelija u okviru mononuklearnih ćelija [ $F_{(1,20)}=6,06$ ;  $p\leq 0,05$ ] i ukupan broj OX62+ dendritskih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova [ $F_{(1,20)}=109,4$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Imajući u vidu da se po preuzimanju antigena dendritske ćelije aktivišu i sazrevaju ushodno regulišiću ekspresiju MHC molekula II klase, kao i kostimulatornih molekula (CD80, CD86) (Cella i sar., 1997; 1999), ispitana je i procentualna zastupljenost ćelija koje ekspiriraju MHC molekule II klase, kao i onih koje ekspiriraju CD80 i CD86 molekule na svojoj površini. Nije uočena razlika u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje ekspiriraju MHC molekule II klase, kao i CD80 i CD86 u okviru konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA i AO pacova (Slika 35). U drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova starenje nije uticalo na promenu u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje ekspiriraju MHC molekule II klase, kao i CD80 i CD86 u konvencionalnim dendritskim ćelijama, dok je u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova dovelo do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija (Slika 35). Posledično, u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova bila je veća procentualna zastupljenost ćelija koje ekspiriraju MHC molekule II klase ( $p\leq 0,001$ ), kao i CD80 ( $p\leq 0,01$ ) i CD86 ( $p\leq 0,001$ ) u subpopulaciji konvencionalnih dendritskih ćelija nego u ovoj subpopulaciji starih DA pacova (Slika 35).

---

U sledećem koraku određen je broj aktivisanih dendritskih ćelija. Broj CD80+ konvencionalnih dendritskih ćelija bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova nego u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova (Slika 35). Starenje nije uticalo na promenu u broju ovih ćelija kod DA pacova, ali je kod AO pacova dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) njihovog broja (Slika 35). Nije bilo značajne razlike u broju CD80+ konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA i AO pacova (Slika 35). Sličan obrazac sojnih i uzrastnih promena su pokazale i MHC II+ konvencionalne dendritske ćelije, kao i CD86+ konvencionalne dendritske ćelije.

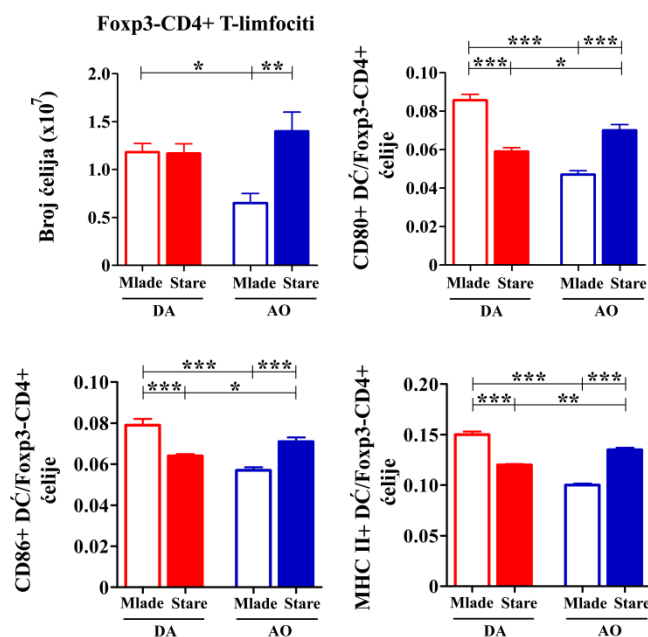


**Slika 35. Uticaj starenja na procentualnu zastupljenost ćelija koje eksprimiraju MHC molekule II klase, kao i kostimulatorne molekule CD80 i CD86 u okviru konvencionalnih dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje (**Panel A**) MHC II+, (**Panel B**) CD80+ i (**Panel C**) CD86+ ćelija u okviru OX62+ dendritskih ćelija (izdvajanje OX62+ dendritskih ćelija ilustrovano je na slici 34). Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost (**Panel A**) MHC II+, (**Panel B**) CD80+, (**Panel C**) CD86+ ćelija u okviru OX62+ dendritskih ćelija i ukupan broj (**Panel A**) MHC II+OX62+ (**Panel B**) CD80+OX62+, (**Panel C**) CD86+ OX62+ dendritskih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost (**Panel A**) MHC II+ [ $F_{(1,20)}=35,3$ ;  $p\leq 0,001$ ], (**Panel B**) CD80+ [ $F_{(1,20)}=17,21$ ;  $p\leq 0,001$ ] i (**Panel C**) CD86+ ćelija [ $F_{(1,20)}=33,45$ ;  $p\leq 0,001$ ] u okviru OX62+ dendritskih ćelija i za ukupan broj (**Panel A**) MHC II+OX62+

---

[ $F(1,20)=43,23; p\leq 0,001$ ], (**Panel B**)  $CD80+OX62+$  [ $F(1,20)=28,37; p\leq 0,001$ ] i (**Panel C**)  $CD86+OX62+$  [ $F(1,20)=44,16; p\leq 0,001$ ] dendritskih ćelija. \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

S obzirom na to da ishod interakcije konvencionalnih dendritskih ćelija i konvencionalnih/efektorskih  $CD4+$  T-limfocita zavisi od njihovog brojčanog odnosa (Allenspach i sar., 2008), izračunat je odnos aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija i  $Foxp3-$  konvencionalnih  $CD4+$  T-limfocita. U tom cilju određen je broj  $Foxp3-CD4+$  T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA i AO pacova oba uzrasta. Kod mladih pacova veći ( $p\leq 0,05$ ) broj ovih ćelija izolovan je iz drenirajućih limfnih čvorova DA nego AO pacova (Slika 36). Starenje nije dovelo do promene broja  $Foxp3-CD4+$  T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova, ali je dovelo do povećanja ( $p\leq 0,01$ ) broja ovih ćelija kod AO pacova (Slika 36). Posledično, kod starih pacova nije bilo razlike u broju  $Foxp3-CD4+$  T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima (Slika 36). Na osnovu ovih brojeva i prethodno navedenih brojeva aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija, određen je odnos aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija i  $Foxp3-CD4+$  T-limfocita. Kod mladih DA pacova ovaj odnos je bio pomećen ( $p\leq 0,001$ ) na stranu aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 36). Za razliku od DA pacova, kod kojih se ovaj odnos sa starenjem smanjivao ( $p\leq 0,001$ ) na račun aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija, kod AO pacova se povećavao ( $p\leq 0,001$ ), odražavajući veću zastupljenost upravo aktivisanih/zrelih konvencionalnih dendritskih ćelija (Slika 36). Ovo poslednje je koreliralo sa prethodno pokazanim (Slika 28) većim brojem aktivisanih efektorskih  $CD25+Foxp3-CD4+$  T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova u poređenju sa brojem ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova. Sledstveno, kod starih AO pacova odnos  $CD80+$  konvencionalnih dendritskih ćelija/ $FoxP3-CD4+$  T-limfocita bio je pomećen ( $p\leq 0,05$ ) na stranu  $CD80+$  konvencionalnih dendritskih ćelija (Slika 36), što je koreliralo sa prethodno pokazanim (Slika 28) većim brojem aktivisanih efektorskih  $CD25+Foxp3-CD4+$  T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova u poređenju sa njihovim brojem u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova. Sličan obrazac sojnih i uzrasnih promena utvrđen je i kada je ispitan odnos  $CD86+$  konvencionalnih dendritskih ćelija/ $FoxP3-CD4+$  ćelija i  $MHC II+$  konvencionalnih dendritskih ćelija/ $FoxP3-CD4+$  T-ćelija (Slika 36).



**Slika 36. Uticaj starenja na količnik ukupnog broja MHC II+/CD80+/CD86+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Histogrami prikazuju (gornji) ukupan broj Foxp3-CD4+ T-limfocita (levo) i količnik ukupnog broja CD80+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija (desno) i (donji) količnik ukupnog broja CD86+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija (levo) i količnik ukupnog broja MHC II+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija (desno). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ /grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za ukupan broj Foxp3-CD4+ ćelija [ $F_{(1,20)}=8,55$ ;  $p \leq 0,01$ ], količnik ukupnog broja CD80+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija [ $F_{(1,20)}=95$ ;  $p \leq 0,001$ ], količnik ukupnog broja CD86+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija [ $F_{(1,20)}=52,37$ ;  $p \leq 0,001$ ] i količnik ukupnog broja MHC II+ dendritskih ćelija i Foxp3-CD4+ ćelija [ $F_{(1,20)}=263,1$ ;  $p \leq 0,001$ ]. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.4.5. Uticaj starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike efektorskih CD8+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a

U modelima EAE-a, koje karakteriše slabo izražen neurološki deficit (kao u modelu EAE-a kod starih AO i DA pacova) CD8+ T-limfociti imaju važnu ulogu u drenirajućim limfnim čvorovima pomažući (neuro)antigen-specifičnim CD4+ T-limfocitima da diferenciraju u patogene efektorske ćelije, što je opisano kao “reverzna pomoć” (*engl. reverse help*) (Camara i sar., 2013). Shodno ovim nalazima, ispitivanje

ćelija drenirajućih limfnih čvorova je produbljeno analizom fenotipskih i funkcijskih katarakteristika CD8+ T limfocita.

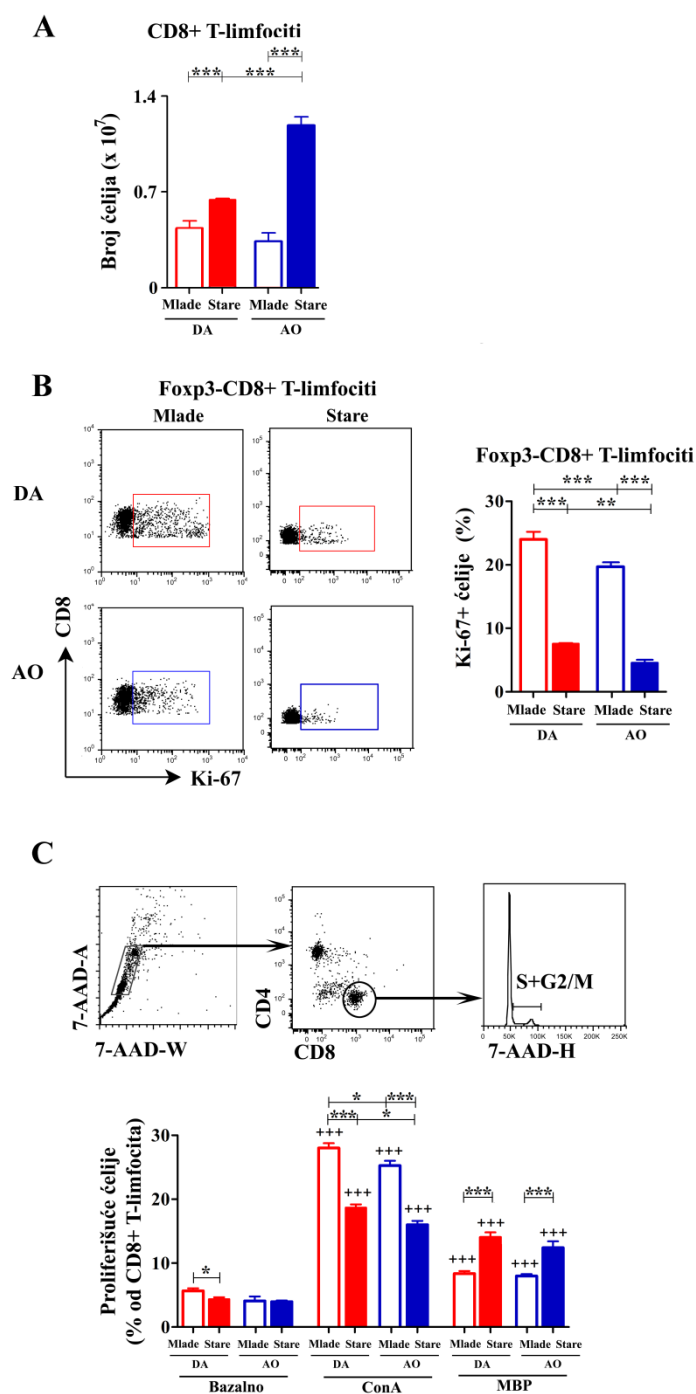
#### 4.4.5.1. Uticaj starenja na zastupljenost CD8+ T-limfocita i njihovu proliferaciju u drenirajućim limfnim čvorovima AO i DA pacova u induktivnoj fazi EAE-a

Kod mladih pacova ukupan broj CD8+ T-limfocita nije se razlikovao u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova (Slika 37A). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) ukupnog broja ovih ćelija kod pacova oba soja (Slika 37A). Međutim, ovo povećanje je bilo izraženije kod AO pacova, te je stoga bio veći ( $p \leq 0,001$ ) ukupni broj CD8+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova u odnosu na DA pacove istog uzrasta (Slika 37A).

Analiza procentualne zastupljenosti proliferišućih Ki-67+ ćelija u okviru subseta konvencionalnih Foxp3-CD8+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova pokazala je da je, bez obzira na uzrast, njihova procentualna zastupljenost veća ( $p \leq 0,01$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima DA nego AO pacova. (Slika 37B). Starenje je kod pacova oba soja uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti ovih ćelija u subsetu Foxp3-CD8+ T-limfocita (Slika 37B).

Budući da analiza proliferacije CD8+ T-limfocita *ex vivo* ne daje uvid u proliferaciju neuroantigen specifičnih CD8+ T-limfocita, ispitivanje je nastavljeno analizom njihove proliferacije u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Paralelno, kako bi se stekao uvid u proliferaciju CD8+ T-limfocita koja ne zavisi od prisustva antigen prezentujućih ćelija ispitana je njihova proliferacija u ConA+ kulturama. U svim ConA+ i MBP+ kulturama procenat proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD8+ T limfocita bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) nego u kontrolnim kulturama (Slika 37C). U ConA+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova DA pacova oba uzrasta proliferacija je bila veća ( $p \leq 0,05$ ) nego u kulturama ovih ćelija AO pacova odgovarajućeg uzrasta (Slika 37C). U ConA+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih pacova oba soja proliferacija je bila manja ( $p \leq 0,001$ ) nego u kulturama mladih pacova odgovarajućeg soja (Slika 37C). Procentualna zastupljenost proliferišućih ćelija u CD8+ T-limfocitima nije se razlikovala u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih AO i DA pacova (Slika 37C). Starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti proliferišućih ćelija u MBP+

kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova kako DA, tako i AO pacova (Slika 37C). Procenat proliferišućih ćelija u CD8<sup>+</sup> T-limfocitima nije se razlikovao u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih AO i DA pacova (Slika 37C).



Slika 37. Uticaj starenja na zastupljenost CD8<sup>+</sup> T-limfocita i njihovu proliferaciju u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a. (Panel A)

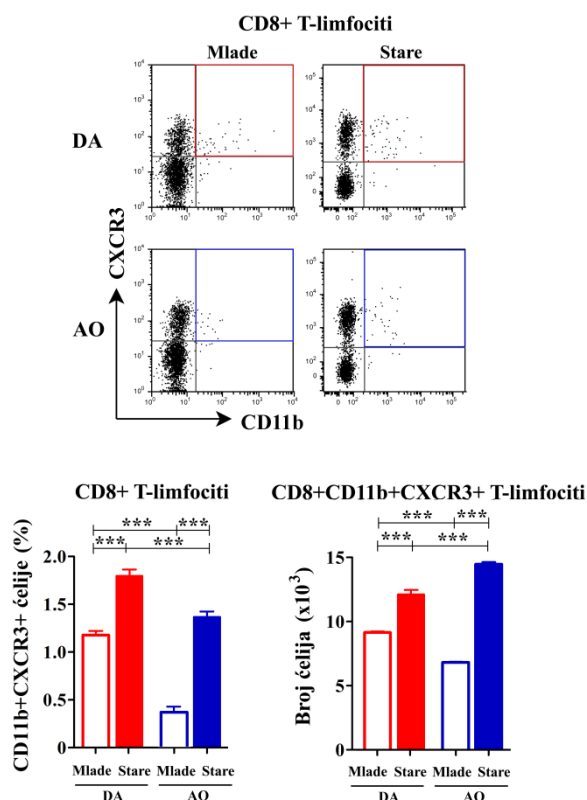
Histogram prikazuje ukupan broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova (**Panel B**) Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju bojenje Ki-67<sup>+</sup> ćelija u subsetu Foxp3-CD8<sup>+</sup> ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Ki-67<sup>+</sup> ćelije su uokvirane na svakom profilu. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost Ki67<sup>+</sup> ćelija u okviru Foxp3-CD8<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova. (**Panel C**) Protočni-citofluorometrijski histogram prikazuje strategiju za izdvajanje (“gejtovanje”) ćelija u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa, detektovanih bojenjem nuklearnom bojom 7-AAD (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode), u okviru CD8<sup>+</sup> limfocita (izdvojenih kao što je ilustrovano na desnom protočno-citofluorometrijskom tačkastom profilu). Levi protočno-citofluorometrijski tačkasti profil prikazuje eliminaciju ćelijskog debrija i dubleta. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost proliferišućih ćelija (ćelija u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa) u okviru CD8<sup>+</sup> limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova bez dodatog stimulatora i u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova stimulisanih sa ConA ili MBP-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovan iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi [ $F_{(1,20)}=51,18$ ;  $p\leq 0,001$ ]. \* $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ . + vs bazalna proliferacija u kulturama drenirajućih limfnih čvorova pacova odgovarajućeg uzrasta i soja. +++  $p\leq 0,001$ .

#### 4.4.5.2. Uticaj starenja na zastupljenost terminalno diferenciranih/efektorskih CD8<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima

Imajući u vidu da se sposobnost „reverzne pomoći“ pripisuje terminalno diferenciranim CD11b+CXCR3+CD8<sup>+</sup> T-limfocitima (Christensen i sar., 2001; Groom i Luster, 2011; Camara i sar., 2013), ispitana je ekspresija ovih markera na površini CD8<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova. Bez obzira na uzrast, procentualna zastupljenost CD11b+CXCR3<sup>+</sup> u okviru CD8<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) kod DA nego kod AO pacova (Slika 38). Starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti terminalno diferenciranih/efektorskih CD8<sup>+</sup> T-limfocita u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita pacova oba soja (Slika 38). Procentualna zastupljenost ovih ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita bila je veća ( $p\leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova u poređenju sa starim AO pacovima (Slika 38).

Ukupan broj terminalno diferenciranih/efektorskih CD8<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima bio je veći ( $p\leq 0,001$ ) kod mladih DA pacova nego kod mladih AO pacova (Slika 38). Starenje je uticalo na povećanje ( $p\leq 0,001$ ) ukupnog broja ovih ćelija kod oba soja pacova (Slika 38). Kod starih pacova njihov broj je bio veći ( $p\leq 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova u odnosu na DA pacove (Slika 38).





