

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Nastavno-naučnom veću**

**Komisiji za poslediplomsku nastavu-doktorske studije**

**Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dr med. Mirjane Nacka-Aleksić**

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 18.02.2016. godine, donelo je Odluku (broj 290/2) kojom se imenuje Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Polne razlike u patogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova**“, kandidata dr med. Mirjane Nacka-Aleksić, u sastavu:

1. Prof. dr Gordana Leposavić (mentor), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet;
2. Dr sc. Ivan Pilipović, naučni saradnik, Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“;
3. Prof. dr Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet.

Dr med. Mirjana Nacka-Aleksić je zaposlena kao asistent na Katedri za Fiziologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kandidat je student doktorskih akademskih studija - modul farmakologija, podmodul imunofarmakologija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

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

## IZVEŠTAJ

### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr med. Mirjane Nacka-Aleksić pod nazivom „**Polne razlike u patogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova**“, napisana je na 212 strana i sadrži 74 slike, 3 tabele i 411 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (24 strane), Ciljevi (1 strana), Materijal i metode (30 strana), Rezultati (89 strana), Diskusija (30 strana), Zaključci (2 strane) i Literatura.

U poglavlju **UVOD**, na pregledan način su izneti podaci iz literature koji su od značaja za temu koja je predmet proučavanja ove doktorske disertacije i istaknute nepoznanice, koje nedvosmisleno ukazuju na opravdanost istraživanja koja su prikazana i iz kojih jasno proizilaze ciljevi istraživanja.

**CILJ ISTRAŽIVANJA** ove doktorske disertacije je bio da se ispita postojanje polnog dimorfizma u kliničkim parametrima eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) kod mladih pacova Dark Agouti (DA) soja, kao i promene u tom dimorfizmu kod starih pacova i da se identifikuju ćelijski i molekularni mehanizmi odgovorni za ove dimorfizme.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** je dat detaljan opis protokola za indukciju EAE-a koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, kao i parametri za kliničku evaluaciju bolesti. Osim toga, detaljno je opisan postupak izdvajanja i pripreme tkiva kičmene moždine za histopatološku analizu, postupak izolacije mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine i limfnih čvorova i njihove kultivacije, kao i metode koje su korišćene za ispitivanje fenotipskih i funkcijskih karakteristika izolovanih ćelija.

U eksperimentalnom radu su korišćene ženke i mužjaci pacova DA soja, uzrasta 3 meseca (grupa: mladi adultni) i 22-26 meseci (grupa: stari). Pored opisanih eksperimentalnih grupa, za analizu polnih razlika u aktivaciji CD4+ limfocita, korišćene su i intaktne (neimunizovane) životinje oba pola i uzrasta. Pacovi oba pola i uzrasta su imunizovani intradermalnim ubrizgavanjem emulzije homogenata singene kičmene moždine u kompletnom Freundovom adjuvansu (KFA) i supkutanim davanjem suspenzije *Bordetellae pertussis*. Težina EAE-a je procenjivana kliničkim pregledom životinja, svakog dana, počevši od 7 dana posle imunizacije (d.p.i.), do dana žrtvovanja životinja, ili do njihovog oporavka. Težina EAE-a je ocenjivana na

osnovu ispoljavanja neurološkog deficita, prema skali: 0, odsustvo bolesti; 0,5, atonija distalno delu repa; 1, potpuna atonija repa; 2, pareza (slabost) zadnjih ekstremiteta; 3, paraliza (oduzetost) zadnjih ekstremiteta; 4 paraliza zadnjih i prednjih ekstremiteta (kvadriplegija) praćena inkontinencijom, moribundno stanje. Histološka procena težine bolesti je vršena pregledom ukalupljenih preseka tkiva kičmene moždine koji su obojeni hematoksilinom i eozinom na prisustvo inflamatornih lezija, odnosno na prisustvo demijelinizacije na presecima obojenim Luxol plavom bojom. Ispitivana je i površina preseka kičmene moždine koju zauzimaju ćelije koje ispoljavaju ED1 (CD68) molekul, marker makrofaga i aktivisanih ćelija mikroglije, korišćenjem imunocitohemijske metode.

Istraživanje je obuhvatilo dve faze EAE-a:

**(1) 7. d.p.i. (induktivna faza bolesti)**, kada su izdvojene mononuklearne ćelije iz drenirajućeg (zatkolenog) limfnog čvora i kičmene moždine, u cilju ispitivanja njihovih fenotipskih i funkcijskih karakteristika, kao i mali deo tkiva kičmene moždine koji je uziman za analizu ekspresije gena za hemokin CXCL12.

**(2) 13. d.p.i. (mladi), odnosno 14. d.p.i. (stari) (vrhunac bolesti)**, kada su izolovane mononuklearne ćelije iz kičmene moždine pacova za određivanje fenotipskih i funkcijskih osobnosti ovih ćelija, kao i cele kičmene moždine za potrebe histopatološke analize EAE-a.