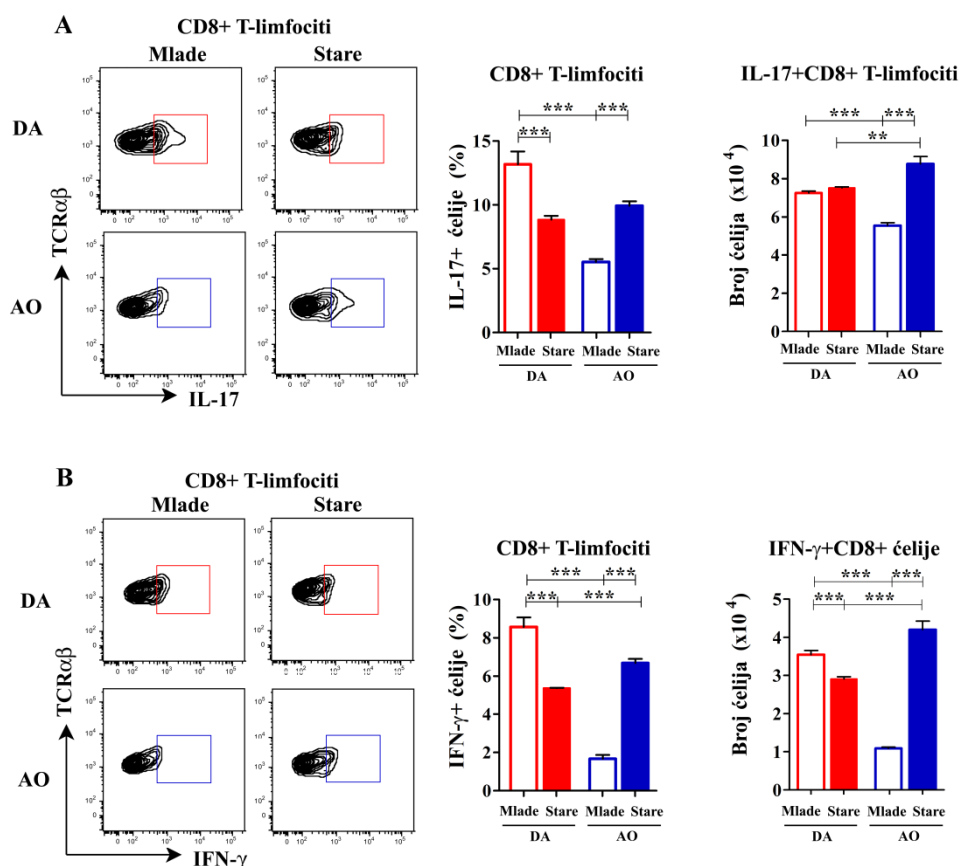
**Slika 38. Uticaj starenja na zastupljenost terminalno diferenciranih/efektorskih CD8+ T limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprerentativni protokno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju CD11b vs CXCR3 imunocitohemijsko bojenje CD8+ T-limfocita. CD11b+CXCR3+ ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogrami prikazuju (levi) procentualnu zastupljenost CD11b+CXCR3+ ćelija u okviru CD8+ T-limfocita i (desni) ukupan broj CD8+CD11b+CXCR3+ T limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost CD11b+CXCR3+ ćelija u okviru CD8+ T-limfocita [ $F_{(1,20)}=17,55$ ;  $p \leq 0,001$ ] i za ukupan broj CD8+CD11b+CXCR3+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova

#### 4.4.5.3. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 i IFN- $\gamma$ u CD8+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova izolovanih u induktivnoj fazi EAE-a

Budući da terminalno diferencirani CD8+ T-limfociti mogu sintetisati i IL-17 i IFN- $\gamma$  ispitivanja su nastavljena analizom procentualne zastupljenosti IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova AO i DA pacova oba uzrasta. Analiza je pokazala veću ( $p \leq 0,001$ ) procentualnu zastupljenost i IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ T-limfocita kod mladih DA pacova u poređenju sa mladim AO pacovima (Slika 39). Kod DA pacova starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti i IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita (Slika 39). Nasuprot ovome, kod AO pacova starenje je dovelo do povećanja ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti i IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita (Slika 39). U drenirajućim limfnim čvorovima starih AO i DA pacova nađena je slična procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u

subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita, dok je procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija bila veća ( $p \leq 0,001$ ) u okviru subpopulacije CD8<sup>+</sup> T-limfocita AO pacova u odnosu na njihovu zastupljenost u subpopulaciji ovih ćelija starih DA pacova (Slika 39).

Ukupan broj IL-17+CD8<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova bio je veći ( $p \leq 0,001$ ) nego u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova (Slika 39). Starenje je dovelo do smanjenja ( $p \leq 0,001$ ) ukupnog broja IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova, ali nije uticalo na ukupni broj IL-17+ CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Slika 39). S druge strane, kod AO pacova starenje je uticalo na povećanje ( $p \leq 0,001$ ) ukupnog broja i IL-17+CD8<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima (Slika 39). Posledično, ukupan broj i IL-17+ i IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> ćelija bio je značajno veći ( $p \leq 0,01$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova nego starih DA pacova (Slika 39).



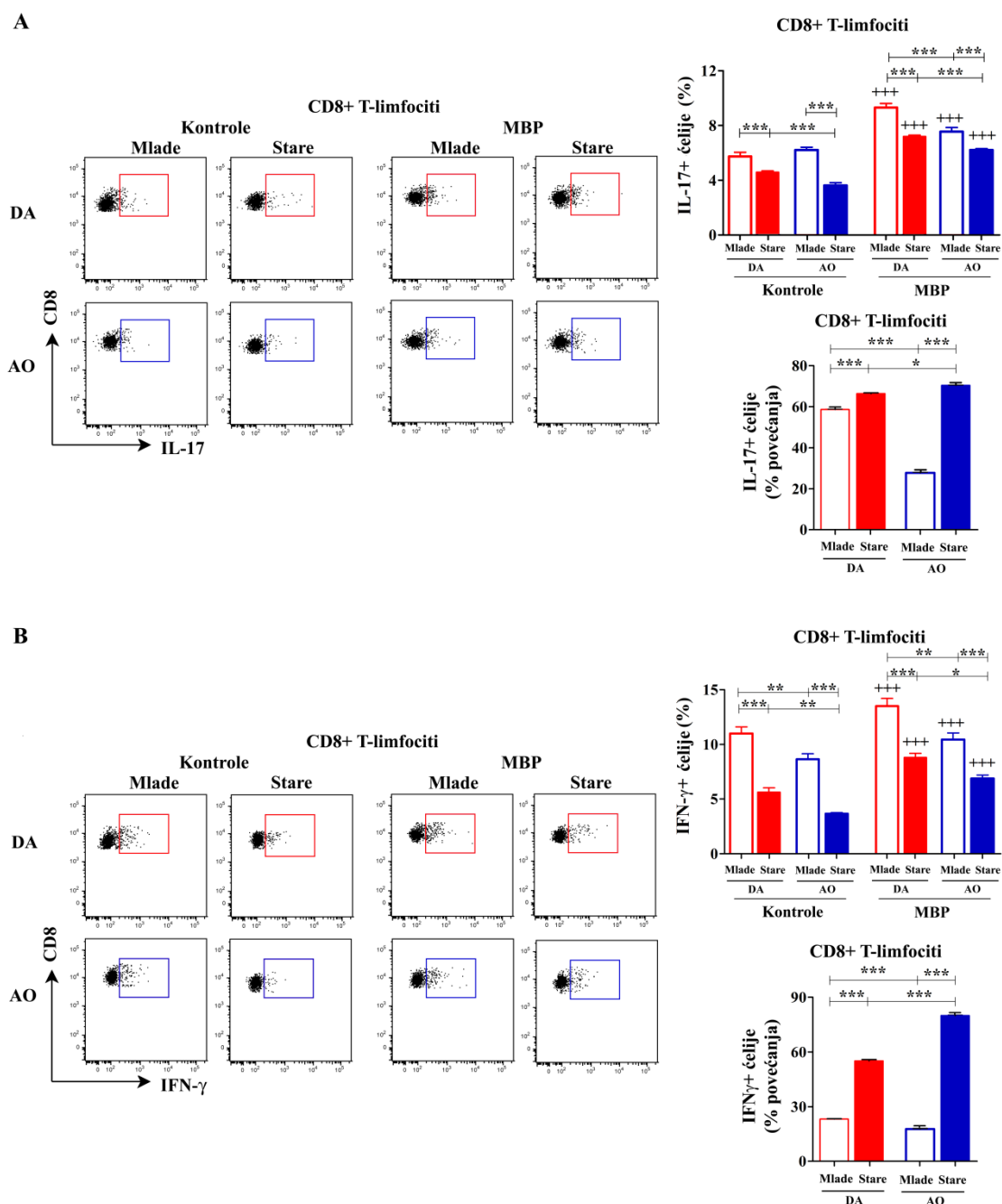
**Slika 39. Uticaj starenja na ekspresiju IL-17 i IFN- $\gamma$  u CD8+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje (**Panel A**) IL-17+ i (**Panel B**) IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD8+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a. Unutarćelijska ekspresija citokina određivana je posle 4h restimulacije PMA-om i jonomicinom (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). IL17+ i IFN- $\gamma$ + ćelije su uokvirene na svakom profilu. Histogrami prikazuju (**Panel A**) procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru CD8+ T-limfocita (levo) i ukupan broj IL-17+CD8+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova (desno), (**Panel B**) procentualnu zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru CD8+ T-limfocita (levo) i ukupan broj IFN- $\gamma$ +CD8+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova (desno). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL17+ [ $F_{(1,20)}=79,53$ ;  $p\leq 0,001$ ] i IFN- $\gamma$ + [ $F_{(1,20)}=130,4$ ;  $p\leq 0,001$ ] ćelija u CD8+ T-limfocitima i za ukupan broj IL-17+CD8+ [ $F_{(1,20)}=48,02$ ;  $p\leq 0,001$ ] i IFN- $\gamma$ +CD8+ [ $F_{(1,20)}=82,08$ ;  $p\leq 0,001$ ] T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih pacova u induktivnoj fazi. \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ .

Kako bi se utvrdilo da li uzrastne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelije u subpopulaciji CD8+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova reflektuju razlike u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje su specifične za neuroantigene, ispitana je promena procentualne zastupljenosti ovih ćelija u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture. Najpre je određena procentualna zastupljenost IL-17+ i IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama i kontrolnim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova. U kontrolnim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih DA i AO pacova nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita (Slika 40A). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u kontrolnim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova kod pacova oba soja, ali je njihova zastupljenost bila veća ( $p\leq 0,001$ ) kod starih DA nego starih AO pacova (Slika 40A). U MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova zabeležena je veća ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita nego u odgovarajućim kontrolnim kulturama (Slika 40A). Veća ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita zabeležena je u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova mladih DA nego AO pacova (Slika 40A). Starenje je dovelo do smanjenja ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenosti ovih ćelija u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova pacova oba soja, ali je kod starih pacova njihova veća ( $p\leq 0,001$ ) zastupljenost

nađena u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova DA nego AO pacova (Slika 40A). Povećanje procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture mladih DA pacova bilo je veće ( $p \leq 0,001$ ) u odnosu na povećanje procentualne zastupljenosti ovih ćelija u odgovarajućim kulturama mladih AO pacova (Slika 40A). Povećanje procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture je bilo više ( $p \leq 0,001$ ) izraženo u kulturama starih i DA i AO pacova u odnosu na kulture ovih ćelija mladih životinja odgovarajućeg soja (Slika 40A). U kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova povećanje procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita bilo je manje ( $p \leq 0,05$ ) izraženo nego u odgovarajućim kulturama starih AO pacova (Slika 40A).

Procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u kontrolnim kulturama drenirajućih limfnih čvorova bila je veća ( $p \leq 0,01$ ) kod DA nego AO pacova odgovarajućeg uzrasta (Slika 40B). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima u kontrolnim kulturama drenirajućih limfnih čvorova kod pacova oba soja (Slika 40B). U MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova DA i AO pacova zabeležena je veća ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita nego u odgovarajućim kontrolnim kulturama (Slika 40B). I u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova veća ( $p \leq 0,05$ ) zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita bila je kod DA nego AO pacova odgovarajućeg uzrasta (Slika 40B). Starenje je uticalo na smanjenje ( $p \leq 0,001$ ) zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova pacova oba soja (Slika 40B). Povećanje procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova mladih pacova u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture bilo je veće ( $p \leq 0,001$ ) u kulturama DA pacova nego u odgovarajućim kulturama AO pacova (Slika 40B). I kod DA i AO pacova povećanje procentualne zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture bilo je više ( $p \leq 0,001$ ) izraženo kod starih pacova u odnosu na povećanje

procentualne zastupljenosti ovih ćelija u odgovarajućim kulturama mladih pacova, ali je ono bilo izraženije ( $p \leq 0,001$ ) kod starih AO pacova nego starih DA pacova (Slika 40B).



**Slika 40. Uticaj starenja na zastupljenost MBP specifičnih CD8+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova u induktivnoj fazi EAE-a.** Reprezentativni protočno-citofluorometrijski konturni profili prikazuju imunocitohemijsko bojenje (**Panel A**) IL-17 i (**Panel B**) IFN- $\gamma$  u CD8+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova kultivisanih preko noći (levo) bez MBP-a (kontrola) i (desno) sa MBP-om (MBP+ kulture) (detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode). Histogrami prikazuju (gornji) procentualnu zastupljenost (**Panel A**) IL-17+ ćelija i (**Panel B**)

---

IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8+ T-limfocitima kičmene moždine u kontrolnim i MBP+ kulturama i (donji) **(Panel A)** procenat povećanja zastupljenosti IL-17+ i **(Panel B)** IFN- $\gamma$ + ćelija u MBP+ kulturama u odnosu na zastupljenost ovih ćelija u kontrolnim kulturama. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6/grupa). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata starenja i soja za procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u kontrolnim kulturama [ $F_{(1,20)}=45,06$ ;  $p \leq 0,001$ ] \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . + MBP+ kulture vs kontrolne kulture; +  $p \leq 0,05$ ; +++  $p \leq 0,001$ .

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Uticaj starenja na osetljivost na indukciju, kliničku i histološku sliku EAE-a kod DA i AO pacova

Rezultati dobijeni u okviru istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju su pokazali da starenje utiče na: 1) incidenciju EAE-a (indukovanog inokulacijom homogenata singene kičmene moždine u KFA-u uz ko-administraciju *B. pertussis*) u suprotnom smeru kod DA i AO pacova (smanjuje incidenciju EAE-a kod pacova osetljivog DA soja, a povećava kod relativno rezistentnog AO soja); 2) težinu maksimalnog neurološkog deficita i klinički tok EAE-a, tako što smanjuje težinu maksimalnog neurološkog deficita kod DA pacova, a kod pacova AO soja dovodi do razvoja relativno blagog neurološkog deficita protražovanog trajanja. Osim toga, rezultati su pokazali da promene u kliničkom ishodu inokulacije homogenata singene kičmene moždine u KFA-u koje nastaju starenjem reflektuju sojno-zavisne promene u različitim tipovima ćelija koje su uključene u autoimunski odgovor i njegovu kontrolu, na periferiji (ne samo u drenirajućim limfnim čvorovima, već i u slezini, kroz koju autoreaktivni T-limfociti aktivisani u drenirajućim limfnim čvorovima prolaze na putu do kičmene moždine) i u kičmenoj moždini, kao ciljnom organu.

Osetljivost mladih DA pacova, kao i relativna rezistencija mladih AO pacova, na ovakav način indukcije EAE-a u skladu je sa ranije objavljenim podacima (Vukmanovic i sar., 1989; Miljković i sar., 2011). Razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a pokazane su i između nekih drugih sojeva pacova i miševa (Lando i sar., 1979; Storch i sar., 2006; Constantinescu i sar., 2011; McCarthy i sar., 2012). Sojne specifičnosti u uticaju starenja na osetljivost na indukciju EAE-a su takođe pokazane (Endoh i sar., 1990; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005). Zavisno od životinjske vrste (pacov ili miš) i soja, starenje može da dovode kako do smanjenja osetljivosti na indukciju EAE-a (Ditamo i sar., 2005; Endoh i sar., 1990), tako i do povećanja osetljivosti (Matejuk i sar., 2005). Sojne razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a, osim genetskim razlikama koje evidentno postoje između oglednih životinja koje su korišćene u različitim studijama, mogu se pripisati: 1) razlikama u uzrastu i polu eksperimentalnih životinja (Ben-Nun i sar., 1980; Källén i Nilsson, 1989; Endoh i sar., 1990; Teuscher i sar., 2004; Ditamo i sar., 2005; Matejuk i sar., 2005; Tatari-Calderone i sar., 2012); 2) godišnjem

dobu u vreme imunizacije (Teuscher i sar., 2004; Teuscher i sar., 2006); 3) uzrastu u kojem su odvojene od majke (Laban i sar., 1995) i 4) uslovima u kojima su uzgajane životinje (Lehmann i Ben-Nun, 1992; Schiffenbauer i sar., 1993; Dimitrijević i sar., 1994). Ovo poslednje se povezuje sa razlikama u izloženosti bakterijama (Lehmann i Ben-Nun, 1992) i njihovim enterotoksinima (Schiffenbauer i sar., 1993), stresu (Dimitrijević i sar., 1994), faktorima koji mogu uticati na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta, poput vode, hrane (Bjorksten, 2008; Arndt i sar., 2014). Osim toga, razlike u osetljivosti oglednih životinja na indukciju EAE-a se mogu pripisati razlikama u protokolima koji su korišćeni za indukciju EAE-a (npr. homogenat kičmene moždine ili neuroantigen, razlike u količini antigena, razlike u vrsti adjuvansa koji je korišćen, administracija *B. Pertussis* itd.) (Di Rosa i sar., 2000; Constantinescu i sar., 2011). Važno je napomenuti da su u svim eksperimentima prikazanim u ovom radu ogledne životinje bile ženskog pola, sličnog uzrasta kada su u pitanju i mlade i stare životinje, odvajane od majki u isto vreme, gajene u istim uslovima, kao i da su bile imunizovane u isto vreme, identičnim imunizacionim protokolom i od strane iste osobe. Drugim rečima, važno je istaći da se vodilo računa da se isključe varijacije u osetljivosti na indukciju EAE-a koje bi mogle da nastanu delovanjem različitih faktora za koje je pokazano da mogu prevazići uticaj genetskih faktora na osetljivost na razvoj kliničkog EAE-a (Teuscher i sar., 2004).

Patohistološka analiza preseka tkiva kičmene moždine imunizovanih pacova pokazala je da starenje, u skladu sa kliničkom slikom, smanjuje infiltraciju inflamatornim ćelijama parenhima kičmene moždine DA pacova, a povećava infiltraciju parenhima kičmene moždine AO pacova. Uprkos suprotnim promenama izazvanim starenjem, veličina inflamatornog infiltrata je bila izraženija u kičmenoj moždini starih DA nego starih AO pacova. Bez obzira na soj i uzrast, broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova korelirao je sa težinom kliničke slike i utvrđenom patohistološkom slikom, što je u skladu sa nalazima drugih istraživača (Day, 2005).

## **5.2. Starenje utiče na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija kičmene moždine koje učestvuju u patogenezi EAE-a, na sojno zavisian način**



Imajući u vidu da ključnu ulogu u patogenezi u modelu EAE-a koji je korišćen u ovoj studiji imaju CD4<sup>+</sup> T-limfociti (Costantinescu i sar., 2011), analiziran je broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita i njihove fenotipske i funkcijske karakteristike. Veći broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovan je iz kičmene moždine životinja sa većim maksimalnim kliničkim skorom. Konkretnije, bez obzira na uzrast, veći broj ovih ćelija izolovan je iz kičmene moždine DA nego AO pacova. Starenje je kod DA pacova uticalo na smanjenje maksimalnog kliničkog znaka, ali i broja CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini, dok je kod AO pacova dovelo do povećanja maksimalnog kliničkog znaka, kao i broja CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine AO pacova. Nalazi koji ukazuju da starenje smanjuje broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu DA pacova, a povećava broj ovih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu AO pacova bili su u skladu sa povećanjem procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita DA pacova, odnosno kod AO pacova sa smanjenjem procentualne zastupljenosti apoptotičnih ćelija u okviru iste subpopulacije. Veća procentualna zastupljenost apoptotičnih ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita kod mladih AO pacova u odnosu na mlade DA pacove bila je u skladu sa ranije pokazanim sojnim razlikama u apoptozi encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini mladih DA i AO pacova (Lukic i sar., 2001). Naime, nakon pasivnog transfera CD4<sup>+</sup> T-limfocita zabeležen je veći broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita, a manji broj apoptotičnih ćelija u kičmenoj moždini mladih DA pacova u poređenju sa njihovim brojem u kičmenoj moždini mladih AO pacova (Lukic i sar., 2001). Broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine starih DA pacova bio je veći od onog izolovanog iz kičmene moždine AO pacova istog uzrasta. Međutim, očigledno je da je i taj broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita (za koje se može pretpostaviti da su većinski bile specifične za neuroantigene) bio dovoljan da dovede do klinički manifestne bolesti kod starih AO pacova. U prilog ovom nalazu govore podaci da je kod pacova i jako mali broj encefalitogenih ćelija dovoljan da dovede do teške kliničke slike EAE-a (Sedgwick i sar., 1987). Dodatno, važno je napomenuti da su sojne i uzrasne razlike u zastupljenosti apoptotičnih ćelija u subpopulaciji CD4<sup>+</sup> T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu pacova korelirale i sa procentualnom zastupljenošću CD134<sup>+</sup> ćelija u ovoj subpopulaciji ćelija. Naime, pokazano je da CD134 molekul ushodno reguliše ekspresiju antiapoptotskih Bcl-xL i Bcl-2 gena, te suprimira apoptozu CD4<sup>+</sup> T-limfocita (Rogers i sar., 2001). Manja procentualna

zastupljenost CD134+ ćelija u CD4+ T-limfocitima u kičmenoj moždini starih DA pacova u poređenju sa mladim pacovima istog soja ukazivala je i na manje efikasnu reaktivaciju encefalitogenih CD4+ T-limfocita. Naime, pre prolaska kroz krvno-moždanu barijeru encefalitogeni efektorski CD4+ T-limfociti nishodno regulišu ekspresiju CD134 (Carboni i sar., 2003), te njegova ekspresija na površini CD4+ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova ukazuje i na uspešnost njihove reaktivacije (Flügel i sar., 2001). Suprotno ovome, kod AO pacova starenjem je došlo do povećanja procentualne zastupljenosti CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita, što je ukazivalo na bolju reaktivaciju CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih AO pacova u poređenju sa mladim AO pacovima. Osim toga, na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da je kod starih DA pacova reaktivacija CD4+ T-limfocita bila efikasnija u odnosu na stare AO pacove. Promene nastale starenjem u ekspresiji još jednog aktivacionog markera CD4+ T-limfocita, CD25 molekula, u okviru subseta konvencionalnih Foxp3-CD4+ limfocita, pokazale su obrazac promena koji je bio sličan onom koji opisan za promene u ekspresiji CD134, te dodatno učvrstile prethodne zaključke.

Smanjena ekspresija CD134 na površini CD4+ T-limfocita bi mogla da utiče na efikasnost njihovog odgovora na molekularne signale relevantne za diferencijaciju koje im upućuju druge ćelije, uključujući i ćelije mikroglije (Sethna i Lampson, 1991; Duong i sar., 1992; Zhang i sar., 2010). Zaista, u skladu sa utvrđenim sojnim i uzrasnim razlikama u procentualnoj zastupljenosti CD134+ ćelija u okviru CD4+ T-limfocita bile su i razlike u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita. Naime, kod životinja kod kojih je nađena veća procentualna zastupljenost CD134+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita bila je veća i procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija. U istom smislu su bili i nalazi dobijeni ispitivanjem koncentracija IL-17 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova i restimuliranih PMA-om i jonomicinom. Treba istaći i da je obrazac uzrasnih i sojnih razlika u ekspresiji iRNK za IL-17 u sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama kičmene moždine odgovarao obrascu razlika u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita i koncentraciji IL-17 u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova i restimuliranih PMA-om i jonomicinom.

---

Konačno, valja reći da je obrazac razlika u procentualnoj zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita korelirao sa obrascem razlika u težini neurološkog deficita. Ovo je bilo u skladu sa činjenicom da pasivni transfer CD4+ T-limfocita koji su izolovani iz MOG peptidom imunizovanih miševa, koji su genetski deficijentni za IL-17, i stimulisani *in vitro* MOG peptidom tokom četiri dana dovodi do manje osetljivosti na indukciju EAE-a (Komiyama i sar., 2006). Naime, kod ovih životinja je bio odložen početak bolesti, slabije su bile izražene inflamatorne promene u kičmenoj moždini, a maksimalni klinički skor niži nego kod kontrolnih miševa kojima je izvršen pasivni transfer CD4+ T-limfocita koji su izolovani iz MOG peptidom imunizovanih miševa, koji nisu genetski deficijentni za IL-17, a stimulisani su *in vitro* na isti način (Komiyama i sar., 2006). Na značaj IL-17 u razvoju EAE-a ukazuju i podaci da *in vivo* tretman antitelima specifičnim za IL-17 dovodi do značajne supresije razvoja EAE-a u odnosu na kontrolne životinje koje nisu tretirane ovim antitelima (Hofstetter i sar., 2005).

U sledećem koraku ispitivana je ekspresija citokina koji imaju važnu ulogu u usmeravanju i održavanju diferencijacije CD4+ T-limfocita. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije uključila su ispitivanja ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-6, kao citokine koji su važni za usmeravanje diferencijacije CD4+ T-limfocita ka Th17 ćelijama (McGeachy i sar., 2007; McGeachy i Cua, 2008; McCandless i sar., 2009; Chung i sar., 2009; Bhaumik i Basu, 2017). Ekspresija iRNK za IL-6 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine bila je veća kod pacova DA soja nego AO soja bez obzira na uzrast, što je bilo u skladu i sa većom ekspresijom IL-17 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja. Ekspresija iRNK za IL-6 se starenjem povećavala kod pacova oba soja, ali je i ostala veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa ovim ćelijama starih AO pacova. Imajući u vidu podatke koji pokazuju da je za usmeravanje diferencijacije Th0 limfocita u Th17 ćelije neophodan ne samo IL-6 već i IL-1 $\beta$  (Chung i sar., 2009; McCandless i sar., 2009; Bhaumik i Basu, 2017), starenjem uslovljeno smanjenje zastupljenosti Th17 ćelija u kičmenoj moždini DA pacova može se povezati sa smanjenjem ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$ . U prilog ovom idu podaci koji pokazuju da je za usmeravanje diferencijacije Th0 limfocita u Th17 ćelije značajniji optimalan odnos citokina koji učestvuju u usmeravanju i održavanju diferencijacije nego apsolutna količina svakog od njih pojedinačno (McGeachy i sar.,

2007; McAleer i Kolls, 2011; Bhaumik i Basu, 2017). Međutim, bez obzira na uzrast, ekspresija iRNK za IL-6 i IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 bila je veća u mononuklearnim ćelijama DA nego AO pacova, što je najverovatnije imalo za rezultat i veću zastupljenost Th17 ćelija u kičmenoj moždini DA pacova u poređenju sa kičmenom moždinom AO pacova odgovarajućeg uzrasta. Starenjem se ekspresija iRNK za IL-23/p19 nije menjala u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine pacova DA soja, dok se u ovim ćelijama pacova AO soja ona povećavala, što bi se moglo povezati sa povećanjem zastupljenosti Th17 ćelija u njihovoj kičmenoj moždini i, moguće, gubitkom rezistencije za razvoj EAE-a. Visoka ekspresija iRNK ne samo za IL-23/p19, već i za drugu subjedinicu IL-23 nađena je u aktivnim lezijama CNS-a u multiploj sklerozi (Li i sar., 2007). Utvrđeno je i da su aktivirani makrofagi/mikroglia, kao i zrele dendritske ćelije izvori IL-23 u ovim lezijama (Li i sar., 2007).

Pokazano je da ključnu ulogu u razvoju EAE-a ima subset Th17 limfocita koji uz IL-17 koeksprimira IFN- $\gamma$  i, posebno oni koji uz ova dva citokina koeksprimiraju i GM-CSF, citokin za koji je pokazano, da je makar u mišijem modelu EAE-a, neophodan za razvoj bolesti (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011). Rezultati ove studije pokazali su da je procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju IFN- $\gamma$  i GM-CSF u subsetu Th17 ćelija korelirala sa težinom kliničke slike. Naime, starenjem se procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita DA pacova smanjivala, a u subpopulaciji ovih ćelija AO pacova povećavala. Pokazano je da IL-23, citokin koji održava Th17 polarizaciju i sekreciju IL-17 (Aggarwal i sar., 2003; Langrish i sar., 2005), indukuje i ekspresiju GM-CSF (Wu i sar., 2016), te tako doprinosi diferencijaciji visoko patogenih Th17 limfocita (El-Behi i sar., 2011; Codarri i sar., 2011; Sheng i sar., 2014; McWilliams i sar., 2015). Imajući ovo u vidu, starenjem uslovljeno povećanje procentualne zastupljenosti IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine AO pacova bi se moglo povezati sa povećanjem ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 u mononuklearnim ćelijama njihove kičmene moždine. S druge strane, manja procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine starih DA pacova u poređenju sa njihovom zastupljenošću u CD4+ T-limfocitima izolovanim iz kičmene moždine mladih DA

---

pacova najverovatnije je odražavala starenjem uslovljeno smanjenje iRNK za IL-1 $\beta$  u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine.

Uloga IFN- $\gamma$  u razvoju EAE-a je kompleksna. Ovaj citokin može ispoljiti i proinflamatorne (Kuchroo i sar., 1993; Lovett-Racke i sar., 2004), ali i antiinflamatorne (Lublin i sar., 1993) efekte u razvoju EAE-a. Ovakvi nalazi mogu se objasniti: razlikama u tipu ćelija u kojima je ovaj citokin određivan (Sanvito i sar., 2010), razlikama u fazi bolesti u kojoj je njegova sinteza i sekrecija analizovana (Arellano i sar., 2015), mestom delovanja (kičmena moždina vs mozak) (Sanvito i sar., 2010). Analize u okviru ove studije pokazale su, bez obzira na uzrast, veći broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini DA pacova nego AO pacova. Ovi nalazi bili su u skladu sa ekspresijom iRNK za IFN- $\gamma$  u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz njihove kičmene moždine, kao i koncentracijom IFN- $\gamma$  u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih životinja restimuliranih PMA-om i jonomicinom. Starenjem se smanjivao broj IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini DA pacova, a povećavao u kičmenoj moždini AO pacova. Sumirano, veći broj ovih ćelija izolovan je iz kičmene moždine onih životinja, kod kojih su patohistološke promene bile izraženije, a klinička slika teža. Shodno tome, može se zaključiti da rezultati dobijeni u okviru ove studije podržavaju proinflamatornu ulogu IFN- $\gamma$  sintetisanog od strane CD4+ T limfocita u razvoju EAE-a. U prilog ovim rezultatima jesu i nalazi da su upravo CD4+ T-limfociti izvor IFN- $\gamma$ , koji ostvaruje proinflamatorne efekte u razvoju EAE-a (Sanvito i sar., 2010), dok je za druge ćelije poput NK, NKT ili  $\gamma\delta$  T-limfocita, koje takođe mogu biti izvor IFN- $\gamma$ , pokazano da mogu imati regulatornu ulogu u autoimunske neuroinflamaciji (Huang i sar., 2006; Mars i sar., 2009; Ponomarev i sar., 2004). Naši nalazi su takođe u skladu sa hipotezom da IFN- $\gamma$  deluje proinflamatorno u kičmenoj moždini, a imunoregulatorno u mozgu (Sanvito i sar., 2010). Uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini su korelirale sa uzrasnim i sojnim razlikama u ekspresiji iRNK za IL-12/p35, ključnog citokina za diferencijaciju IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita (Prochazkova i sar., 2012), u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Naime, ekspresija iRNK za IL-12/p35 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine bila je veća kod DA nego kod AO pacova bez obzira na uzrast. Starenjem se ekspresija iRNK za IL-12/p35 u

---

mononuklearnim ćelijama kićmene moždine smanjivala kod DA pacova, a povećavala kod AO pacova.

Istraživanja CD8<sup>+</sup> T-limfocita u kićmenoj moždini u okviru ove disertacije, pokazala su da je njihov broj u kićmenoj moždini takođe korelirao sa težinom kliničke slike. Prisustvo i klonska ekspanzija CD8<sup>+</sup> T-limfocita pokazani su u aktivnim lezijama u CNS-u (Babbe i sar., 2000) i cerebrospinalnoj tećnosti obolelih od multiple skleroze (Babbe i sar., 2000; Skulina i sar., 2004). S obzirom na to da je pokazano da se broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita koji infiltriraju kićmenu moždinu starenjem povećava kod neimunizovanih glodara (Ritzel i sar., 2016), ispitivana je zastupljenost IL-17<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita neimunizovanih životinja i specifićnost CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz imunizovanih životinja za MBP. Nađeno je da je, bez obzira na uzrast životinja, procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kićmene moždine neimunizovanih životinja bila znaćajno manja nego kod imunizovanih životinja, kao i da se starenjem zastupljenost ovih ćelija povećavala kod neimunizovanih pacova oba soja. Procentualna zastupljenost IL-17<sup>+</sup> ćelija bila je jako niska, ispod 0,3%, kod neimunizovanih mladih pacova, dok ove ćelije nisu detektovane kod neimunizovanih starih pacova. Nađeno je da je procentualno povećanje zastupljenosti IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i IL-17<sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama mononuklearnih ćelija kićmene moždine starih AO pacova u odnosu na njihovu zastupljenost u kontrolnim kulturama bez MBP-a bilo veće nego u MBP<sup>+</sup> kulturama mononuklearnih ćelija kićmene moždine mladih AO pacova. Procentualno povećanje zastupljenosti IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i IL-17<sup>+</sup> ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama mononuklearnih ćelija kićmene moždine AO pacova oba uzrasta u odnosu na njihovu zastupljenost u kontrolnim kulturama bez MBP-a bilo je veće nego u MBP<sup>+</sup> kulturama mononuklearnih ćelija kićmene moždine DA pacova odgovarajućeg uzrasta. Dakle, imajući u vidu odsustvo IL-17<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-limfocita u kićmenoj moždini neimunizovanih starih pacova oba soja, kao i sojne razlike u povećanju zastupljenosti IL-17<sup>+</sup> ćelija u CD8<sup>+</sup> T-limfocitima u MBP<sup>+</sup> kulturama ćelija kićmene moždine starih pacova, može se pretpostaviti da je doprinos infiltrišućih efektorskih IL-17<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-limfocita razvoju bolesti bio veći kod starih AO pacova nego kod starih DA pacova. Uloga CD8<sup>+</sup> T-limfocita koji sintetišu IL-17 u EAE-u zasnovana je prevashodno na oslobađanju IL-17, dok se ove ćelije karakterišu smanjenom citotoksićnošću, te stoga i

---

produkcijom granzima B i perforina (Huber i sar., 2009; Yen i sar., 2009). Podaci iz literature ukazuju da bi mogli imati važnu ulogu u hroničnoj bolesti (Ford i Evavold, 2005). Shodno tome, veća procentualna zastupljenost ovih ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita kičmene moždine kod starih AO pacova u odnosu na njihovu zastupljenost kod starih DA pacova, kao i izraženije procentualno povećanje zastupljenosti IL-17<sup>+</sup> ćelija u CD8<sup>+</sup> T-limfocitima u kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih AO pacova stimulisanih MBP-om u odnosu na povećanje u MBP-om stimulisanim kulturama mononuklearnih ćelija kičmene moždine starih DA pacova, bi se moglo povezati sa razvojem bolesti protražovanog trajanja kod starih AO pacova.

Analiza uzrasnih i sojnih razlika u zastupljenosti IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini pokazala je da su kod AO pacova, za razliku od DA pacova veći doprinos zastupljenosti IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> T-limfocita u kičmenoj moždini starih AO pacova dali infiltrirajući nego rezidentni IFN- $\gamma$ +CD8<sup>+</sup> T-limfociti. Na ovakav zaključak ukazivali su rezultati koji su pokazali manju zastupljenost IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine neimunizovanih, ali i imunizovanih starih AO pacova u poređenju sa zastupljenošću ovih ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine odgovarajućih starih DA pacova. Nalaz izraženijeg procentualnog povećanja zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u CD8<sup>+</sup> T-limfocitima iz MBP+ kultura ćelija kičmene moždine u odnosu na njihov procenat u kontrolnim kulturama starih AO pacova u poređenju sa odgovarajućim kulturama starih DA pacova takođe je podržao ovakav zaključak. U skladu sa činjenicom da CD8<sup>+</sup> T-limfociti, koji sintetišu IFN- $\gamma$ , proizvode i citolitičke enzime (Vukmanovic-Stejic i sar., 2000), nađeno je da su uzrasne i sojne razlike u procentualnoj zastupljenosti IFN- $\gamma$ + ćelija u subpopulaciji CD8<sup>+</sup> T-limfocita korelirale sa promenama u zastupljenosti granzim B+ ćelija u ovoj subpopulaciji T-limfocita. U prilog ovim nalazima govore istraživanja drugih istraživača koja su pokazala da je pasivni transfer samo antigen specifičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita dovoljan da indukuje EAE kod miševa i da upravo IFN- $\gamma$  sintetisan od strane ovih ćelija ima ključnu patogenetsku ulogu u razvoju EAE-a (Huseby i sar., 2001).