**Procentualno učešće i broj fenotipski i funkcijski različitih subpopulacija T-limfocita i ćelija urođene imunosti, sposobnost njihove aktivacije i proliferacije, apoptoza, njihov citokinski profil**, ispitivan je analizom ispoljavanja karakterističnih molekularnih markera na površini i/ili u unutrašnjosti ovih ćelija, korišćenjem odgovarajućih monoklonskih antitela koja su obeležena fluorohromima ili korišćenjem imunofluorescentnih reagenasa. Analiza ispoljavanja specifičnih markera vršena je na analognim FACScan i FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) i digitalnom FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) protočnim citometrima. Podaci su analizirani korišćenjem odgovarajućeg softvera za obradu podataka dobijenih protočnom citofluorometrijom (FlowJo, TreeStar Inc., OR, USA).

Ekspresija **proinflamatornih** (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF) i **anti-inflamatornih/imunomodulatornih** (IL-10 i TGF- $\beta$ ) **citokina i enzima** (iNOS i Arg-1) koji su od patogenetskog značaja za EAE, kao i **citokina koji su značajni za diferencijaciju CD4+ T-**

(engl. T helper, Th) **ćelija** (IL-23/p19, IL-12/p35, IL-27/p28), ispitivana je u mononuklearnim ćelijama koje su izolovane iz drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine, kao i u mijeloidnim ćelijama (CD11b+ ćelije) kičmene moždine, koje su magnetnom separacijom razdvojene od limfoidnih ćelija. Magnetna separacija je vršena uz pomoć magnetnih mikročestica koje su obeležene odgovarajućim monoklonskim antitelima i upotrebom Miltenyi MACS magnetnog separatora (Miltenyi Biotec, Germany). Ekspresija citokina i enzima je određivana na nivou iRNK, u sveže izolovanim ćelijama ili posle njihove kultivacije, metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR), upotrebom Applied Biosystems 7500 real-time PCR aparata (Foster City, CA, USA). Koncentracija citokina u supernatantima kultivisanih ćelija merena je korišćenjem metode enzimske imunoadsorpcije (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

Supresorski kapacitet regulatornih ćelija drenirajućeg limfnog čvora ispitivan je u klasičnom *in vitro* testu supresije proliferacije, korišćenjem magnetno izdvojenih populacija CD4+CD25+ ćelija, koje su služile kao regulatorne ćelije (Treg), i CD4+CD25- ćelija koje su služile kao efektorske ćelije (Tef), iz suspenzija mononuklearnih ćelija koje su bile izolovane iz površinskih limfnih čvorova.

**Statistička značajnost razlika** između polova u zastupljenosti subpopulacija i ekspresije membranskih i unutarćelijskih markera na/u ćelijama, kao i u ekspresiji iRNK za hemijske medijatore, određivana je Studentovim *t*-testom. Statistička značajnost razlika u kliničkim i histološkim parametrima bolesti, određivana je neparametarskim Mann-Whitney *U* testom. Za ispitivanje uticaja pola i stimulatora na sekreciju citokina u supernatantima ćelijskih kultura, kao i na supresorski kapacitet regulatornih ćelija u odnosu na broj efektorskih CD4+ T-ćelija, korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA), uz primenu Bonfferoni testa za *post hoc* poređenje. Za statističku obradu podataka korišćen je statistički program GraphPad Prism v 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD), a statistički značajnom je smatrana vrednost  $p \leq 0.05$ .

Sve korišćene metode su odgovarajuće i u skladu su sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti.

**REZULTATI** su prikazani na 89 stranica teksta, kroz 74 slike i 2 tabele.

U poglavlju **DISKUSIJA**, na sveobuhvatan i naučno prihvatljiv način su ponuđena objašnjenja rezultata koji su dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije, u svetlu relevantnih podataka iz literature.

Na kraju disertacije, navedeni su najznačajniji **ZAKLJUČCI**, koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize. Ovi zaključci jasno ukazuju da su realizovani svi glavni ciljevi istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA**, navedeno je 411 bibliografskih jedinica koje su citirane APA stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati dobijeni u okviru istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije su jasno i logičnim redosledom prikazani i dobro dokumentovani. Najvažniji nalazi su u daljem tekstu koncizno izloženi.

Prema prikazanim rezultatima, inokulacija singene kičmene moždine mladim pacovima DA soja, rezultovala je incidencom oboljevanja od 100% kod ženki pacova, a 85% kod životinja muškog pola. Međutim, oboleli mužjaci su imali veći maksimalni znak EAE-a i veći indeks težine bolesti u odnosu na ženke mladih pacova. Histološka slika bolesti je korelirala sa kliničkim nalazom, odnosno bila je teža kod mladih mužjaka, nego kod ženki pacova. Za razliku od toga, inokulacija singene kičmene moždine starim pacovima DA soja, rezultovala je značajnim smanjenjem incidence oboljevanja životinja oba pola, ali je ona i dalje bila manja (16,7%) kod mužjaka nego kod ženki (33%) starih pacova. Osim toga, starenjem je došlo do inverzije smeru polnog dimorfizma u težini maksimalnog znaka EAE-a, u smislu da su stari mužjaci pacova ispoljili veoma blag motorni deficit i imali manji indeks težine bolesti u odnosu na ženke istog uzrasta.