Veći broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> Treg ćelija izolovan je iz kičmene moždine DA pacova nego AO pacova, bez obzira na uzrast. Broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> Treg ćelija u kičmenoj moždini starenjem se smanjivao kod DA pacova. Kod AO pacova starenje je dovelo do

povećanja broja CD4<sup>+</sup> Treg u kičmenoj moždini, ali nije uticalo na promenu u broju CD8<sup>+</sup> Treg. Izračunat je i količnik CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> Treg i pokazano je da je kod mladih pacova ovaj količnik bio značajno veći kod AO u poređenju sa DA pacovima, reflektujući značajno veću zastupljenost CD4<sup>+</sup> Treg ćelija nego CD8<sup>+</sup> Treg ćelija u kičmenoj moždini mladih AO pacova u poređenju sa DA pacovima. Kod starih pacova ovaj količnik je bio manji kod AO nego kod DA pacova, što je bila posledica različitog uticaja starenja na broj CD8<sup>+</sup> Treg kod AO i DA pacova. Takođe, u poređenju sa DA pacovima, kod starih AO pacova uočena je i veća procentualna zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 u subsetu CD8<sup>+</sup> Treg ćelija u odnosu na njihovu zastupljenost u okviru istog submeta kod starih DA pacova, što je ukazivalo i na veće prisustvo onih CD8<sup>+</sup> Treg koje ostvaruju regulatornu funkciju kod starih AO nego starih DA pacova. Međutim, iako je ukazano na to da CD8<sup>+</sup> Treg ćelije imaju značajnu ulogu u razvoju i težini bolesti kako kod ljudi, tako i kod glodara (Sinha i sar., 2014), njihov regulatorni/supresorni kapacitet je manji nego CD4<sup>+</sup> Treg ćelija (Mayer i sar., 2011), te bi ovakav nalaz mogao doprineti razvoju bolesti protražovanog toka kod starih AO pacova u odnosu na stare DA pacove. Sojne razlike u broju CD8<sup>+</sup> Treg u drenirajućim limfnim čvorovima i slezini mladih imunizovanih pacova pokazali su Sun i saradnici (1999). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji, pokazuju, ne samo da sojne razlike u broju CD8<sup>+</sup> Treg postoje u ciljnom organu pacova imunizovanih u cilju indukcije EAE-a, već i sugerišu da je odnos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Treg, pre nego apsolutni broj CD8<sup>+</sup> Treg u kičmenoj moždini imunizovanih pacova značajan za sojne razlike u kliničkoj slici EAE-a.

Imajući u vidu moguću regulatornu/protektivnu ulogu NK ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu u razvoju EAE-a (Xu i sar., 2005; Huang i sar., 2006; Hertwig i sar., 2016), ispitivana je infiltracija kičmene moždine pacova NK ćelijama. Rezultati su pokazali da su, kako ukupni broj NK ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu imunizovanih životinja, tako i procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija koje najverovatnije predstavljaju ćelije zrelog fenotipa (Hertwig i sar., 2016; Hamann i sar., 2011), u populaciji NK ćelija, uzrasno i sojno zavisni. Ukupni broj NK ćelija bio je najveći u kičmenoj moždini mladih DA pacova, koji su pokazivali najtežu kliničku sliku bolesti, dok je kod mladih AO pacova, koji nisu razvijali klinički manifestnu bolest, broj ovih ćelija bio izrazito mali. Kod starih pacova manji broj NK ćelija izolovan je iz



kičmene moždine AO nego DA pacova. Pokazano je da deplecija NK ćelija ili selektivna blokada migriranja ovih ćelija u CNS dovode do razvoja EAE-a teže kliničke slike (Zhang i sar., 1997; Matsumoto i sar., 1998; Xu i sar., 2005), dok ekspanzija NK ćelija redukuje broj encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u CNS-u i dovodi do razvoja EAE-a blažih kliničkih manifestacija (Hao i sar., 2010). Takođe, pokazano je da je kod miševa imunizovanih u cilju indukcije EAE-a, kod kojih postoji genetski uslovljen nedostatak CX3CR1, poremećena migracija NK ćelija u CNS (Huang i sar., 2006) i da oni razvijaju težu kliničku sliku EAE-a nego kontrolne životinja sa očuvanom ekspresijom ovog proteina (Hertwig i sar., 2016). Shodno ovim nalazima, pretpostavljeno je da CX3CR1<sup>+</sup> NK ćelije imaju regulatornu/protektivnu ulogu u razvoju EAE-a (Matsumoto i sar., 1998; Xu i sar., 2005; Huang i sar., 2006; Hertwig i sar., 2016). Rezultati dobijeni *in vitro* i *in vivo* istraživanjima ukazuju da CX3CR1<sup>+</sup> NK ćelije ostvaruju regulatornu/protektivnu ulogu delujući citotoksično na encefalitogene CD4<sup>+</sup> T-limfocite (Xu i sar., 2005; Hamann i sar., 2011; Hertwig i sar., 2016). U skladu sa prethodnim nalazima procentualna zastupljenost granzim B<sup>+</sup> ćelija u populaciji NK ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja pokazala je isti obrazac uzrasnih i sojnih razlika kao i procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u populaciji NK ćelija. Imajući u vidu ulogu CX3CR1<sup>+</sup> NK ćelija u ograničavanju neuroinflamacije (Xu i sar., 2005; Hamann i sar., 2011; Hertwig i sar., 2016), ispitan je i odnos efektorskih Foxp3-CD4<sup>+</sup> T-limfocita i CX3CR1<sup>+</sup> NK ćelija u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz kičmene moždine. Pokazano je da se starenjem kod DA pacova ovaj odnos smanjivao na račun povećanja broja CX3CR1<sup>+</sup> NK ćelija implicirajući veći kapacitet NK ćelija u ograničavanju delovanja (neuro)antigen-specifičnih efektorskih CD4<sup>+</sup> T-limfocita. S druge strane, odnos konvencionalnih Foxp3-CD4<sup>+</sup> T-ćelija/CX3CR1<sup>+</sup>NK ćelija bio je kod starih AO pacova pomeren na stranu Foxp3-CD4<sup>+</sup> ćelija, implicirajući manje efikasnu regulatornu aktivnost NK ćelija kod ovih životinja u poređenju sa starim životinjama DA soja.

Istraživanja mehanizama koji stoje u osnovi uzrasnih i sojnih razlika u razvoju EAE-a obuhvatila su i ispitivanja zastupljenosti, fenotipskih i funkcijskih karakteristika mijeloidnih (CD11b<sup>+</sup>) ćelija. Ćelije mikroglije (CD45<sup>+</sup>/CD45<sup>++</sup> ćelije), kao i CD45<sup>+++</sup>CD11b<sup>+</sup> ćelije, koje fenotipski odgovaraju inflamatornim monocitima /makrofagima i dendritskim ćelijama monocitnog porekla koje infiltriraju kičmenu

moždinu (Croxford i sar., 2015a), pokazivale su uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti u kičmenoj moždini. Kod oba soja imunizovanih pacova starenje je uticalo na smanjenje procentualne zastupljenosti aktivisanih CD45<sup>++</sup> ćelija mikroglije (Zhang i sar., 2002; Almolda i sar., 2009) u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> ćelija. U populaciji CD11b<sup>+</sup> ćelija starih AO pacova nađen je veći procenat aktivisanih ćelija mikroglije nego u ovoj populaciji starih DA pacova. Imajući u vidu da aktivisana mikroglija može imati, ne samo oštećujuću (Wang i sar., 2009), već i protektivnu (Goldmann i Prinz, 2013) ulogu u razvoju EAE-a i da starenje u ćelijama mikroglije utiče na povećanje ekspresije gena koji kodiraju proteine, uključujući i CX3CR1, koji su uključeni u njihovo neuroprotektivno delovanje (Hickman i sar., 2013), u CD45<sup>++</sup> CD11b<sup>+</sup> ćelijama je analizirana ekspresija CX3CR1. Uzimajući u obzir da ekspresija CX3CR1 u ćelijama mikroglije u trenutku indukcije bolesti može uticati na odgovor na inflamatorni stimulus (Corona i sar., 2010; Ritzel i sar., 2015), ispitana je procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u mikroglijalnim ćelijama neimunizovanih pacova. Kako je ranije i pokazano (Sunnemark i sar., 2003), procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija bila je veoma visoka u mikrogliji neimunizovanih mladih DA pacova. Kod mladih AO pacova procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u mikrogliji bila je niska i značajno manja nego kod mladih DA pacova. U skladu sa podacima da starenjem kod zdravih glodara dolazi do nishodne regulacije ekspresije CX3CR1 u ćelijama mikroglije (Wynne i sar., 2010), procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u mikrogliji se starenjem smanjivala kod oba soja pacova, ali je i kod starih pacova, kao i kod mladih, bila manja kod AO nego kod DA pacova. Indukcijom bolesti došlo je do smanjenja procentualne zastupljenosti CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u mikrogliji mladih pacova oba soja, s tim da je ovo smanjenje bilo izraženije kod DA nego kod AO pacova, te je u efektorskoj fazi procentualna zastupljenost CX3CR1<sup>+</sup> ćelija bila veća u mikrogliji AO nego DA pacova. Ovakvi rezultati bili su u skladu sa podacima koji pokazuju da miševi sa deficijencijom CX3CR1 molekula razvijaju težu kliničku sliku EAE-a (Huang i sar., 2006). U prilog postojanja sojnih razlika u ekspresiji CX3CR1 govore i sojne razlike u inflamatornom odgovoru ćelijskih linija ili primarnih ćelija mikroglije dobijenih iz neonatalnih životinja (McLaughlin i sar., 2006; Nickles i sar., 2008; Wei i Lin, 2009). Za razliku od mladih životinja, kod starih pacova je indukcijom bolesti došlo do povećanja procentualne zastupljenosti CX3CR1<sup>+</sup> ćelija u mikrogliji, s tim da se ovo povećanje

održavalo tokom razvoja bolesti kod DA pacova, dok kod AO pacova nakon blagog porasta u induktivnoj fazi nije došlo do daljeg povećanja procentualne zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u mikrogliji u efektorskoj fazi. Posledično, u efektorskoj fazi kod starih pacova procentualna zastupljenost CX3CR1+ ćelija bila je veća u mikrogliji DA nego AO pacova. U dostupnoj literaturi nema podataka o ekspresiji CX3CR1 u mikrogliji starih glodara tokom razvoja inflamacije u CNS-u. Ovi rezultati sugerišu da bi u sojnim i uzrasnim razlikama u kliničkom ishodu imunizacije u cilju indukcije EAE-a važnu ulogu mogle da imaju sojne i uzrasne razlike u ekspresiji CX3CR1 molekula na ćelijama mikroglije u trenutku imunizacije, kao i promene u ispoljavanju ovog molekula nakon imunizacije. Ovakav zaključak je u skladu sa sve većim brojem rezultata koji pokazuju da je osovina CX3CR1/CX3CL1 od ključnog značaja za održavanje mikroglije u stanju mirovanja, kao i za prevenciju oštećenja nastalih kao posledica preterane aktivacije mikroglije (Cardona i sar., 2006; Lyons i sar., 2009; Wolf i sar., 2013). S obzirom na to da je pokazano da je za ostvarivanje neuroprotektivne funkcije mikroglije od presudnog značaja nishodna regulacija IL-1 $\beta$  (Bhaskar i sar., 2010) i da mikroglija životinja sa deficijetnom ekspresijom CX3CR1 molekula pokazuje ushodnu regulaciju IL-1 $\beta$  (Cardona i sar., 2006), ispitivana je ekspresija IL-1 $\beta$ . U skladu sa prethodno opisanim promenama u ekspresiji CX3CR1, procentualna zastupljenost IL-1 $\beta$ + ćelija u mikrogliji starih AO pacova bila je veća nego u mikrogliji starih DA pacova. Osim toga, u skladu sa podacima koji pokazuju da se aktivacijom CX3CR1/CX3CL1 osovine povećava fagocitna sposobnost ćelija mikroglije (Huang i sar., 2016), ćelije mikroglije starih AO pacova pokazivale su smanjenu sposobnost da vrše fagocitozu u poređenju sa ovim ćelijama starih DA pacova i mladih AO pacova. Isti obrazac uzrasnih i sojnih razlika nađen je i kada je analizirana zastupljenost ćelija koje su eksprimirale CD163, marker mikroglije protektivnog M2 fenotipa (Zhang i sar., 2011). Imajući u vidu da ćelije M2 mikroglije eksprimiraju manozni receptor (Régnier-Vigouroux, 2003; Martinez i sar., 2006), ispitivano je i preuzimanje dekstrana, koje je posredovano ovim receptorom, od strane ćelija aktivisane mikroglije. Uočeno je da je uzrasni i sojni obrazac razlika u procentualnoj zastupljenosti ćelija koje su preuzele dekstran odgovarao onom koji je opisan za procentualnu zastupljenost CD163+ ćelija u okviru aktivisane mikroglije. Naime, kod mladih pacova manje dekstran+ ćelija nađeno je u okviru ćelija aktivisane mikroglije DA nego AO pacova. Starenje je imalo suprotan

efekat na zastupljenost dekstran+ ćelija kod DA i AO pacova, odnosno kod DA pacova starenje je uticalo na povećanje zastupljenosti dekstran+ ćelija, dok je kod AO pacova dovelo do smanjenja zastupljenosti ovih ćelija u okviru mikroglijalnih ćelija. Posledično, veća procentualna zastupljenost dekstran+ ćelija utvrđena je u ćelijama mikroglije starih DA pacova nego starih AO pacova. S obzirom na to da CD11b+ ćelije koje su izolovane iz kičmene moždine imunizovanih pacova većinski čine ćelije mikroglije, u prilog prethodnim rezultatima jesu i nalazi manje ekspresije iRNK za TGF- $\beta$ , ključni citokin u kontroli neuroinflamacije (Shin i sar., 2012) i najpotentniji regulator mikroglijalne ekspresije CX3CR1 (Wynne i sar., 2010), u ovim ćelijama starih AO pacova u poređenju sa ekspresijom iRNK za TGF- $\beta$  u istim ćelijama starih DA pacova. Treba napomenuti da su prethodni nalazi u skladu sa nalazima drugih istraživača koji pokazuju sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama ekspresije TGF- $\beta$  u ćelijama mikroglije (Sierra i sar., 2007; Tichauer i sar., 2014). Imajući u vidu da je u neuroprotektivno delovanje mikroglije posredovano CX3CR1 uključen i enzim HO-1 (Lastres-Becker i sar., 2014; Syapin, 2008), ispitana je i ekspresija iRNK za HO-1 u CD11b+ ćelijama. HO-1 inhibiše oksidativno oštećenje ćelija i smanjuje apoptozu, redukuje imigraciju inflamatornih ćelija u inflamirano tkivo i sekreciju proinflamatornih citokina (Alcaraz i sar., 2003). Nalaz manje ekspresije iRNK za HO-1 u CD11b+ ćelijama starih AO pacova nego u istim ćelijama starih DA pacova takođe je išao u prilog manjeg neuroprotektivnog kapaciteta mikroglije starih AO pacova nego starih DA pacova. U prilog prethodnom nalazu idu sojne razlike u ekspresiji HO-1 u mozgu mladih pacova pokazane u bolestima u čijem razvoju ne učestvuju imunski mehanizmi (Huang i sar., 2006).

Analiza CD11b+ ćelija kičmene moždine je uključivala i ispitivanje CD45+++ ćelija, prevashodno inflamatornih makrofaga i dendritskih ćelija, koje su infiltrirale kičmenu moždinu imunizovanih životinja (Croxford i sar., 2015a). Procentualna zastupljenost ovih ćelija u okviru CD11b+ ćelija, korelirala je sa kliničkom slikom EAE-a kod ispitivanih životinja, što znači da je veća procentualna zastupljenost ovih ćelija u okviru CD11b+ ćelija utvrđena u kičmenoj moždini mladih DA pacova nego mladih AO pacova. Starenje je uticalo na povećanje zastupljenosti CD45+++ ćelija u CD11b+ ćelijama AO pacova, dok je kod DA pacova dovelo do blagog pada zastupljenosti CD45+++ ćelija u okviru CD11b+ ćelija, ali ne i statistički značajne

razlike. Sojne razlike u dinamici i intenzitetu infiltracije kičmene moždine imunizovanih mladih DA i AO pacova monocitima su ranije pokazane, odnosno veći broj monocita/makrofaga je izolovan je iz kičmene moždine mladih pacova DA pacova u poređenju sa pacovima istog uzrasta AO soja, kako u induktivnoj fazi, tako i na vrhuncu bolesti (Mensah-Brown i sar., 2011).

### **5.3. Uticaj starenja na zadržavanje CD4+ T-limfocita u slezini DA i AO pacova imunizovanih u cilju indukcije EAE-a**

Imajući u vidu da encefalitogeni CD4+ T-limfociti, aktivisani u drenirajućim limfnim čvorovima na putu za CNS, mogu biti zadržani u slezini (Flügel i sar., 2001; Staykova i sar., 2002; Yang i sar., 2002; Tischner i sar., 2006) i da je, bez obzira na uzrast, veći broj mononulearnih ćelija izolovan iz kičmene moždine DA nego AO pacova, kao i da je starenje dovelo do smanjenja veličine ćelijskog infiltrata u kičmenoj moždini DA pacova, a povećanja u kičmenoj moždini AO pacova, analizirana je i procentualna zastupljenost aktivisanih ćelija u subpopulaciji CD4+ T-splenocita. Pokazano je da starenjem kod oba soja pacova dolazi do povećanja kako procentualne zastupljenosti aktivisanih ćelija u okviru subpopulacije CD4+ T-splenocita, tako i njihovog ukupnog broja u slezini. Međutim, s obzirom na to da kod AO pacova starenjem dolazi i do povećanja zastupljenosti aktivisanih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini, moglo se pretpostaviti da zadržavanje aktivisanih CD4+ T-limfocita u slezini najverovatnije nije značajno kompromitovalo infiltraciju kičmene moždine CD4+ T-limfocitima specifičnim za neuroantigene. S druge strane, budući da je kod DA pacova nađeno smanjenje broja aktivisanih CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini starih u odnosu na mlade životinje, pretpostavljeno je i da bi kod starih DA pacova zadržavanje neuroantigen specifičnih CD4+ T-limfocita na njihovom putu od limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije do kičmene moždine, moglo doprineti manjoj infiltraciji ovim ćelijama kičmene moždine starih DA pacova u odnosu na mlade životinje ovog soja.

Standardna izoforma glikoproteina CD44, CD44s izoforma, ispoljena je na većini leukocita, uključujući i T limfocite (McDonald i Kubes, 2015). Sa aktivacijom T limfocita njena ekspresija se povećava na površini ovih ćelija (Pure i Cuff, 2001; Baaten i sar., 2010). Imajući u vidu da povećanje ekspresije CD44s na CD4+ T-splenocitima

može biti odgovorno za zadržavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za neuroantigene u slezini (Yang i sar., 2002), nalaz veće gustine ekspresije CD44s na CD4<sup>+</sup> T-limfocitima starih DA pacova u poređenju sa mladim pacovima istog soja ukazivao je da bi povećana ekspresija ovog molekula mogla, makar delimično, da bude odgovorna za starenjem uslovljeno povećano zadržavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za neuroantigene u slezini. U prilog ovakvom zaključku govore i podaci da kod miševa deficijentnih za CD44 molekul, dolazi do povećanja broja ćelija koje infiltriraju CNS i razvoja EAE-a teže kliničke slike u poređenju sa kontrolnim životinjama (Flynn i sar., 2013).

Zadržavanju encefalitogenih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini starih DA pacova moglo je da doprinese i starenjem uslovljeno povećanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup> Treg, budući da je utvrđeno da povećanje broja CD4<sup>+</sup> Treg u sekundarnim limfnim organima ograničava infiltraciju CNS-a encefalitogenim CD4<sup>+</sup> T-limfocitima (Tischner i sar., 2006). Naime, povećanje zastupljenosti ovih ćelija se povezuje sa ograničavanjem migracije CD4<sup>+</sup> T-limfocita, najverovatnije usled smanjenja ekspresije CXCR3 molekula na ovim ćelijama (Tischner i sar., 2006). U prilog nalazu dobijenom u ovoj disertaciji idu podaci koji pokazuju da kod starih glodara i ljudi dolazi do ekspanzije CD4<sup>+</sup> iTreg na periferiji (Sharma i sar., 2006; Rosenkranz i sar., 2007; Raynor i sar., 2012). Ova ekspanzija se povezuje sa smanjenjem incidencije autoimunskih bolesti kod starih jedinki, uprkos povećanju autoimunosti tokom starenja (Vadasz i sar., 2013). Prisustvo većeg broja CD4<sup>+</sup> Treg u slezini starih životinja bi moglo da se poveže sa većom površinskom ekspresijom CD44, jer je pokazano da veći broj CD4<sup>+</sup> Treg u sekundarnim limfnim organima odražava ushodnu regulaciju ekspresije CD44 i veću gustinu na površini ćelije (Yang i sar., 2002; Bollyky i sar., 2009). U prilog značaja CD44 u regulaciji broja CD4<sup>+</sup> Treg tokom razvoja EAE-a govori manji broj ovih ćelija na periferiji i teža klinička slika EAE-a kod miševa deficijentnih za CD44 (Flynn i sar., 2013).

#### **5.4. Sojne specifičnosti u uticaju starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova koji su imunizovani u cilju indukcije EAE-a**

Imajući u vidu sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u broju T-ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu i njihovom fentopskom profilu analizovana je aktivacija/proliferacija i diferencijacija T-limfocita u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije.

U skladu sa prethodnim ispitivanjima (Vukmanovic i sar., 1990), iz drenirajućih limfnih čvorova mladih AO pacova, u poređenju sa drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova, izolovan je manji ukupan broj CD4+ T-limfocita, kao i broj aktivisanih CD4+ T-limfocita. Ovi nalazi su bili u saglasnosti sa manjom proliferacijom CD4+ T-limfocita u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih AO pacova u poređenju sa MBP+ kulturama ovih ćelija mladih DA pacova. Dakle, infiltracija kičmene moždine mladih AO pacova manjim brojem CD4+ T-limfocita u odnosu na mlade DA pacove mogla je da bude i odraz manje efikasnog generisanja neuroantigen specifičnih CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova. Broj aktivisanih CD4+ T-limfocita se starenjem smanjivao u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova, a povećavao u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova. Ovaj nalaz se mogao povezati sa starenjem uslovljenim promenama u broju aktivisanih OX62+ dendritskih ćelija (a na osnovu ekspresije MHC molekula II klase i CD80 i CD86 molekula). Naime, pokazano je da se starenjem povećao i ukupan broj OX62+ dendritskih ćelija, kao i broj aktivisanih ćelija među njima (ćelije koje eksprimiraju MHC molekule II klase i CD80/86 kostimulatorne molekule). U prilog ovom nalazu jesu podaci da se starenjem broj dendritskih ćelija povećava u slezini i perifernoj krvi kod (NZWxBXSB)F1 miševa, sklonim razvoju autoimunskih bolesti (Adachi i sar., 2002). Povećanje broja OX62+ dendritskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova, kao i povećanje broja ćelija koje ispoljavaju kostimulatorne molekule je u skladu sa starenjem pokazanim povećanjem zastupljenosti CD4+ T-ćelija koje sekretuju GM-CSF u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova i njegovom većom produkcijom u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja (Stojić-Vukanić i sar., 2015). S druge strane, iako se ukupan broj OX62+ dendritskih ćelija starenjem nije menjao kod DA pacova, broj aktivisanih ćelija se smanjivao. U prilog sojnim razlikama u uticaju starenja na broj dendritskih ćelija govore i nalazi dobijeni u mišjem modelu sistemskog eritemskog lupusa, koji pokazuju da su promene u broju dendritskih ćelija na periferiji sojno zavisne (Ishikawa i sar., 2002). Podataka o

značaju genetskih faktora za starenjem uslovljene promene u aktivaciji dendritskih ćelija nema. Međutim, s obzirom na podatke koji ukazuju da je za ishod interakcije dendritskih ćelija i CD4<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima važniji odnos aktivisanih/zrelih dendritskih ćelija i konvencionalnih Foxp3-CD4<sup>+</sup> limfocita, nego apsolutni broj aktivisanih/zrelih dendritskih ćelija *per se* (Allenspach i sar., 2008), izračunat je i ovaj odnos. Starenje je kod AO pacova dovelo do pomeranja ovog odnosa na stranu dendritskih ćelija, dok se kod DA pacova ovaj odnos pomerao na stranu Foxp3-CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ovaj nalaz je bio konzistentan sa smanjenjem broja aktivisanih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova u poređenju sa mladim životinjama ovog soja, odnosno sa povećanjem broja ovih ćelija starenjem u drenirajućim limfnim čvorovima AO pacova. Kod starih pacova, broj aktivisanih (MHC II<sup>+</sup>, CD80/86<sup>+</sup>) dendritskih ćelija bio je veći kod AO pacova nego kod starih DA pacova. U prilog ovom nalazu idu podaci koji ukazuju na individualne varijacije u uticaju starenja na ekspresiju humanog leukocitnog antigena (*engl.* human leukocyte antigen, HLA)-DR na dendritskim ćelijama čoveka (Steger i sar., 1996; Lung i sar., 2000). Odnos aktivisanih/zrelih dendritskih ćelija i konvencionalnih Foxp3-CD4<sup>+</sup> limfocita kod starih pacova je bio nešto veći kod AO pacova.

S obzirom na to da aktivacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita ne mora uvek da dovede do njihove proliferacije (Laouar i Crispe, 2000; Sojka i sar., 2008), analizovana je proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Ispitivanja proliferacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih pacova pokazala su smanjenje procentualne zastupljenosti proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u kulturama ovih ćelija starih DA pacova u poređenju sa mladim životinjama istog soja. Ovaj nalaz mogao je biti posledica ne samo nepovoljnijeg odnosa aktivisanih/zrelih OX62<sup>+</sup> dendritskih ćelija i konvencionalnih Foxp3-CD4<sup>+</sup> T-limfocita u suspenzijama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih pacova, već i starenjem uslovljenih intrinzičnih promena CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ovaj zaključak je izveden na osnovu činjenice da je proliferacija CD4<sup>+</sup> T-limfocita bila manja i u ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova nego u odgovarajućim kulturama mladih DA pacova, budući da ConA direktno stimuliše proliferaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita (Quintans i sar., 1989). Starenjem uslovljeno smanjenje intrinzičnog kapaciteta CD4<sup>+</sup> T-limfocita da proliferišu pokazano je i u



drugim studijama (Lefebvre i Haynes, 2012). S obzirom na to da bi manji proliferativni odgovor na antigensku stimulaciju mogao biti posledica i supresornog delovanja regulatornih CD4<sup>+</sup> Treg ćelija (Takahashi i sar., 1998; Sojka i sar., 2008), ispitana je i procentualna zastupljenost ovih ćelija. Analize su pokazale da nije bilo značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD4<sup>+</sup> Treg ćelija u suspenziji mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih DA pacova. Međutim, zastupljenost IL-10<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> Treg ćelija se starenjem povećavala kod DA pacova, što je takođe moglo doprineti nalazu manjeg proliferativnog odgovora CD4<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih DA pacova u poređenju onim u MBP<sup>+</sup> kulturama mladih DA pacova (Barrat i sar., 2002). Nalaz veće zastupljenosti IL-10<sup>+</sup> ćelija u CD4<sup>+</sup> Treg ćelijama starenjem kod DA pacova bio je u skladu i sa starenjem uslovljenim smanjenjem ekspresije kostimulatornih molekula na dendritskim ćelijama, budući da je pokazano da CD4<sup>+</sup> Treg ćelije mogu ostvariti uticaj na dendritske ćelije redukujući njihov kostimulatorni kapacitet (Cederbom i sar., 2000). S druge strane, uprkos manjoj zastupljenosti proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u ConA<sup>+</sup> kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih AO pacova u poređenju sa ConA<sup>+</sup> kulturama mladih AO pacova, procentualna zastupljenost proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama drenirajućih limfnih čvorova starih i mladih AO pacova nije se razlikovala. Ovakvi nalazi bi se mogli povezati sa povoljnijim odnosom aktivisanih/zrelih dendritskih ćelija i konvencionalnih Foxp3-CD4<sup>+</sup> limfocita kod starih AO pacova u poređenju sa istim kod mladih pacova ovog soja. Procentualna zastupljenost CD4<sup>+</sup> Treg u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova se starenjem povećavala kod AO pacova. Međutim, starenje nije imalo uticaja na zastupljenost IL-10<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> Treg kod AO pacova, što je, imajući u vidu prethodno navedene podatke do kojih su došli Cederbom i sar. (2000), bilo u skladu i sa nepromenjenom procentualnom zastupljenosti aktivisanih/zrelih ćelija u subpopulaciji OX62<sup>+</sup> dendritskih ćelija AO pacova. Na osnovu prethodno navedenih rezultata moglo bi se zaključiti da je odsustvo razlike u procentualnoj zastupljenosti proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u MBP<sup>+</sup> kulturama drenirajućih limfnih čvorova mladih i starih AO pacova bilo rezultanta starenjem uslovljenih promena u imunskim ćelijama koje su uključene u inicijaciju/regulaciju primarnog CD4<sup>+</sup> T-ćelijskog odgovora. Kod starih pacova procentualna zastupljenost proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-

limfocita je bila manja u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih AO pacova nego u odgovarajućim kulturama starih DA pacova. Ovo se najverovatnije može povezati sa manjim proliferativnim kapacitetom CD4+ T-limfocita starih AO pacova u poređenju sa onim koji pokazuju ove ćelije starih DA pacova. U prilog ovakvoj pretpostavci jeste i analiza proliferacije CD4+ T-limfocita u ConA+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova, koja je pokazala manju proliferaciju CD4+ T-limfocita u ConA+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih AO pacova u poređenju sa proliferacijom ovih ćelija u odgovarajućim kulturama starih DA pacova. Kod starih pacova procentualna zastupljenost CD4+ Treg u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova bila je veća kod AO nego DA pacova, što je moglo uticati na manji proliferativni odgovor CD4+ T-limfocita u MBP+ kulturama drenirajućih limfnih čvorova starih AO pacova u poređenju sa proliferativnim odgovorom ovih ćelija u MBP+ kulturama starih DA pacova. S druge strane, zastupljenost IL10+ ćelija u subsetu CD4+ Treg ćelija se starenjem povećavala kod DA pacova, dok se kod AO pacova nije menjala, pa je kod starih pacova bila je veća kod DA nego kod AO pacova. Sumirano, prethodni nalazi impliciraju da je starenje kod DA pacova moglo da dovede do veće zastupljenosti CD4+ Treg ćelija koje su imale veći kapacitet da suprimiraju proliferaciju efektorskih CD4+ T-limfocita (Barrat i sar. 2002; Garg i sar., 2010), dok je kod AO pacova starenje povećavalo zastupljenost svih CD4+ Treg ćelija. U prilog nalazima dobijenim kod DA pacova idu podaci koji pokazuju da se starenjem povećava sposobnost mišjih CD4+ Treg ćelija da *in vitro* suprimiraju proliferaciju efektorskih T-limfocita, kao i da se starenjem u populaciji ovih ćelija povećava zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 (Garg i sar., 2014). S druge strane, u prilog razlikama u zastupljenosti CD4+ Treg ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova idu podaci koji pokazuju da su starenjem uslovljene promene u zastupljenosti CD4+ Treg u slezini i limfnim čvorovima miševa sojno zavisne (Thomas i sar., 2007).

U sledećem koraku je ispitivan sekretorni profil CD4+ T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja. Procentualna zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ T-limfocita, kao i broj CD4+IL17+ T-limfocita, bili su veći u drenirajućim limfnim čvorovima mladih DA pacova nego mladih AO pacova. Ovi nalazi su bili u saglasnosti sa onim dobijenim u ranijim ispitivanjima drugih autora (Miljkovic i sar., 2006). Pokazane su i sojne razlike u sintezi IL-17 u CD4+ T-

limfocitima drenirajućih limfnih čvorova miševa kod kojih je indukovano EAE (Langrish i sar., 2005). Manja zastupljenost IL-17+CD4+ T-limfocita u limfnim čvorovima mladih AO pacova u poređenju sa onom u limfnim čvorovima mladih DA pacova bila je u skladu sa manjom ekspresijom citokina koji usmeravaju/održavaju diferencijaciju Th0 u Th17 ćelije. Nalaz manje ekspresije iRNK za IL-6 i iRNK za IL-23/p19 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova mladih AO pacova u odnosu na ekspresiju iRNK za ove citokine u odgovarajućim ćelijama mladih DA pacova nađen je i u ispitivanjima drugih autora (Markovic i sar., 2009). Istraživanja u sklopu ove disertacije ukazala su i na manju ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  u ovim ćelijama mladih AO pacova u poređenju sa ekspresijom iRNK za ovaj citokin u ćelijama mladih DA pacova. Starenje je kod DA pacova dovelo do smanjenja procentualne zastupljenosti IL-17+ ćelija u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova i ukupnog broja IL-17+CD4+ T-ćelija u njihovim drenirajućim limfnim čvorovima, dok je kod AO pacova dovelo do potpuno suprotnog efekta. Nalaz dobijen kod AO pacova bio je u skladu s podacima koji ukazuju da se starenjem potencira diferencijacija Th17 ćelija kod C57BL/6 miševa, što bi moglo da doprinese lakšoj indukciji kolitisa kod ovih životinja (Ouyang i sar., 2011). Ovaj nalaz kod DA pacova bio je u skladu sa smanjenjem ekspresije iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 starenjem u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. S druge strane, kod AO pacova starenje nije uticalo na ekspresiju iRNK za IL-23/p19 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova, ali jeste dovelo do povećanja ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-6, što je najverovatnije bilo dovoljno da favorizuje diferencijaciju Th0 u Th17 ćelije. U prilog nalazu dobijenom kod AO pacova govore podaci da se starenjem u slezini C57BL/6 miševa povećava ekspresija IL-1 $\beta$  i zastupljenost Th17 ćelija (Lim i sar., 2014). S druge strane pokazano je da se starenjem smanjuje sinteza IL-1 $\beta$  i IL-6 u makrofagama izolovanim iz BALB/c miševa u odgovoru na stimulaciju lipopolisaharidom (Gomez i sar., 2010). Pokazano je da iako se starenjem kod C57BL/6 miševa ne menja ekspresija IL23/p19, diferencijacija Th17 ćelija se povećava (Ouyang i sar., 2010). Činjenica da u literaturi postoje podaci koji ukazuju da se kod nekih sojeva miševa starenjem povećava ekspresija IL23/p19 (El Mezayen i sar., 2009), išli bi u prilog sojnim razlikama uočanim u ekspresiji ovog citokina starenjem kod DA i AO pacova. Posmatrani zajedno, prethodni podaci bi mogli da govore u prilog sojno-zavisnim promenama u ekspresiji proinflamatornih citokina važnih za usmeravanje

diferencijacije Th17 ćelija tokom starenja, kakve su i uočene u ispitivanjima vezanim za ovu disertaciju.

Ispitivanja uticaja starenja na CD4<sup>+</sup> T-limfocite produbljena su ispitivanjem zastupljenosti visoko patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova. Ova ispitivanja su pokazala da je zastupljenost ovih ćelija bila veća kod mladih DA pacova nego mladih AO pacova. Starenjem se zastupljenost ovih ćelija menjala u suprotnom smeru kod DA i AO pacova, odnosno zastupljenost ovih ćelija se smanjivala starenjem kod DA pacova i povećavala starenjem kod AO pacova. Kod starih pacova procentualna zastupljenost IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova bila je veća kod DA nego AO pacova. S obzirom na to da IL-23, kako je ranije i navedeno, podstiče sintezu GM-CSF od strane CD4<sup>+</sup> T-limfocita (Wu i sar., 2016), nalaz zastupljenosti IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova je bio u skladu sa nalazom ekspresije iRNK za IL-23/p19, osim u slučaju starenjem uslovljenog povećanja IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova kod AO pacova. Povećanje zastupljenosti IL-17+IFN- $\gamma$ +GM-CSF<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova starenjem kod AO pacova moglo bi se objasniti povećanjem ekspresije iRNK za IL-1 $\beta$ , s obzirom na to da se smatra da osim IL-23, do ushodne regulacije ekspresije GM-CSF u Th17 ćelijama dovodi i IL-1 $\beta$  (El-Behi i sar., 2011). Podataka o sojnim i uzrasnim razlikama u zastupljenosti ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima EAE pacova nema.

U sklopu ove disertacije ispitivan je i razvoj primarnog Th1 odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima životinja imunizovanih za EAE. Rezultati ove studije potvrdili su da je procentualna zastupljenost IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T-limfocita, i ekspresija IL-12, ključnog citokina za diferencijaciju Th1 limfocita, kako na nivou iRNK za IL-12/p35, specifičnu subjedinicu ovog citokina, tako i IL-12 proteina, bila manja u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova mladih AO pacova u poređenju sa mladim DA pacovima (Miljkovic i sar., 2006; Markovic i sar., 2009). Starenje je kod DA pacova dovelo do smanjenja ekspresije iRNK za IL-12/p35, što je bilo u skladu sa nalazom smanjene zastupljenosti IFN- $\gamma$ +CD4<sup>+</sup> T limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima. Ove nalaze potkrepljuju i ispitivanja Ditamo i sar. (2005), budući da su ona

pokazala da starenje smanjuje jačinu Th1 imunskog odgovora kod Wistar pacova kod kojih je indukovana EAE i sledstveno tome kompromituje razvoj EAE-a. S druge strane, kod AO pacova starenje je imalo suprotan efekat na iste parametre Th1 odgovora koji su analizovani kod DA pacova. Ovaj nalaz podržavaju ranija istraživanja koja su utvrdila da kod C57BL/6 miševa, kod kojih starenje dovodi do razvoja teže kliničke slike EAE-a, splenociti izolovani iz starih životinja pokazuju veću produkciju IFN- $\gamma$  nego oni izolovani iz mladih životinja (Matejuk i sar., 2005). U drenirajućim limfnim čvorovima starih DA i AO pacova nije bilo razlike u zastupljenosti IFN- $\gamma$ +CD4+ T-limfocita. Ovi nalazi su bili u skladu sa ekspresijom iRNK za IL-12/p35 u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova starih DA i AO pacova.