Na vrhuncu bolesti, nezavisno od uzrasta životinja, klinički teža bolest je korelirala sa izolacijom većeg ukupnog broja mononuklearnih, ali i reaktivisanih, CD134+ CD4+ T-ćelija iz kičmene moždine pacova. Takođe, u ćelijskom infiltratu kičmene životinja koje su imale veći maksimalni znak EAE-a, bez obzira na njihov uzrast, odnos broja reaktivisanih, CD134+ CD4+ limfocita, u odnosu na broj regulatornih, CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) ćelija, je bio veći.

Na vrhuncu bolesti, nezavisno od uzrasta životinja, klinički teži EAE-a je korelirao i sa većom zastupljenošću IL-17<sup>+</sup> ćelija u okviru T-limfocita iz kičmene moždine, kao i sa većom zastupljenošću IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija među njima i većom genskom ekspresijom za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. S druge strane, zastupljenost IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija u okviru T-limfocita iz kičmene moždine je bila manja i kod mladih i kod starih mužjaka pacova u poređenju sa ženka odgovarajućeg uzrasta. Bez obzira na uzrast pacova, više IL-17<sup>+</sup> nego IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-limfocita je bilo izolovano iz kičmene moždine životinja koje su bile teže obolele. Analiza ispoljavanja površinskih markera je pokazala da je najveći procenat T-limfocita koji su eksprimirali ove citokine, imao fenotip Th ćelija (u daljem tekstu: IL-17<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> - Th17 ćelije; IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> - Th1 ćelije).

Prethodno navedeni rezultati o zastupljenosti pojedinih subpopulacija T-limfocita koje sintetišu citokine, za koje je pokazano da imaju glavnu patogenetsku ulogu u EAE-u, su bili u saglasnosti sa nalazima koji su dobijeni analizom ekspresije gena za citokine koji su važni za diferencijaciju Th ćelija u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Naime, ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 je bila veća kod pacova koji su imali težu kliničku sliku u obe uzrasne grupe životinja. S druge strane, ekspresija iRNK za IL-12/p35 je bila konzistentno manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka pacova oba uzrasta. Starenjem je došlo do inverzije smeru polnog dimorfizma u ekspresiji gena za imunoregulatorni citokin TGF- $\beta$ , u smislu da je ona kod mladih mužjaka bila manja, a kod starih veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, u odnosu na iste ćelije ženki pacova odgovarajućeg uzrasta. Slično, ekspresija gena za IL-27/p28, za koji je pokazano da recipročno reguliše razvoj Th17 i Th1 limfocita, je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mladih mužjaka, a veća u istim ćelijama starih mužjaka, u odnosu na odgovarajuće ćelije ženki pacova.

Ispitivanje procentualnog učešća različitih subpopulacija mijeloidnih (CD11b<sup>+</sup>) ćelija u mononuklearnom ćelijaskom infiltratu kičmene moždine je pokazalo da je kod mladih mužjaka, koji su imali veći maksimalni znak EAE-a u odnosu na ženke, procenat CD45<sup>++</sup> ćelija bio drastično veći nego kod ženki mladih pacova. Zastupljenost CD45<sup>-/+</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> populacije ćelija je bila manja kod mladih mužjaka, u poređenju sa ženka pacova. Za razliku od toga, procenat CD45<sup>++</sup> ćelija, u okviru CD11b<sup>+</sup> populacije ćelija kičmene moždine starih pacova, je bio veoma mali i nije se razlikovao između polova. Zastupljenost CD45<sup>+</sup> ćelija je bila

manja, a zastupljenost CD45<sup>-</sup> ćelija veća, u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija koje su bile izolovane iz kičmene moždine lakše obolelih starih mužjaka, u poređenju sa ženka pacova tog uzrasta. Nezavisno od uzrasta životinja, i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>++</sup> i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ćelije su bile jače aktivisane, sudeći prema gustini površinske ekspresije molekula CD11b i CD45, u suspenzijama ćelija koje su bile izolovane iz kičmene moždine pacova sa težom kliničkom slikom EAE-a. Slično, zastupljenost ćelija sa CD4<sup>+</sup> fenotipom, u okviru subpopulacije aktivisanih ćelija mikroglije, je bila manja kod pacova koji su imali težu bolest, bez obzira na njihov uzrast. U saglasnosti sa fenotipskim karakteristikama CD11b<sup>+</sup> ćelija, ekspresija iRNK za iNOS i TNF- $\alpha$  je bila veća, a za anti-inflamatorni enzim Arg-1 manja, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine pacova sa težom kliničkom slikom, nezavisno od njihovog uzrasta.

Analiza fenotipa mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora, koje su izolovane 7. d.p.i, pokazala je da je procenat aktivisanih, CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru subpopulacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita bio manji kod mladih mužjaka, a veći kod starih mužjaka, u odnosu na ženke pacova odgovarajućeg uzrasta. Poređenjem procentualne zastupljenosti CD134<sup>+</sup> ćelija u okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita koji su izolovani iz poplitealnog limfnog čvora neimunizovanih i imunizovanih životinja oba uzrasta, dobijeno je da je procentualni porast u zastupljenosti aktivisanih CD4<sup>+</sup> T-ćelija poplitealnog limfnog čvora, posle inokulacije antigena singene kičmene moždine, nezavisno od uzrasta životinja, bio manji kod mužjaka pacova. U prilog manjem odgovoru CD4<sup>+</sup> ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka pacova oba uzrasta, bila je i manja *in vitro* proliferacija ovih ćelija u prisustvu MBP-a, u poređenju sa istim ćelijama ženki odgovarajućeg uzrasta. Ispitivanje zastupljenosti Treg ćelija u mononuklearnim ćelijskim suspenzijama drenirajućeg limfnog čvora je pokazalo da se procenat ovih ćelija nije razlikovao kod ženki i mužjaka mladih pacova, dok je kod starih pacova, procenat Treg ćelija bio veći kod mužjaka u odnosu na odgovarajuće ženke pacova. Sposobnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija, koje su bile magnetno izdvojene iz suspenzije mononuklearnih ćelija limfnih čvorova pacova i služile kao Treg, da suprimiraju proliferaciju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija limfnih čvorova, koje su služile kao efektorske ćelije (Tef), ispitivana je klasičnim *in vitro* testom supresije proliferacije. Ovaj test je pokazao da su Treg ćelije mladih mužjaka pacova bile manje efikasne u supresiji proliferativnog odgovora njihovih Tef ćelija, u odnosu na Treg ćelije mladih ženki pacova u supresiji proliferacije Tef ćelija ovih životinja. Međutim, ova razlika je uočena samo kada je odnos Treg:Tef bio 1:1. Za

razliku od ovog nalaza, Treg ćelije starih mužjaka pacova su bile superiornije u suprimiranju proliferativnog odgovora Tef ćelija starih mužjaka, nego Treg ćelije starih ženki pacova u suprimiranju proliferacije njihovih Tef ćelija, i u 1:1 i u 1:2 Treg:Tef odnosu.

Procentualna zastupljenost Th17 i Th1 ćelija u okviru T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora mladih mužjaka je bila manja u poređenju sa zastupljenošću ovih ćelija kod ženki, dok se zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10 nije razlikovala između oba pola mladih pacova. S druge strane, zastupljenost Th17, Th1 i IL-10+ ćelija, u okviru T-limfocita drenirajućeg limfnog čvora, nije se razlikovala između ženki i mužjaka starih pacova. Nezavisno od uzrasta životinja, koncentracija IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10 je bila manja u kultivisanim mononuklearnim ćelijama drenirajućeg limfnog čvora mužjaka, u prisustvu MBP-a, nego kod ženki pacova.

Analizom ekspresije gena za CXCL12 u tkivu kičmene moždine, 7. d.p.i, dobijeno je da je ona bila manja u tkivu mladih mužjaka pacova u odnosu na ženke istog uzrasta, dok je kod starih pacova ekspresija iRNK za ovaj hemokin bila slična kod ženki i mužjaka. Broj reaktivisanih Th ćelija koji je izolovan iz kičmene moždine u ovoj fazi bolesti, nezavisno od uzrasta životinja je bio manji kod mužjaka nego kod ženki pacova. Međutim, gustina ekspresije CD134 molekula na površini reaktivisanih CD4+ T-ćelija, i kod mladih i kod starih pacova, je konzistentno bila veća kod onih životinja koje su kasnije imale veći maksimalni znak EAE-a, sugerišući efikasniju aktivaciju infiltrišućih CD4+ T-ćelija u kičmenoj moždini tih životinja.

U okviru T-limfocita koji su u induktivnoj fazi bolesti izolovani iz kičmene moždine mladih pacova, procenat Th17 ćelija je bio veći kod mužjaka pacova, dok se kod starih životinja procenat ovih ćelija nije razlikovao između polova. S druge strane, procentualna zastupljenost Th1 ćelija je bila slična u populaciji T-limfocita iz kičmene moždine mladih pacova oba pola, dok je zastupljenost ovih ćelija bila manja kod starih mužjaka nego kod ženki pacova. Analiza ekspresije gena za citokine koji determinišu smer diferencijacije Th0 ćelija, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, pokazala je da je količina iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23/p19, ali i TGF- $\beta$  i IL-12/p35, u ranoj fazi EAE-a bila veća kod mladih mužjaka, u poređenju sa ženkama mladih pacova. Međutim, kod starih životinja je uočena inverzija smeru polnog dimorfizma u ekspresiji gena za ove citokine, te je ona bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka pacova, nego kod ženki istog uzrasta.