Brojni podaci ukazuju da CD8+ T-limfociti mogu imati značajnu ulogu u induktivnoj fazi EAE-a (Camara i sar., 2013; Huber i sar., 2015). Pokazano je da terminalno diferencirani CD11b+CXCR3+CD8+ T-limfociti pomažu neuro(antigen)-specifičnim CD4+ T-limfocitima da se u drenirajućim limfnim čvorovima diferenciraju u efektorske ćelije koje će infiltrirati CNS (tzv. „reverzna pomoć“), kao i da ovu pomoć CD8+ T-limfociti ostvaruju najverovatnije kroz oslobađanje IFN- $\gamma$  i IL-17 (Christensen i sar., 2001; Groom i Luster, 2011; Camara i sar., 2013; Huber i sar., 2015;). Eksperimentima u kojima je vršena deplecija CD8+ T-limfocita, pokazano je da je ova pomoć CD8+ T-limfocita bila izražena u onim modelima EAE-a, koje je odlikovala relativno blaga klinička slika bolesti, dok se u fulminantnim oblicima EAE-a bolest razvijala i u odsustvu CD8+ T-limfocita (Camara i sar., 2013). U skladu sa pretpostavkom da su terminalno diferencirani CD11b+CXCR3+CD8+ T-limfociti odgovorni za ostvarivanje tzv. „reverzne pomoći“ CD4+ T-limfocitima, nađeno je povećanje broja terminalno diferenciranih CD11b+CXCR3+CD8+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starenjem kod oba soja pacova. Međutim, ovo povećanje bilo je izraženije kod AO pacova, kod kojih je i neurološki deficit bio slabije izražen nego kod starih DA pacova. Osim ovoga, nađen je i veći broj IFN- $\gamma$ + i IL-17+ CD8+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova u poređenju sa brojem ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova. Na osnovu ovih nalaza pretpostavljeno je da su CD4+ T-limfociti u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova dobijali „veću“ pomoć od strane CD8+ T-limfocita nego oni u drenirajućim limfnim čvorovima mladih AO pacova ili pak starih DA pacova. U

prilog ovome govori i izraženije procentualno povećanje zastupljenosti IFN- $\gamma$ + i IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD8+ T-limfocita u MBP+ kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih AO pacova u poređenju sa odgovarajućim kulturama mladih AO pacova, kao i starih DA pacova. Ovakav nalaz kod starih AO pacova mogao bi biti posledica ili veće procentualne zastupljenosti CD8+ T-limfocita specifičnih za MBP pre restimulacije u kulturi ili izrazitijeg proliferativnog odgovora ovih ćelija na stimulaciju MBP-om. Ispitivanja proliferacije CD8+ T-limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova nakon stimulacije MBP-om pokazala su povećanje proliferacije ovih ćelija starenjem kod oba soja pacova. Nasuprot ovakvim nalazima u kulturi, bez obzira na soj pacova, proliferacija CD8+ T-limfocita *ex vivo* i u ConA+ kulturi bila je manja kod starih pacova u poređenju sa mladim. Ovi nalazi su u skladu sa ranijim studijama koje su ukazale na starenjem uslovljeno smanjenje proliferacije sveže izolovanih i CD8+ T-ćelija u ConA+ kulturama (Kirschmann i Murasko, 1992; Nikolich-Zugich i sar., 2012). Međutim, pokazano je da starenje utiče i na smanjenje proliferativnog odgovora T-ćelija na stimulaciju specifičnim antigenom (Kirschmann i Murasko, 1992). Ova diskrepanca između rezultata dobijenih u prethodnim ispitivanjima i ispitivanjima prikazanim u ovoj disertaciji bi se mogla povezati sa podacima koji pokazuju da starenjem kod ljudi i miševa dolazi do akumulacije CD8+ T-limfocita koji ispoljavaju TCR visokog aviditeta za sopstvene peptide prikazane u sklopu MHC molekula (Goronzy i Weyand, 2012; Tatari-Calderone i sar., 2012; Vadasz i sar., 2013). Drugim rečima, moglo bi se pretpostaviti da je nalaz povećanja proliferacije CD8+ T-limfocita u odgovoru na stimulaciju MBP-om u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova starih pacova u odnosu na kulture ovih ćelija mladih životinja odgovarajućeg soja bio prevashodno posledica starenjem uslovljene akumulacije neuroantigen-specifičnih CD8+ T-limfocita u limfnim čvorovima. Nalaz manje proliferacije CD8+ T-limfocita u ConA+ kulturama kod starih AO pacova u poređenju sa odgovarajućim kulturama starih DA pacova, a odsustvo razlike u proliferaciji ovih ćelija u MBP+ kulturama starih pacova ova dva soja ukazivao je na izrazitiju akumulaciju neuroantigen-specifičnih CD8+ T-limfocita u limfnim čvorovima starih AO pacova.

Na osnovu rezultata ove disertacije može se zaključiti da su za razlike u uticaju starenja na osetljivost za razvoj EAE-a kod DA i AO pacova značajnu ulogu mogle imati promene, ne samo na nivou ciljnog organa, već i na nivou drenirajućih limfnih

čvorova. Ove promene su kod DA i AO pacova išle u suprotnom smeru, tako da se starenjem kod DA pacova smanjivalo generisanje neuroantigen specifičnih CD4+ T-limfocita, a kod AO pacova povećavalo. Generisanju encefalitogenih CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova značajan doprinos dali su i CD8+ T-limfociti kroz tzv. „reverznu pomoć“, ostvarenu najverovatnije oslobađanjem IFN- $\gamma$  i IL-17.

Sumirano, rezultati prikazani u sklopu ove doktorske disertacije jasno ukazuju da starenje, na sojno zavisian način, utiče kako na mehanizme koju učestvuju u razvoju oštećujućeg CD4+ T-ćelijskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima i kičmenoj moždini, tako i na mehanizme koji kontrolišu razvoj ovog odgovora. Imajući u vidu uzajamnu povezanost svih ispitivanih mehanizama, na osnovu dobijenih rezultata nije moguće jasno izdvojiti primarno nastale razlike/promene, od onih koje nastaju sekundarno, odnosno nije moguće odgovoriti na pitanje koje su razlike/promene od presudnog značaja za sojno različite uzrasne promene u kliničkom ispoljavanju EAE-a. Međutim, bez obzira na ovu činjenicu, opisani rezultati, bez svake sumnje, doprinose razumevanju mehanizama razvoja EAE-a, pa sledstveno, uz ograničenja vezana za translaciju podataka dobijenih u eksperimentalnim modelima autoimunskih bolesti, i boljem razumevanju inicijalne inflamatorne faze u razvoju humane bolesti - multiple skleroze. Osim toga, njihov značaj bi mogao da bude i u tome, što ukazuju na potrebu, ne samo uzrasno zavisnog, već i personalizovanog pristupa u terapiji multiple skleroze.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Bez obzira na uzrast, ženke pacova DA soja imunizovane homogenatom kičmene moždine u KFA uz davanje *Bordetella pertussis* razvijaju EAE akutnog toka, s tim što se starenjem incidencija i težina kliničke slike bolesti (merena maksimalnim neurološkim deficitom) smanjuje, dok kod ovako imunizovanih ženki AO soja pacova, koje u adultnom uzrastu ne razvijaju klinički manifestnu bolest, starenje dovodi do razvoja relativno blagog neurološkog deficita protražovanog trajanja.
2. Starenjem uzrokovanim sojno zavisnim promenama u incidenciji i kliničkom ispoljavanju EAE-a doprinele su sojne i uzrasne razlike u celularnim i molekularnim mehanizmima razvoja bolesti kako u ciljnom organu (kičmenoj moždini), tako i na periferiji, u slezini (kao organu kroz koji prolaze aktivisani neuroantigen-specifični CD4+ T-limfociti na putu do kičmene moždine), i u drenirajućim limfnim čvorovima.
3. Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u osetljivosti na razvoj bolesti mogu se povezati sa suprotnim uticajem starenja na broj CD4+ T-limfocita sa dominantnom ulogom u razvoju bolesti u ovom modelu EAE-a (Th17 limfociti, posebno oni koji ekspimiraju IFN- $\gamma$  i GM-CSF), koji su izolovani iz kičmene moždine, a što se može objasniti razlikama u uticaju starenja na generisanje neuroantigen-specifičnih CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima, njihovo preživljavanje i reaktivaciju u kičmenoj moždini, kao i usmeravanje/održavanje diferencijacije Th17 limfocita u ovom organu.
4. Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u preživljavanju i reaktivaciji neuroantigen specifičnih CD4+ T limfocita u kičmenoj moždini mogu se povezati i sa sojnim razlikama u intrinzičnim svojstvima samih CD4+ T-limfocita (ispoljavanje CD134 molekula), zastupljenosti citolitičkih CX3CR1+ NK ćelija sa protektivnim delovanjem, antigen prezentujućih ćelija nastalih iz proinflamatornih monocita, kao i broju i fenotipskom profilu regulatornih T-limfocita (odnos CD4+ i CD8+ Treg), dok bi se sojne razlike u broju Th17 limfocita mogle pripisati i razlikama u lokalnoj



---

sekreciji citokina koji usmeravaju (IL-1 $\beta$ , IL-6)/održavaju (IL-23) njihovu diferencijaciju.

5. Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u kliničkom toku bolesti mogu se povezati sa sojnim razlikama u sposobnosti mikroglije da ukloni oštećene/apoptotične ćelije i ćelijski debris i da sekretuje molekule sa imunoregulatornim/protektivnim svojstvima (manju efikasnost pokazuje mikroglija starih AO pacova nego mikroglija starih DA pacova), kao i da kontroliše sintezu proinflamatornih citokina, kao što je IL- $\beta$ .
6. Manjoj infiltraciji CD4<sup>+</sup> T-limfocitima kičmene moždine starih DA pacova u odnosu na mlade pacove istog soja bi moglo da doprinese povećano zadržavanje aktivisanih (u drenirajućim limfnim čvorovima) neuroantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezini, a što bi moglo da se poveže sa većom ekspresijom CD44s molekula na ovim ćelijama i većom zastupljenošću regulatornih CD4<sup>+</sup> Treg u slezini starih pacova.
7. Divergentni uticaj starenja na generisanje antigen-specifičnih visoko patogenih Th17 limfocita koji ekspimiraju IFN- $\gamma$  i GM-CSF u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova bi mogao da se poveže sa različitim uticajem starenja na broj aktivisanih dendritskih ćelija i T-regulatornih ćelija i sledstveno aktivaciju i proliferaciju konvencionalnih CD4<sup>+</sup> T-ćelija, lokalnu ekspresiju citokina koji usmeravaju/održavaju diferencijaciju visoko patogenih Th17 limfocita i zastupljenost terminalno diferenciranih CD8<sup>+</sup> T limfocita, posebno onih koji ekspimiraju IL-17, kao ćelija koje podržavaju diferencijaciju Th17 limfocita pružajući im tzv. „reverznu“ pomoć.

---

## 7. LITERATURA

Abedin S, Michel JJ, Lemster B, Vallejo AN. Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Exp Gerontol* 2005;40:537–48.

Abutbul S, Shapiro J, Szaingurten-Solodkin I, Levy N, Carmy Y, Baron R, Jung S, Monsonego A. TGF- $\beta$  signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. *Glia* 2012;60(7):1160-71.

Adachi Y, Taketani S, Toki J, Ikebukuro K, Sugiura K, Oyaizu H, Yasumizu R, Tomita M, Kaneda H, Amoh Y, Ito T, Okigaki M, Inaba M, Ikehara S. Marked increase in number of dendritic cells in autoimmune-prone (NZW x BXSB)F1 mice with age. *Stem Cells* 2002;20(1):61-72.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278(3):1910-4.

Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* 2007; 178(11):6912-22.

Agrawal A, Tay J, Ton S, Agrawal S, Gupta S. Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. *J Immunol* 2009;182:1138–1145.

Ahn M, Yang W, Kim H, Jin JK, Moon C, Shin T. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2012;1453:77-86.

Alcaraz MJ, Fernández P, Guillén MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des.* 2003;9(30):2541-51.

Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity.* 2008;29(5):795-806.

---

Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol*. 2011;72(4):319-29.

Almolda B, Costa M, Montoya M, González B, Castellano B. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J Neuroimmunol* 2009;209:65-80.

Almolda B, Costa M, Montoya M, González B, Castellano B. Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. *PLoS One*. 2011;6(11):e27473.

Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008;71:129–135.

Alvord EC, Shaw Jr C-M, Hruby S, Kies MW. Encephalitogen induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis: prevention, suppression and therapy. *Ann NY Acad Sci* 1965;122:333.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245–5250.

Anderson OA, Finkelstein A, Shima DT. A2E induces IL-1 $\beta$  production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome. *PLoS One* 2013;8(6):e67263.

Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Immunol* 2015;6:492.

Arndt A, Hoffacker P, Zellmer K, Goecer O, Recks MS, Kuerten S. Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99794.

Asanuma H, Hirokawa K, Uchiyama M, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Sata T, Tamura S. Immune responses and protection in different strains of aged mice

immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine. *Vaccine* 2001;19(28-29):3981-9.

Baaten BJ, Li CR, Deiro MF, Lin MM, Linton PJ, Bradley LM. CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* 2010;32(1):104-15.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192:393– 404.

Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C. Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 2011;32(11):2030.

Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 2018;97(4):742–768.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195(5):603-16.

Becker KJ. Strain-Related Differences in the Immune Response: Relevance to Human Stroke. *Transl Stroke Res* 2016;7(4):303-12.

Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 1994;96(5):457–462.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6:353–360

Ben-Nun A, Ron Y, Cohen IR. Spontaneous remission of autoimmune encephalomyelitis is inhibited by splenectomy, thymectomy or ageing. *Nature* 1980;288(5789):389–390.

Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997;75(3):165–173.

Bernard CCA. Suppressor T cells prevent experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1977;29:100.

Berti A, Campochiaro C, Cavalli G, Pepe G, Praderio L, Sabbadini MG, Dagna L. Giant cell arteritis restricted to the limb arteries: an overlooked clinical entity. *Autoimmun Rev* 2015;14:352-357.

Berzins SP, Uldrich AP, Sutherland JS, Gill J, Miller JF, Godfrey DI, Boyd RL. Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks. *Trends Mol Med* 2002;8(10):469-476.

Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 2003;197:1073–1081.

Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 2010;68(1):19-31.

Bhaumik S, Basu R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. *Front Immunol* 2017;8:254

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70:849–60.

Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Sanchez MG, El Hajj H, Milior G, Olmos Alonso A, Gomez-Nicola D, Luheshi G, Vallieres L, Branchi I, Maggi L, Limatola C, Butovsky O, Tremblay ME. Dark microglia: a new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 2016;64:826–839.

Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. *JoVE* 2014;86:51275.

---

Bjorksten B. Environmental influences on the development of the immune system: consequences for disease outcome. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2008; 61:243–254.

Bollyky PL, Falk BA, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol* 2009;183(4):2232-41.

Bonafè M, Storci G, Franceschi C. Inflamm-aging of the stem cell niche: breast cancer as a paradigmatic example: breakdown of the multi-shell cytokine network fuels cancer in aged people. *BioEssays* 2012;34(1):40-9.

Bove RM, Healy B, Augustine A, Musallam A, Gholipour T, Chitnis T. Effect of gender on late-onset multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18(10):1472-9.

Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4(+)CD28(-) T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* 2012;18:446–53.

Brückener KE, el Baya A, Galla HJ, Schmidt MA. Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J Cell Sci* 2003;116:1837–1846.

Bufan B, Stojić-Vukanić Z, Djikić J, Kosec D, Pilipović I, Nacka-Aleksić M, Arsenović-Ranin N, Leposavić G. Aging impairs endocytic capacity of splenic dendritic cells from Dark Agouti rats and alters their response to TLR4 stimulation. *Acta Vet-Beograd* 2015;65(1):30–55.

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

Butcher SK, Lord JM. Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. *Aging Cell* 2004;3(4):151-60.

Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, Cuzzocrea S, Zappia M, Giordano J, Calabrese EJ. Aging and parkinson's disease: inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic Biol Med* 2018;115:80–91.

---

Camara M, Beyersdorf N, Fischer HJ, Herold MJ, Ip CW, van den Brandt J, Toyka KV, Taurog JD, Hünig T, Herrmann T, Reichardt HM, Weishaupt A, Kerkau T. CD8<sup>+</sup> T cell help is required for efficient induction of EAE in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 2013;260(1-2):17-27.

Camp RL, Kraus TA, Puré E. Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J Cell Biol* 1991;115(5):1283-92.

Carboni S, Aboul-Enein F, Waltzinger C, Killeen N, Lassmann H, Pena-Rossi C. CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;146:84–93.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 2006;9(7):917-24.

Caruso C, Buffa S, Candore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D, Pawelec G. Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 2009;6:10.

Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1538-43.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782–7.

Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, Activation, and Protection of Dendritic Cells Induced by Double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189(5):821-9.

Cevenini E, Monti D, Franceschi C. Inflammaging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:14–20.

Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- $\beta$ 1. *Cell Stem Cell* 2010;6:265–78.

---

Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 2007;5(8):e201.

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

Chiu BC, Stolberg VR, Zhang H, Chensue SW. Increased Foxp3(+) Treg cell activity reduces dendritic cell co-stimulatory molecule expression in aged mice. *Mech Ageing Dev* 2007;128:618–627.

Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J: Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* 2000;192:549-556.

Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 2008;111:5553–61.

Chougnet CA, Thacker RI, Shehata HM, Hennies CM, Lehn MA, Lages CS. Loss of phagocytic and antigen cross-presenting capacity in aging dendritic cells is associated with mitochondrial dysfunction. *J Immunol* 2015;195(6):2624–32.

Chougnet CA, Tripathi P, Lages CS, Raynor J, Sholl A, Fink P, Plas DR, Hildeman DA. A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 2011; 186(1):156-163.

Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, Thomsen AR. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells. *Int Immunol* 2001;13(4):593-600.

Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2018;318:1-7.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009;30(4):576-87.



---

Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011;12(6):560–7.

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

Constantinescu CS, Hilliard BA. Adjuvants in EAE. In: Lavi E., Constantinescu C.S. (eds) *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Springer, Boston, MA 2005;73–84.

Corona AW, Huang Y, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW, Popovich PG, Godbout JP. Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 2010;7:93.

Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009;70(4):326–36.

Cosmi L, Liotta F, Maggi ., Romagnani S, Annunziato F. Th17 and nonclassical Th1 cells in chronic inflammatory disorders: two sides of the same coin. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;164:171–177.

Croxford A, Spath S, Becher B. GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trends Immunol* 2015b;36(10):651–662.

Croxford AL, Lanzinger M, Hartmann FJ, Schreiner B, Mair F, Pelczar P, Clausen BE, Jung S, Greter M, Becher B. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2<sup>+</sup> Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* 2015a;43(3):502–14.

Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *J Immunol* 2003 ;171(10):5165–71.

Damsker JM, Hansen AM., Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann NY Acad Sc.* 2010;1183:211–221.

Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou M E, De Courten M, Matsoukas J, Apostolopoulos V. Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain Sci* 2017;7:E78.

Datta S, Sarvetnick N. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases *Trends Immunol* 2009;30(9):430-438.

Day MJ. Histopathology of EAE. In: Lavi E., Constantinescu C.S. (eds) *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Springer, Boston, MA 2005;25-43.

De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidationinflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009;15(26):3003-26.

Deak F, Sonntag WE. Aging, synaptic dysfunction, and insulin-like growth factor (IGF)-1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012;67(6):611–625.

Dejaco C, Duftner C, Schirmer M. Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp Gerontol* 2006;41(4), 339-345.

Delalande S, de Seze J, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P. Late onset multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2002;158(11):1082–1087.

Di Benedetto S, Müller L, Wenger E, Düzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev* 2017;75:114–128.

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

Dimitrijević M, Laban O, von Hoersten S, Marković BM, Janković BD. Neonatal sound stress and development of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis and DA rats. *Int J Neurosci* 1994;78(1-2):135-43.