Ispitivanje fenotipskih i funkcijskih karakteristika mijeloidnih ćelija kičmene moždine pacova oba uzrasta, u induktivnoj fazi bolesti, je pokazalo da je procentualna zastupljenost CD45<sup>++</sup> subpopulacije ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup> ćelija veća kod životinja koje su kasnije imale veći maksimalni znak EAE-a. U skladu sa ovim nalazima, i količina iRNK za TNF- $\alpha$  je bila veća u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine tih pacova.

### **C. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Sistematski pregled literature nedvosmisleno ukazuje da su rezultati dobijeni istraživanjima u ovoj tezi kompetentno diskutovani u svetlu najnovijih podataka koji se mogu naći u literaturi. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima su, po prvi put, pokazali da polni dimorfizam u težini kliničke slike EAE postoji i kod mladih i kod starih pacova DA soja kojima je inokulisan homogenat singene kičmene moždine u KFA, ali da se smer ovog dimorfizma razlikuje zavisno od uzrasta. Ovaj nalaz je diskutovan u kontekstu podataka iz literature koji pokazuju da, u zavisnosti od vrste, soja i uzrasta oglednih životinja, ali i načina imunizacije, primenjenog antigena i adjuvansa, kao i drugih varijacija u eksperimentalnom protokolu, smer polnih razlika u osetljivosti na indukciju i maksimalnom znaku EAE-a kod adultnih životinja može biti različit (Willenborg i sar., 1986; Voskuhl i sar., 1996; Papenfuss i sar., 2004; Massela i sar., 2012). Ukazano je i na podatke koji, u skladu sa onim što je nađeno i u istraživanjima vezanim za ovu doktorsku disertaciju, pokazuju da starenje generalno smanjuje osetljivost oglednih životinja na indukciju EAE-a (Endoh i sar., 1990; Ditamo i sar., 2005; Chitnis i Weiner, 2011; Tatari-Calderone i sar., 2012). Istaknuto je da postoje i suprotni podaci (Spach i sar., 2009; Seo i sar., 2013) i ponuđeno je prihvatljivo objašnjenje koje uzima u obzir razlike u vrsti, soju životinja i načinu imunizacije. Jasno je podvučeno da nema podataka o polnim razlikama u kliničkim manifestacijama EAE-a kod starih oglednih životinja, što odgovara činjeničnom stanju i potencira značaj prikazanih rezultata.

Ukazano je da je, nezavisno od uzrasta pacova, primarni imunski odgovor autoreaktivnih Th ćelija na inokulaciju homogenata singene kičmene moždine bio slabiji kod mužjaka nego kod ženki, te da je ovo u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju na robusniji imunski odgovor kod žena i ženki oglednih životinja (Ansar Ahmed i sar., 1995; McCombe i Greer, 2009). Osim

toga, ovaj nalaz je opravdano povezan sa podacima iz literature koji pokazuju da: (i) adultni muškarci imaju 1,7 puta manje autoreaktivnih limfocita u odnosu na žene (Su i sar., 2013); (ii) je aktivacija CD4+ T-ćelija na inokulaciju antigena mijelina manja kod adultnih mužjaka miševa u poređenju sa ženkama (Dunn i sar., 2007) i (iii) CD4+ T-ćelije adultnih mužjaka glodara, ali i muškaraca, manje proliferišu *in vitro* u odnosu na ćelije ženki glodara, odnosno žena (Santoli i sar., 1976; Bilbo i Nelson, 2003; Zhang i sar., 2012).

U diskusiji je ukazano i da su rezultati dobijeni u okviru istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju u saglasnosti sa podacima iz literature koji pokazuju da starenje kod životinja i ljudi oba pola kompromituje sposobnost aktivacije i proliferacije T-limfocita (Fülöp i sar., 1999; Miller i sar., 1998; Tamir i sar., 2000; Pawelec i sar., 2001), i da je taj efekat starenja posebno izražen kod muškaraca (Hirokawa i sar., 2013). Istaknuto je da starenjem dolazi do povećanja zastupljenosti regulatornih ćelija na periferiji, i pojačanja njihovog supresornog delovanja, što je u takođe u skladu sa podacima dobijenim u drugim studijama (Gregg i sar., 2005; Zhao i sar., 2007). Osim toga, u diskusiji je potencirano da u literaturi nema podataka o polnim razlikama u zastupljenosti i supresivnom kapacitetu regulatornih ćelija kod starih jedinki. Poređenjem rezultata koji su prikazani za mlade i stare životinje, indirektno se može zaključiti da je starenjem došlo do povećanja zastupljenosti Treg ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita drenirajućeg limfnog čvora, ali i do značajnog povećanja efikasnosti njihove supresorske funkcije kod mužjaka u odnosu na ženke pacova, što je takođe navedeno u diskusiji.