Dimitrijevic M, Stanojevic S, Blagojevic V, Curuvija I, Vujnovic I, Petrovic R, Arsenovic-Ranin N, Vujic V, Lepasovic G. Aging affects the responsiveness of rat peritoneal macrophages to GM-CSF and IL-4. *Biogerontology* 2016;17:359–371.

---

Dimitrijević M, Stanojević S, Vujić V, Aleksić I, Pilipović I, Lepasavić G. Aging oppositely affects TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology* 2014;15(5):475-486.

Ditamo Y, Degano AL, Maccio DR, Pistoiresi-Palencia MC, Roth GA. Age-related changes in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 2005;83(1):75–82.

Duong TT, St Louis J, Gilbert JJ, Finkelman FD, Strejan GH. Effect of anti-interferon-gamma and anti-interleukin-2 monoclonal antibody treatment on the development of actively and passively induced experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *J Neuroimmunol* 1992;36(2-3):105-15.

Eisenbraun MD, Tamir A, Miller RA. Altered composition of the immunological synapse in an anergic, age-dependent memory T cell subset. *J Immunol* 2000;164:6105-12.

El Mezayen R, El Gazzar M, Myer R, High KP. Aging-dependent upregulation of IL-23p19 gene expression in dendritic cells is associated with differential transcription factor binding and histone modifications. *Aging Cell* 2009;8(5):553-65.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang G-X, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 2011;12:568–575.

Endoh M, Rapoport SI, Tabira T. Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice. *J. Neuroimmunol* 1990;1:21–31.

Fang M, Roscoe F, Sigal LJ. Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. *J Exp Med* 2010;207(11):2369–2381.

Fasth AE, Cao D, van Vollenhoven R, Trollmo C, Malmstrom V. CD28nullCD4+ T cells— characterization of an effector memory T-cell population in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2004;60:199 –208.

Fenn AM, Norden DM, Godbout JP. Neuroinflammation in Aging. *Neuroinflammation* 2015;87–105.

Fenn AM, Smith KM, Lovett-Racke AE, Guerau-de-Arellano M, Whitacre CC, Godbout JP. Increased micro-RNA 29b in the aged brain correlates with the reduction of insulin-like growth factor-1 and fractalkine ligand. *Neurobiol Aging* 2013;34:2748–2758.

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

Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 2009;10:689–695.

Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ. Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res* 2007;10:61–74.

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

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001;14(5):547-60.

Flynn KM, Michaud M, Madri JA. CD44 deficiency contributes to enhanced experimental autoimmune encephalomyelitis: a role in immune cells and vascular cells of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 2013;182(4):1322-36.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005;22(3):329-41.

Ford ML, Evavold BD. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2005;35:76–85.

---

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-54.

Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69 Suppl 1:S4-9.

Frasca D, Blomberg BB. Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology* 2015;17(1):7-19.

Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J Immunol.* 2008;180:2741–2746.

Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:566–577.

Garcia GG, Miller RA. Age-related changes in lck-Vav signaling pathways in mouse CD4 T cells. *Cell Immunol* 2009;259:100–4.

Garcia GG, Miller RA. Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naive T cells from aged mice. *J Immunol* 2001;166:3151-7

Garg SK, Delaney C, Toubai T, Ghosh A, Reddy P, Banerjee R, Yung R. Aging is associated with increased regulatory T-cell function. *Aging Cell* 2014;13(3):441-8.

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

Gemma C, Vila J, Bachstetter A, et al. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 15.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467(7318):967-71.

Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2008;11;5:51.

Giunta S. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflammaging, from robustness to frailty. *Inflamm Res* 2008;57(12):558–563

Goldmann T, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:208093.

Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 2000;192:557-564.

Gomez CR, Karavitis J, Palmer JL, Faunce DE, Ramirez L, Nomellini V, Kovacs EJ. Interleukin-6 Contributes to Age-Related Alteration of Cytokine Production by Macrophages. *Mediators Inflamm* 2010;475139:7.

Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. *J Virol* 2001;75(24), 12182–12187.

Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Exp Gerontol* 2007;42(5), 400-406.

Goronzy JJ, Li G, Yu M, Weyand CM. Signaling pathways in aged T cells - a reflection of T cell differentiation, cell senescence and host environment. *Semin Immunol* 2012;24(5):365-72.

Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. The number of human peripheral blood CD4+ CD25 high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005;140:540–546.

Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Med* 2005;11:328–334.

Greter M, Lelios I, Croxford AL. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol* 2015;6:249.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883–899.

Grolleau-Julius A, Ray D, & Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39(1):42-50.

Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* 2011;317(5):620-31.

Günther E, Odenthal H, Wechsler W. Association between susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the major histocompatibility system in congenic rat strains. *Clin Exp Immunol* 1978; 32(3):429-34.

Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, Meisel C, Zipp F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology* 2011;133:62–73.

Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo D 1 I, Xiang R, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* 2010;207:1907–21.

Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(18):10896–10901.

Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Rincon M, Swain SL. Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2004;172: 5194–5199.

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

Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell* 2012;11(5):751–9.

Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:201–211.

Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun* 2009;23:309e317.

Henson SM. Effects of Ageing on Adaptive Immune Responses. In: Bueno V, Lord J, Jackson T. (eds) *The Ageing Immune System and Health*. Springer 2017;21-33.

Herrero C, Marques L, Lloberas J, Celada A. IFN-gamma dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *J Clin Invest* 2001;107, 485–493.

Hertwig L, Hamann I, Romero-Suarez S, Millward JM, Pietrek R, Chanvillard C, Stuis H, Pollok K, Ransohoff RM, Cardona AE, Infante-Duarte C. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. *Eur J Immunol*. 2016;46(8):1984-96.

Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 2012;3:708.

Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2013;16:1896–1905.

Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 2002;169(1):117-25.



---

Hooge JP, Redekop WK. Multiple sclerosis with very late onset. *Neurology* 1992;42:1907–1910.

Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *Faseb J* 2006;20:896–905.

Huang L, Xu G, Guo J, Xie M, Chen L, Xu W. Mesenchymal stem cells modulate light-induced activation of retinal microglia through CX3CL1/CX3CR1. *Ocul Immunol Inflamm* 2016;24(6):684-692.

Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 2009;39:1716–1725.

Huber M, Lohoff M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis. *Allergo J Int* 2015;24:8–15.

Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of Foxp3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 2009; 9(2):83–89.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001;194(5):669-76.

Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on  $\alpha 4$  integrin. *Brain* 2011;134:3560–3577.

Ishikawa S, Nagai S, Sato T, Akadegawa K, Yoneyama H, Zhang YY, Onai N, Matsushima K. Increased circulating CD11b+CD11c+ dendritic cells (DC) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC/CXCL13-producing DC. *Eur J Immunol* 2002;32(7):1881-7.

Jackaman C, Radley-Crabb HG, Soffe Z, Shavlakadze T, Grounds MD, Nelson DJ. Targeting macrophages rescues age-related immune deficiencies in C57BL/6J geriatric mice. *Aging Cell* 2013;12:345–357.

---

Jagger AT, Shimojima Y, Goronzy JJ, Weyand CM. T regulatory cells and the immune aging process. *Gerontology* 2014;60(2):130–137.

Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee J M, Irizarry A R, Kim K, Rossi J D, Inlay AM, Serwold T, Karsunky H, Ho L, Daley QG, Weissman I L, Feinberg PA. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 2010; 467:338–42.

Jiang HR, Milovanovic M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY. IL 33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42:1804–1814.

Källén B, Nilsson O. Age as a Factor Determining Susceptibility for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;90(1):16-9.

Kamath AB, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Characterization of phenotypic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thymocytes in vivo and its effect on apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;150(1):117-24.

Kaufmann U, Diedrichs-Möhring M, Wildner G. Dynamics of intraocular IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis. *PLoS One* 2012;7(11):e49008.

Kieper WC, Jameson SC. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13306-13311.

Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. *J Comp Neurol* 2006;494(4):578-94.

Kirschmann DA, Murasko DM. Splenic and inguinal lymph node T cells of aged mice respond differently to polyclonal and antigen-specific stimuli. *Cell Immunol* 1992;139(2):426-37.

Kis B, Rumberg B, Berlit P. Clinical characteristics of patients with late-onset multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:697–702.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177(1):566-73.

Koriem KMM. Multiple sclerosis: New insights and trends. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016;6:429–440.

Kridin K, Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med* 2018;5:220.

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

Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid proteinspecific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;151:4371-82.

Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells* 2013;18:247–65

Laban O, Marković BM, Dimitrijević M, Janković BD. Maternal deprivation and early weaning modulate experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain Behav Immun* 1995;9(1):9-19.

Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, Belkaid Y, Chouhnet C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol* 2008; 181:1835–1848.

Lando Z, Teitelbaum D, Arnon R. Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE. *J Immunol* 1979;123(5):2156-60.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201(2):233-40.

Lansdorp PM, Dragowska W, Thomas TE, Little MT, Mayani H. Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates. *Blood Cells* 1994;20:376.

Laouar Y, Crispe IN. Functional Flexibility in T Cells: Independent Regulation of CD41 T Cell Proliferation and Effector Function In Vivo. *Immunity* 2000;13:291-301.

Larbi A, Douziech N, Dupuis G, Khalil A, Pelletier H, Guerard KP. Age-associated alterations in the recruitment of signal-transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2004;75:373–81.

Larbi A, Dupuis G, Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fulop Jr T. Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging. *Cell Signal* 2006;18:1017–30.

Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases. *J Inflamm Res* 2016;9:1–11.

Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017;133(2):223–244.

Lastres-Becker I, Innamorato NG, Jaworski T, Rábano A, Kügler S, Van Leuven F, Cuadrado A. Fractalkine activates NRF2/NFE2L2 and heme oxygenase 1 to restrain tauopathy-induced microgliosis. *Brain* 2014;137(Pt 1):78-91.

Lee GH, Lee WW. Unusual CD4+CD28– T Cells and Their Pathogenic Role in Chronic Inflammatory Disorders. *Immune Netw* 2016;16:322-329.

Lefebvre JS, Haynes L. Aging of the CD4 T Cell Compartment. *Open Longev Sci* 2012;6:83-91.

Lehmann D, Ben-Nun A. Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 1992;5(6):675-90.

Leibowitz U, Alter M, Halpern L. Clinical studies of multiple sclerosis in Israel. III. Clinical course and prognosis related to age at onset. *Neurology* 1964;14(10):926-32.

Lenz DC, Wolf NA, Swanborg RH. Strain variation in autoimmunity: Attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999;163:1763-1768.

Lerner A, Yamada T, Miller RA. Pgp-1hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A *Eur.J Immunol* 1989;19:977-982

Levine S, Wenk EJ. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats without the aid of adjuvant. *Ann NY Acad Sci* 1965;122:209-226.

Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 2007;130(Pt 2):490-501.

Lim MA, Lee J, Park JS, Jhun JY, Moon YM, Cho ML, Kim HY. Increased Th17 differentiation in aged mice is significantly associated with high IL-1 $\beta$  level and low IL-2 expression. *Exp Gerontol* 2014;49:55-62.

Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:1403-13.

Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J, et al. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* 2004;21:719-31.

Lubetzki C, Stankoff B. Demyelination in multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 2014;122:89-99.

Lublin FD, Knobler RL, Kalman B, Goldhaber M, Marini J, Perrault M, D'Imperio C, Joseph J, Alkan SS, Korngold R. Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity* 1993;16:267-74.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717

Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(4):532-62.

---

Ludowyk PA, Hughes W, Hugh A, Willenborg DO, Rockett KA, Parish CR. Astrocytic hypertrophy: An important pathological feature of chronic experimental autoimmune encephalitis in aged rats. *J Neuroimmunol* 1993;48(2):121-34

Lukic ML, Mensah-Brown E, Galadari S, Shahin A. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Dev Immunol* 2001;8(3-4):193-20010.

Lung TL, Saurwein-Teissl M, Parson W, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstein B. Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. *Vaccine* 2000;18(16):1606-12.

Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 2009;30:366-73. doi:10.1016/j.it.2009.04.003

Lyons A, Lynch AM, Downer EJ, Hanley R, O'Sullivan JB, Smith A, Lynch MA. Fractalkine-induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attenuates microglial activation in vivo and in vitro. *J Neurochem* 2009;110(5):1547-56.

Maher FO, Nolan Y, Lynch MA. Downregulation of IL-4-induced signaling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging* 2005;26:717e728

Maly K, Schirmer M. The Story of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T Cells Revisited: Solved or Still Ongoing? *J Immunol Res* 2015;2015:348746.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-686

Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L, Facchini A. Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev* 1996;20;92(2-3):195-209.

Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental

---

autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol* 2009;47:141-146.

Mars LT, Araujo L, Kerschen P, Diem S, Bourgeois E, Van LP, Carrié N, Dy M, Liblau RS, Herbelin A. Invariant NKT cells inhibit development of the Th17 lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(15):6238-43.

Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Comi G. Late onset multiple sclerosis: clinical characteristics, prognostic factors and differential diagnosis. *Neurol Sci* 2004;25 Suppl 4:S350-5.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol* 2006;177:7303-7311.

Matejuk A, Hopke C, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J Immunol* 2005;174(4):2387-95.

Matsumoto Y, Kohyama K, Aikawa Y, Shin T, Kawazoe Y, Suzuki Y, Tanuma N. Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998;28:1681-88.

Mawhinney LJ, de Rivero Vaccari JP, Dale GA, Keane RW., Bramlett HM. Heightened inflammasome activation is linked to age-related cognitive impairment in Fischer 344 rats. *BMC Neurosci* 2011;12:123.

Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T. CD8+Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *Eur J Immunol* 2011;41:716-725.

McAleer JP, Kolls JK. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J Leukoc Biol* 2011;90(2):263-70. Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 2007;130(Pt 2):490-501.

McCandless EE, Budde M, Lees JR, Dorsey D, Lyng E, Klein RS. IL-1R signaling within the central nervous system regulates CXCL12 expression at the blood-

---

brain barrier and disease severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009;183(1):613-20.

McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:8053–8064.

McCarthy DP, Richards MH, Miller SD. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol* 2012;900:381-401.

McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. *Front Immunol.* 2015;6:68.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8(12):1390-7.

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

McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ Regulatory Cells within the Central Nervous System. *J Immunol* 2005;175(5):3025-32.

McLaughlin P, Zhou Y, Ma T, Liu J, Zhang W, Hong JS, Kovacs M, Zhang J. Proteomic analysis of microglial contribution to mouse strain-dependent dopaminergic neurotoxicity. *Glia.* 2006;53(6):567-82.

McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Med* 2005;11:335–339.

McWilliams IL, Rajbhandari R, Nozell S, Benveniste E, Harrington LE. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. *J Neuroinflammation* 2015;12:128.

Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol* 2011;232(1-2):68–74.



Merrill JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, Hofman FM. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(2):574–8.

Miljković D, Stanojević Ž, Momčilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology* 2011;216(9):979–987.

Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Popadic D, Cvetkovic I, Mostarica-Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *J Neurosci Res* 2006;84:379-388.

Miller SD, Karpus WJ. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 2007;Chapter 15:Unit 15.1.

Miyakoshi A, Yoon WK, Jee K, Matsumoto Y. Characterization of antigen specificity and TCR repertoire, and TCR-based DNA vaccine therapy in myelin basic protein-induced autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Immunol* 2003;170:6371–8.

Montgomery RR, Shaw AC. Paradoxical changes in innate immunity in aging: recent progress and new directions. *J Leukoc Biol* 2015;98(6):937–43.

Moosig F, Csernok E, Wang G, Gross WL. Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells. *Clin Exp Immunol* 1998;114:113–8.

Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Cellular and genetic basis of the relative resistance to the induction of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in albino oxford (AO) rats. *Adv Exp Med Biol* 1982a;149:699–702.

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

Mousa HS, Carbone M, Malinverno F, Ronca V, Gershwin ME, Invernizzi P. Novel therapeutics for primary biliary cholangitis: toward a disease-stage-based approach. *Autoimmun Rev* 2016;15:870-876.

Müller L, Pawelec G. As we age: Does slippage of quality control in the immune system lead to collateral damage? *Ageing Res Rev* 2015; 23(Pt A):116-23.

Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010;24(4):641-51.

Musella A, Gentile A, Rizzo FR, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, Guadalupi L, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Centonze D, Mandolesi G. Interplay Between Age and Neuroinflammation in Multiple Sclerosis: Effects on Motor and Cognitive Functions. *Front Aging Neurosci* 2018;10:238.

Nacka-Aleksić M, Stojanović M, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Kosec D, Leposavić G. Strain differences in thymic atrophy in rats immunized for EAE correlate with the clinical outcome of immunization. *PLoS One* 2018;13(8):e0201848.

Nacka-Aleksić M, Stojanović M, Simić L, Bufan B, Kotur-Stevuljević J, Stojić-Vukanić Z, Dimitrijević M, Ražić S, Leposavić G. Sex as a determinant of age-related changes in rat spinal cord inflammation-oxidation state. *Biogerontology* 2017;18(5), 821–839.

Nair S, Fang M, Sigal LJ. The natural killer cell dysfunction of aged mice is due to the bone marrow stroma and is not restored by IL-15/IL-15R $\alpha$  treatment. *Ageing Cell* 2015;14(2):180-90.

Naor D, Nedvetzki S, Walmsley M, Yayon A, Turley EA, Golan I, Caspi D, Sebban LE, Zick Y, Garin T, Karussis D, Assayag-Asherie N, Raz I, Weiss L, Slavin S, Golan I. CD44 involvement in autoimmune inflammations: the lesson to be learned from CD44-targeting by antibody or from knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:233-47.

---

Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. *Immunol Rev* 2015;269:118–129.

Nel AE, Slaughter N. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2. A role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109, 901–915.

Nickles D, Abschuetz A, Zimmer H, Kees T, Geibig R, Spiess E, Régnier-Vigouroux A. End-stage dying glioma cells are engulfed by mouse microglia with a strain-dependent efficacy. *J Neuroimmunol* 2008;197(1):10-20.

Nikodemova M, Watters JJ. Outbred ICR/CD1 mice display more severe neuroinflammation mediated by microglial TLR4/CD14 activation than inbred C57Bl/6 mice. *Neuroscience* 2011;190:67-74.

Nikolich-Žugich J, Li G, Uhrlaub JL, Renkema KR, Smithey MJ. Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection. *Semin Immunol* 2012;24(5):356-64.

Nikolich-Žugich J. Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories. *J Immunol* 2014;193(6):2622-9.

Nikolich-Žugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol* 2017;19(1):10–19.

Noble A, Giorgini A, Leggat JA. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 2006;107:4475–4483.

Norden DM, Godbout JP. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013;39:19e34.

Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2015;96:29–41.

Noseworthy JH. Clinical trials in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993;6:209–215.

Olsson T. Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 1992;40(2–3):211–8.

Ouyang X, Yang Z, Zhang R, Arnaboldi P, Lu G, Li Q, Wang W, Zhang B, Cui M, Zhang H, Liang-Chen J, Qin L, Zheng F, Huang B, Xiong H. Potentiation of Th17 cytokines in aging process contributes to the development of colitis. *Cell Immunol* 2011;266(2):208-17.

Pahlavani MA. T cell signaling: effect of age. *Front Biosci* 1998;3:D1120–33.