Rezultati koji pokazuju i da ciljni organ u ima važnu ulogu u determinisanju težine kliničkih manifestacija EAE. Ovi nalazi su diskutovani su u svetlu podataka iz drugih studija koji sugerišu da ciljni organ ima determinativnu ulogu u određivanju kliničkog ishoda organ-specifičnih autoimunskih bolesti, uključujući MS-u i EAE (Hill i sar., 2007; Kawakami i sar., 2013). Istaknuto je da je, u skladu sa nalazima dobijenim i u drugim studijama (Oukka, 2007), klinički teža bolest, kod životinja oba uzrasta, korelirala sa brojčanom dominacijom reaktivisanih CD4+ T-ćelija u odnosu na Treg ćelije u ćelijskom infiltratu koji je izolovan iz kičmene moždine pacova.

U diskusiji je potencirano i da je u modelu EAE-a, koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, nezavisno od uzrasta životinja, odnos broja Th17 ćelija u odnosu na broj Th1 ćelija bio više pomeren na stranu Th17 limfocita kod teže obolelih životinja. Istaknuto je da su ovi

rezultati u saglasnosti sa podacima koji ukazuju da je takva korelacija prisutna i u drugim modelima EAE-a (Langrish i sar., 2005; Savarin i sar., 2012). Jasno je ukazano da se starenjem smanjuje infiltracija kičmene moždine Th17 limfocitima i sledstveno tome težina neuroinflamacije, te da je ovo smanjenje veće kod mužjaka. Osim toga, nezavisno od uzrasta životinja, veća zastupljenost izrazito patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija nađena je u okviru Th17 limfocita izolovanih iz kičmene moždine životinja sa većim maksimalnim znakom EAE-a. U diskusiji je navedeno da je ovakav nalaz u skladu sa onim što je pokazano i u drugim modelima EAE-a (Duhon i sar., 2013). Veća zastupljenost patogenih IL-17+IFN- $\gamma$ + ćelija u okviru subpopulacije Th17 limfocita korelirala je sa većom ekspresijom iRNK za GM-CSF u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine tih životinja. U diskusiji je jasno navedeno da je i ovaj nalaz u skladu sa podacima dobijenim u drugim istraživanjima (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011).

U diskusiji je napravljen i osvrt na nalaze koji pokazuju da su, na vrhuncu bolesti, u kičmenoj moždini životinja oba uzrasta, polne razlike u zastupljenosti Th17 i Th1 ćelija u populaciji T-limfocita bile u saglasnosti sa polnim razlikama u ekspresiji iRNK za citokine koji su relevantni za diferencijaciju Th0 ćelija u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Naime, veća ekspresija iRNK za IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 je odgovarala većem procentu Th17 ćelija u okviru populacije T-limfocita iz kičmene moždine, a koji je nađen kod životinja koje su imale veći maksimalni znak EAE-a (McGeachy and Cua, 2008). Ekspresija gena za IL-12/p35, nezavisno od uzrasta pacova, je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine mužjaka, nego u ovim ćelijama ženki (Prochazkova i sar., 2012). U skladu s tim nalazom, i zastupljenost Th1 ćelija u okviru T-limfocita koji su infiltrirali kičmenu moždinu i mladih i starih mužjaka pacova je bila manja nego kod ženki odgovarajućeg uzrasta. Istaknuto je da su ovi nalazi podržani rezultatima drugih studija koji sugerišu da ćelije koje su specifične za mijelin eksprimiraju manje IFN- $\gamma$  kod adultnih mužjaka glodara kod kojih je indukovana EAE, u odnosu na ženke (Voskuhl i sar., 1996; Zhang i sar., 2012), kao i da se starenjem ekspresija ovog citokina smanjuje kod mužjaka glodara (Barrat i sar., 1997).

Jedan segment istraživanja je bio posvećen ispitivanju značaja polnog dimorfizma u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mijeloidnih ćelija kičmene moždine za polno dimorfnu kliničku sliku EAE-a kod mladih i starih pacova. Nalazi dobijeni u okviru ovog

segmenta su takođe kritički komentarisani u poglavlju Diskusija. U okviru ovog segmenta istraživanja, pokazano je da je, na vrhuncu bolesti, procentualna zastupljenost CD45<sup>++</sup> (inflamatorni makrofagi/dendritske ćelije monocitnog porekla/jako aktivisane ćelije mikroglije) u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> mononuklearnih ćelija (Croxford i sar., 2015) bila veća kod mladih mužjaka pacova. Istaknuto je da je ovo bilo u skladu sa većom ekspresijom iRNK za proinflamatorne medijatore u mononuklearnim ćelijama njihove kičmene moždine (Parajuli i sar., 2012). Takođe je ukazano da je ovaj nalaz korelirao i sa većim procentom reaktivisanih CD4<sup>+</sup> ćelija u populaciji T-limfocita iz kičmene moždine mladih mužjaka (Croxford i sar., 2015). S druge strane, ova subpopulacija ćelija je bila veoma malo zastupljena kod starih pacova oba pola. Kod mužjaka ovog uzrasta, u okviru populacije CD11b<sup>+</sup> mononuklearnih ćelija, nađena je veća procentualna zastupljenost CD45<sup>-</sup> ćelija, koje odgovaraju neaktivisanim ćelijama mikroglije, a manja zastupljenost CD45<sup>+</sup> ćelija, koje fenotipski odgovaraju aktivisanim ćelijama mikroglije (Almolda i sar., 2009). Manja zastupljenost aktivisanih ćelija mikroglije u okviru subpopulacije CD11b<sup>+</sup> nelimfoidnih ćelija mužjaka starih pacova je, kako je u Diskusiji jasno rečeno, bila u saglasnosti i sa manjim brojem reaktivisanih CD4<sup>+</sup> T-ćelija u kičmenoj moždini ovih životinja (Almolda i sar., 2011). U skladu sa ovim nalazima, količina iRNK za proinflamatorne medijatore, koje eksprimiraju ćelije aktivisane mikroglije (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) i iNOS (Parajuli i sar., 2012), je bila manja u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine starih mužjaka u poređenju sa ovim ćelijama starih ženki pacova, što je takođe podvučeno u diskusiji. Pored toga, nedvosmisleno je ukazano, da je neurološki teža bolest, i kod mladih i kod starih pacova, bila u saglasnosti sa manjom zastupljenošću imunoregulatornih (CD4<sup>+</sup>) ćelija mikroglije (Almolda i sar., 2009) i manjom ekspresijom iRNK za TGF- $\beta$ , ključnog anti-inflamatornog/imunoregulatornog medijatora (Ahn i sar., 2012; Banchereau i sar., 2012) u mononuklearnim ćelijama tih životinja.

#### **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

Rezultati doktorske disertacije dr med. Mirjane Nacka-Aleksić su publikovani u 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (**M21**). Kandidat je deo rezultata ove doktorske disertacije izlagao u vidu saopštenja na međunarodnom naučnom skupu štampanog u izvodu (**M34**).

### **Publikovani radovi iz doktorske disertacije:**

**1. Nacka-Aleksić, M.,** Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., Arsenović-anin, N., Dimitrijević, M., Lepasavić, G., (2015). Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: Sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain Behav Immun.* 49, 101-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.017>

**2. Nacka-Aleksić, M.,** Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., Vujnović, I., Arsenović-Ranin, N., Dimitrijević, M., Lepasavić, G., (2015). Sexual dimorphism in the aged rat CD4<sup>+</sup> T lymphocyte-mediated immune response elicited by inoculation with spinal cord homogenate. *Mech Ageing Dev.* 152, 15-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2015.09.004>

### **Saopštenje na međunarodnom skupu štampano u izvodu (M34):**

**1. Nacka-Aleksić, M,** Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., Arsenović-Ranin, N., Dimitrijević, M., Lepasavić, G., (2015). Cellular and molecular correlates of sexual dimorphism in the clinical presentation of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. 3rd Belgrade EFIS Symposium On Immunoregulation. Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Arandjelovac Spa (Belgrade), 24-27 May, 2015.

## **E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija dr med. Mirjane Nacka-Aleksić predstavlja aktuelno i važno istraživanje usmereno ka rasvetljavanju ćelijskih i molekularnih mehanizama koji učestvuju u razvoju EAE-a, posebno mehanizama koji stoje u osnovi polnog dimorfizma u kliničkoj prezentaciji ove bolesti. Na značaj istraživanja ukazuje činjenica da je EAE najviše korišćen eksperimentalni model za proučavanje MS-e, koja je najčešća autoimunska bolest CNS-a. Iako je nedvosmisleno pokazano da postoji polni dimorfizam u urođenom i stečenom imunskom odgovoru, uključujući i imunski odgovor koji je posredovan Th ćelijama (Ansar Ahmed i sar., 1995; Ho i sar.1995; Bebo i sar., 1999; Hewagama i sar., 2013; McCombe i Greer, 2013), ćelijska i molekularna osnova ovog fenomena, a posebno oni njegovi aspekti koji su značajni za polno dimorfnu patogenezu autoimunskih bolesti, uključujući i EAE, još uvek nisu razjašnjeni.

Poseban značaj ovoj tezi daje izučavanje uticaja starenja na polni dimorfizam u razvoju EAE-a. Naime, uprkos podacima koji jasno ukazuju da proces starenja imunskog sistema pokazuje polni dimorfizam, koji koincidira s promenama u hormonskom statusu (Furman, 2015), podaci o polnom dimorfizmu u urođenom i stečenom imunskom odgovoru, pa shodno tome i u patogenezi imunskih/autoimunskih bolesti kod starih ljudi i eksperimentalnih životinja su krajnje oskudni. Na osnovu svega što je prethodno izneto, jasno sledi da istraživanja sprovedena u okviru ove teze, doprinoseći razumevanju fenomena polnog dimorfizma u imunskom/autoimunskom odgovoru, posebno inflamaciji koja je posredovana CD4+ T-ćelijama, imaju ne samo fundamentalni, već moguće i terapijski značaj. Naime, bolje poznavanje ćelijskih i molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi razvoja EAE-a bi moglo da posluži kao osnova za definisanje novih ciljnih molekula u terapiji MS-e, a razumevanje mehanizama koji obezbeđuju nastanak polnih i uzrasnih razlika u patogenezi ove bolesti, bi moglo da obezbedi solidnu naučnu osnovu za stratifikaciju bolesnika prema uzrastu i polu i, moguće, definisanje efikasnijih terapijskih pristupa za svaku podgrupu ponaosob.