Paty DW, Boiko AN, Vorobeychi GK. Multiple Sclerosis with early and late disease onset. In: McDonald WI, Noseworthy JM (eds) *Multiple Sclerosis 2*. Butterworth Heinemann, 2003;285–302

Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. T cells and aging. *Front. Biosci* 2002;7:1056-1183.

Pawelec G. T-cell immunity in the aging human. *Haematologica* 2014;99(5):795-797.

Peeters LM, Vanheusden M, Somers V, Van Wijmeersch B, Stinissen P, Broux B. Cytotoxic CD4+ T Cells Drive Multiple Sclerosis Progression. *Front Immunol* 2017;8:1160.

Peferoen LAN, Breur M, van de Berg S, Peferoen-Baert R, Boddeke EHWGM, van der Valk P, Pryce G, van Noort JM, Baker D, Amor S. Ageing and recurrent episodes of neuroinflammation promote progressive EAE in Biozzi mice. *Immunology* 2016;149:146–156

Perry V, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.*2013;35(5):601-612.

Pfister G, Weiskopf D, Lazuardi L, Kovaiou RD, Cioca DP, Keller M, Lorbeg B, Parson W, Grubeck-Loebenstien B. Naive T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:152.

Pfister G., Savino W. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation* 2008;15(4-6):351-64.

Pinchuk LM, Filipov NM. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun Ageing*. 2008;5:1.

Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ.. Aging and innate immune cells. *J. Leukoc Biol* 2004;76:291–299.

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

Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM, Fletcher JM, Belaramani LL, Salmon M. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8 + CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol* 2007;178:7710–9.

Polliack ML, Barak Y, Achiron A. Late-Onset Multiple Sclerosis. *J Am Geriatr Soc* 2001;49(2):168–171.

Ponomarev ED, Novikova M, Yassai M, Szczepanik M, Gorski J, Dittel BN. Gamma delta T cell regulation of IFN-gamma production by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells: correlation with recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 1587-95.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis *J Immunol* 2007;178(1):39-48.

Prochazkova J, Pokorna K, Holan V. IL-12 inhibits the TGF- $\beta$ -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- $\beta$ -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology* 2012;217:74-82.

Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 2001;7(5):213-21.

Quintans J, Yokoyama A, Evavold B, Hirsch R, Mayforth RD. Direct activation of murine resting T cells by con A or anti-CD3 Ig. *J Mol Cell Immunol* 1989;4(4):225-35.

Rabchevsky AG, Degos JD, Dreyfus PA. Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. *Brain Res* 1999;832(1-2):84-96.

Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, Mari ER, Safavi F, Leist TP, Zhang GX, Rostami A. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- $\beta$  Therapy. *J Immunol* 2015;194(11):5085-93.

Ratliff M, Alter S, Frasca D, Blomberg BB, Riley RL. In senescence, age-associated B cells secrete TNF $\alpha$  and inhibit survival of B-cell precursors. *Aging Cell* 2013;12:303–311

Raynor J, Lages CS, Shehata H, Hildeman DA, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Curr Opin Immunol* 2012;24(4):482-7.

Raynor J, Sholl A, Plas DR, Bouillet P, Chougnet CA, Hildeman DA. IL-15 Fosters Age-Driven Regulatory T Cell Accrual in the Face of Declining IL-2 Levels. *Front Immunol* 2013;4:161.

Régnier-Vigouroux A. The mannose receptor in the brain. *Int Rev Cytol* 2003;226:321–342.

Rigolio R, Biffi A, Oggioni N, Cavaletti G. Actively induced EAE in Lewis rats: characterization of spleen and spinal cord infiltrating lymphocytes by flow cytometry during the course of the disease. *J Neuroimmunol* 2008;199(1-2):67-74.

Ritzel RM, Crapser J, Patel AR, Verma R, Grenier JM, Chauhan A, Jellison ER., McCullough LD. Age-associated resident memory CD8 T cells in the CNS are primed to potentiate inflammation after ischemic brain injury. *J Immunol* 2016;196:3318–3330.

Ritzel RM, Patel AR, Pan S, Crapser J, Hammond M, Jellison E, McCullough LD. Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 2015;36(6):2153-63.

Rogers P., Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 2001;15:445–455.

Rosenkranz D, Weyer S, Tolosa E, Gaenslen A, Berg D, Leyhe T, Gasser T, Stoltze L. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 2007;188(1-2):117-27.

Rossi B, Constantin G. Live Imaging of Immune Responses in Experimental Models of Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2016;7:506.

Rossi DJ, Bryder D, Zahn MJ, Ahlenius H, Sonu R, Wagers JA, and Weissman L I. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102, 9194–9199

Rubin K, Glazer S. The potential role of subclinical *Bordetella Pertussis* colonization in the etiology of multiple sclerosis. *Immunobiology* 2016;221(4):512–515.

Rubtsov AV, Rubtsova K, Fischer A, Meehan RT, Gillis JZ, Kappler JW, Marrack P. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 2011;118:1305–1315.

Sakuma H, Kohyama K, Park IK. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats. *Brain* 2004;127:2201–2213.

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 2012;4(3):166-75.

Sanvito L, Constantinescu CS, Gran B, 't Hart BA. The multifaceted role of interferon- $\gamma$  central nervous system autoimmune demyelination. *Open Autoimmunity J* 2010;2:151–9.

Schiffenbauer J, Johnson HM, Butfiloski EJ, Wegrzyn L, Soos JM. Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8543-6.

Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;3:51.

Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* 1996;97:2027–37.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311-22.

Sebastian C, Espia M, Serra M, Celada A, Lloberas J. MacrophAging: a cellular and molecular review. *Immunobiology* 2005;210, 121–126.

Sedgwick J, Brostoff S, Mason D. Experimental allergic encephalomyelitis in the absence of a classical delayed-type hypersensitivity reaction. Severe paralytic disease correlates with the presence of interleukin 2 receptor-positive cells infiltrating the central nervous system. *J Exp Med* 1987;165:1058–1075.

Sethna MP, Lampson LA. Immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 1991;34(2-3):121-32.

Sharma S, Dominguez AL, Hoelzinger DB, Lustgarten J. CpG-ODN but not other TLR-ligands restore the antitumor responses in old mice: the implications for vaccinations in the aged. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:549–561.

Sharma S, Dominguez AL, Lustgarten J. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J Immunol* 2006;177:8348–8355.

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

Sheng W, Yang F, Zhou Y, Yang H, Low PY, Kemeny DM, Tan P, Moh A, Kaplan MH, Zhang Y, Fu XY. STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell Res* 2014;24(12):1387–402.

Shin T, Ahn M, Matsumoto Y.. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Anat Cell Biol* 2012;45, 141–148.

Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 2007;55(4):412-24.



---

Signer RA, Montecino-Rodriguez E, Witte ON, McLaughlin J, Dorshkind K. Age-related defects in B lymphopoiesis underlie the myeloid dominance of adult leukemia. *Blood* 2007;110, 1831–1839.

Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol Res* 2014;59:254–265.

Skoog T, Dichl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 2002;23:376 – 83.

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2428 –2433.

Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, Pienaar B, Janse van Rensburg E, Jacobs G, Khomba G, Stone L, Abel B, Scriba TJ, Hanekom WA. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods* 2010;362(1-2):43-50.

Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hünig T, Becher B, Goebels N. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss. *Am J Pathol* 2009;175, 1160–1166.

Sojka DK, Huang Y-H, Fowell, DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008;124:13-22.

Spittau B. Aging Microglia—Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2017;9.

Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17+ CD8+ T cells. Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol Lett* 2016;178:20–26.

Staykova MA, Cowden W, Willenborg DO. Macrophages and nitric oxide as the possible cellular and molecular basis for strain and gender differences in susceptibility to autoimmune central nervous system inflammation. *Immunol Cell Biol* 2002;80(2):188-97.

Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loebenstien B. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clin Exp Immunol* 1996;105:544–50.

Stojić-Vukanić Z, Bufan B, Arsenović-Ranin N, Kosec D, Pilipović I, Perišić Nanut M, Leposavić G. Aging affects AO rat splenic conventional dendritic cell subset composition, cytokine synthesis and T-helper polarizing capacity. *Biogerontology* 2013;14(4):443–59.

Stojić-Vukanić Z, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Vujnović I, Blagojević V, Kosec D, Dimitrijević M, Leposavić G. Aging diminishes the resistance of AO rats to EAE: putative role of enhanced generation of GM-CSF Expressing CD4<sup>+</sup> T cells in aged rats. *Immun Ageing* 2015;12:16.

Storch MK, Bauer J, Linington C, Olsson T, Weissert R, Lassmann H. Cortical demyelination can be modeled in specific rat models of autoimmune encephalomyelitis and is major histocompatibility complex (MHC) haplotype-related. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(12):1137-42.

Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol* 2004;136(1):49-55.

Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 2006;29:506–510.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006a;1:1810–1819.

Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006b;1(4):1952-60.

Sun D, Whitaker JN, Wilson DB. Regulatory T cells in experimental allergic encephalomyelitis. III. Comparison of disease resistance in Lewis and Fischer 344 rats. *Eur J Immunol* 1999; 29(4):1101–6.

Sun Z, Zhong W, Lu X, Shi B, Zhu Y, Chen L, et al. Association of Graves' disease and prevalence of circulating IFN-gamma-producing CD28(-) T cells. *J Clin Immunol* 2008;28:464–72.

Sunnemark D, Eltayeb S, Wallström E, Appelsved L, Malmberg A, Lassmann H, Ericsson-Dahlstrand A, Piehl F, Olsson T. Differential expression of the chemokine receptors CX3CR1 and CCR1 by microglia and macrophages in myelin-oligodendrocyte-glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol* 2003;13(4):617-29.

Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 2001;117, 1027–1035.

Syapin PJ. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *Br J Pharmacol* 2008;155:623–640.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10(12):1969-80.

Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 2016;53(2):1181-94.

Tatari-Calderone Z, Stojakovic M, Dewan R, Le Boudier G, Jankovic D, Vukmanovic S. Age-related accumulation of T cells with markers of relatively stronger autoreactivity leads to functional erosion of T cells. *BMC Immunol* 2012;13:8.

Taub DD, Longo DL, Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 2005;205, 72-93.

Teuscher C, Bunn JY, Fillmore PD, Butterfield RJ, Zachary JF, Blankenhorn EP. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2004;165:1593–1602.

Teuscher C, Doerge RW, Fillmore PD, Blankenhorn EP. eae36, a locus on mouse chromosome 4, controls susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in older mice and mice immunized in the winter. *Genetics* 2006;172(2):1147-53.

---

Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* 2007;179:6514–23.

Thomas AC, Mattila JT. "Of mice and men": arginine metabolism in macrophages. *Front Immunol* 2014;5:479.

Thomas DC, Mellanby RJ, Phillips JM, Cooke A. An early age-related increase in the frequency of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells in BDC2.5NOD mice. *Immunology* 2007;121(4):565-76.

Thompson K, Tsirka S. The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int J of M Sci* 2017;18(3):504.

Tichauer JE, Flores B, Soler B, Eugenín-von Bernhardt L, Ramírez G, von Bernhardt R. Age-dependent changes on TGFβ1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. *Brain Behav Immun* 2014;37:187-96.

Tigno-Aranjuez JT, Jaini R, Tuohy VK, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Encephalitogenicity of complete Freund's adjuvant relative to CpG is linked to induction of Th17 cells. *J Immunol* 2009;183(9):5654-61.

Tischner D, Weishaupt A, van den Brandt J, Müller N, Beyersdorf N, Ip CW, Toyka KV, Hünig T, Gold R, Kerkau T, Reichardt HM. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2635-47.

Tremlett H I Devonshire V. Is late-onset multiple sclerosis associated with a worse outcome? *Neurology* 2006;67(6):954–959.

Tucker CF, Nebane-Ambe DL, Chhabra A, Parnell SA, Zhao Y, Alard P, Kosiewicz MM. Decreased frequencies of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells and the potent CD103<sup>+</sup> subset in peripheral lymph nodes correlate with autoimmune disease predisposition in some strains of mice. *Autoimmunity* 2011;44(6):453-64.

Tullman MJ. Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *Am. J. Manag. Care* 2013;19:S15–S20.

Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999;79(1):1–71.

Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. Age-related autoimmunity. *BMC Med* 2013;11:94.

Vallejo AN. Age-dependent alterations of the T cell repertoire and functional diversity of T cells of the aged. *Immunol Res* 2006;36:221–228.10.1385/IR:36:1:221.

Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 2005;205: 158-169.

van Weering DH, Baas PD, Bos JL. A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products. *PCR Methods Appl* 1993;3(2):100-6.

Vanheusden M, Broux B, Welten SPM, Peeters LM, Panagioti E, Van Wijmeersch B, Somers V, Stinissen P, Arens R, Hellings N. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci Rep* 2017;7(1):663.

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9857.

Vibert J, Thomas-Vaslin V. Modelling T cell proliferation. Dynamics heterogeneity depending on cell differentiation, age, and genetic background. *PLoS Comput Biol* 2017;13(3):e1005417.

Villas PA, Dronsfield MJ, Blankenhorn EP. Experimental allergic encephalomyelitis and corticosterone studies in resistant and susceptible rat strains. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61(1):29-40

Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002;169:2284-2291.

Vukmanovic S, Mostarica Stojkovic M, Lukic ML. Experimental autoimmune encephalomyelitis in “low” and “high” interleukin 2 producer rats. I. Cellular basis of induction. *Cell Immunol* 1989;121:237–246.

Vukmanovic S, Mostarica-Stojkovic M, Zalud I, Ramic Z, Lukic ML. Analysis of T cell subsets after induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in susceptible and resistant strains of rats. *J Neuroimmunol* 1990;27:63–69.

Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95:231–240.

Wang XS, Chen YY, Shang XF, Zhu ZG, Chen GQ, Han Z, Shao B, Yang HM, Xu HQ, Chen JF, Zheng RY. Idazoxan attenuates spinal cord injury by enhanced astrocytic activation and reduced microglial activation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2009;1253:198-209.

Wang Z, Meng S, Cao L, Chen Y, Zuo Z, Peng S. Critical role of NLRP3-caspase-1 pathway in age-dependent isoflurane-induced microglial inflammatory response and cognitive impairment. *J Neuroinflammation* 2018;15(1).

Watad A, Bragazzi N, L, Adawi M, Amital H, Toubi E, Porat B, Shoenfeld Y. Autoimmunity in the Elderly: Insights from Basic Science and Clinics - A Mini-Review. *Gerontology* 2017;63:515-523.

Wei R, Lin CM. Strain-dependent inflammatory responsiveness of rat microglial cells. *J Neuroimmunol* 2009;211:23–38.

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009;22(11):1041-50.

Weng N, Akbar AN, Goronzy J. CD28– T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* 2009;30(7):306–312.

White AD, Swingler RJ, Compston DAS. Features of multiple sclerosis in older patients in South Wales. *Gerontology* 1990;36(3):159-64.

Whyte AL, Miller SC. Strain differences in natural killer cell-mediated immunity among mice: a possible mechanism for the low natural killer cell activity of A/J mice. *Immunobiology* 1998;199(1):23-38.

Wolf Y, Yona S, Kim KW, Jung S. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci* 2013 Mar 18;7:26.

---

Wolfe H, Minogue AM, Rooney S, Lynch MA. Infiltrating macrophages contribute to age-related neuroinflammation in C57/BL6 mice. *Mech of Ageing Dev* 2018;173:84–91.

Wraith DC, Pope R, Butzkueven H, Holder H, Vanderplank P, Lowrey P, Day MJ, Gundlach AL, Kilpatrick TJ, Scolding N, Wynick D. A role for galanin in human and experimental inflammatory demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:15466–15471.

Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, Meydani SN. Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):C661-8.

Wu L, Diny NL, Ong S, Barin JG, Hou X, Rose NR, Talor MV, Čiháková D. Pathogenic IL-23 signaling is required to initiate GM-CSF-driven autoimmune myocarditis in mice. *Eur J Immunol* 2016;46(3):582-92.

Wynne AM, Henry CJ, Huang Y, Cleland A, Godbout JP. Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. *Brain Behav Immun* 2010;24(7):1190-201.

Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, Tai X. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016;2016:8426874.

Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005;163:24–30.

Yancik R. Population aging and cancer: a cross-national concern. *Cancer J* 2005; 11(6):437-441.

Yang Y, Lindsberg J, Hukkanen V, Seljelid R, Gahmberg CG, Meri S. Differential expression of cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10) and adhesion molecules (VCAM-1, LFA-1, CD44) between spleen and lymph nodes associates with remission in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 2002;56:286–293.

---

Ye SM, Johnson RW. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(4):183-92.

Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol* 2009;183:7161–7168.

Youm YH, Grant RW, McCabe LR, Albarado DC, Nguyen KY, Ravussin A, Pistell P, Newman S, Carter R, Laque A, Münzberg H, Rosen CJ, Ingram DK, Salbaum JM, Dixit VD. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab* 2013;18:519–532.

Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol* 2015;12(5):566-71.

Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1997;186:1677–87.

Zhang GX, Li J, Ventura E, Rostami A. Parenchymal microglia of naïve adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp Mol Pathol* 2002;73, 35-45.

Zhang Q, Yin Z, Li Y. Prevalence of asymptomatic *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections among school children in China as determined by pooled real-time PCR: a cross-sectional study. *Scand J Infect Dis* 2014;46:280–7.

Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu J, Meyermann R, Schluesener HJ. Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 2011;237:73-79.

Zhang Z, Zhong W, Hinrichs D, et al. Activation of OX40 augments Th17 cytokine expression and antigen-specific uveitis. *Am J Pathol* 2010;177(6):2912-20.

Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646–655.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature* 2008;453(7192):236–40.



Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 2012;484(7395):514-8.

Zujovic V, Benavides J, Vigé X, Carter C, Taupin V. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 2000;29(4):305-15.

Zumerle S, Molon B, Viola A. Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation. *Front Immunol* 2017;8:1467.

## Biografija

Jasmina Đuretić je rođena 15.03.1978. u Kraljevu. Osnovnu školu i Gimnaziju “Bora Stanković” (prirodno-matematički smer) završila je u Nišu. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9.81. Diplomski rad odbranila je na temu “Imunopatogeneza dijabetesa tip 1“. Lekarski pripravnički staž obavila je u Kliničkom centru Srbije i položila stručni ispit za doktora medicine.

Doktorske akademske studije upisala je školske 2008/09 na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Farmakologija-Imunofarmakologija. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Institut za virusologiju, serume i vakcine „Torlak“ u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Gordane Leposavić.

Od 2008. godine zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i učestvuje u izvođenju seminara na Integriranim akademskim studijama na predmetima Patofiziologija 1 i Patofiziologija 2.

Član je Društva imunologa Srbije.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јасмина Ђуретић

Број индекса 16/08

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај старења на имунски одговор и неуроинфламацију: испитивања на

моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

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

**Потпис аутора**

У Београду, 22.05.2019.



Јасмина Ђуретић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јасмина Ђуретић

Број индекса 16/08

Студијски програм Фармакологија - Имунофармакологија

Утицај старења на имунски одговор и неуроинфламацију:  
испитивања на моделу експерименталног аутоимунског  
Наслов рада енцефаломијелитиса

Ментор Др сц. Гордана Лепосавић, редовни професор

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 22.05.2019.



## Изјава о коришћењу

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

Утицај старења на имунски одговор и неуроинфламацију: испитивања на моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 22.05.2019.