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

**“Polne razlike u patogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova”.**

---

1. Prof. dr Gordana Leposavić (mentor), redovni profesor;  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet;

---

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

---

3. Prof. dr Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor;  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet.

Beograd,

### **Citirana literatura:**

- Ahn, M., Yang, W., Kim, H., Jin, J.K., Moon, C., Shin, T., 2012. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1453, 77-86.
- Almolda, B., Costa, M., Montoya, M., González, B., Castellano, B., 2009. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J Neuroimmunol.* 209, 65-80.
- Almolda, B., Gonzales, B., Castelano, B., 2011. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci.* 16(1), 1157-1171.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol.* 121, 531-551.
- Banchereau, J., Pascual, V., O'Garra, A., 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol.* 13(10), 925-931.
- Barrat, F., Lesourd, B., Boulouis, H., Thibault, D., Vincent-Naulleau, S., Gjata, B., Louise, A., Neway, T., Pilet, C., 1997. Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing. *Clin Exp Immunol.* 109(3), 562-568.
- Bebo, B.F.Jr., Adlard, K., Schuster, J.C., Unsicker, L., Vandenbark, A.A., Offner, H., 1999. Gender differences in protection from EAE induced by oral tolerance with a peptide analogue of MBP-Ac1-11. *J Neurosci Res.* 55, 432-440.
- Bilbo, S., Nelson, R., 2003. Sex differences in photoperiodic and stress-induced enhancement of immune function in Siberian hamsters. *Brain Behav Immun.* 17(6), 462-472.
- Chitnis, T., Weiner, H., 2011. Multiple sclerosis in the elderly. In: Knoefel, J.E. (Ed), *Clinical Neurology of Aging* (pp. 535-543). USA: Oxford University Press.
- Codarri, L., Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., & Magnenat, L., Suter, T., Becher, B., 2011. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* 12(6), 560-567.
- Croxford, A., Lanzinger, M., Hartmann, F., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B., Jung, S., Greter, M., Becher, B., 2015. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2<sup>+</sup> Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity.* 43(3), 502-514.
- Ditamo, Y., Degano, A.L., Maccio, D.R., Pistoressi-Palencia, M.C., Roth, G.A., 2005. Age related changes in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol.* 83(1), 75-82.
- Duhen, R., Glatigny, S., Arbelaez, C., Blair, T., Oukka, M., Bettelli, E., 2013. Cutting Edge: The Pathogenicity of IFN- $\gamma$ -Producing Th17 Cells Is Independent of T-bet. *J Immunol.* 190(9), 4478-4482.
- Dunn, S.E., Ousman, S.S., Sobel, R.A., Zuniga, L., Baranzini, S.E., Youssef, S., Crowell, A., Loh, J., Oksenberg, J., Steinman, L., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med.* 204(2), 321-330.
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., Rostami, A., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 12, 568-575.
- Endoh M, Rapoport SI, Tabira T., 1990. Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice. *J Neuroimmunol.* 29(1-3), 21-31.
- Fülöp, T., Gagné, D., Goulet, A., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., Dupuis, G., 1999. Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp Gerontol.* 34(2), 197-216.
- Furman, D., 2015. Sexual dimorphism in immunity: improving our understanding of vaccine immune responses in men. *Exp Rev Vaccines.* 14(3), 461-471.



- Gregg, R., Smith, C.M., Clark, F.J., Dunnion, D., Khan, N., Chakraverty, R., Nayak, L., Moss, P.A., 2005. The number of human peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol.* 140, 540–546.
- Hewagama, A., Patel, D., Yarlagadda, S., Strickland, F.M., Richardson, B.C., 2009. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun.* 10, 509–516.
- Hill, N., Hultcrantz, M., Sarvetnick, N., Flodström-Tullberg, M., 2007. The target tissue in autoimmunity – an influential niche. *E J Immunol.* 37(3), 589-597.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Hayashi, Y., Kitagawa, M., Makinodan, T., Fülöp, T., 2013. Slower immune system ageing in women versus men in the Japanese population. *Immun Ageing.* 10, 19.
- Kawakami, N., Lassmann, S., Li, Z., Odoardi, F., Ritter, T., Ziemssen, T., Klinkert, W.E., Ellwart, J.W., Bradl, M., Krivacic, K., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., Volk, H.D., Wekerle, H., Linington, C., Flügel, A., 2004. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 199, 185-197.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 201, 233–240.
- Massella, A., D'Intino, G., Fernández, M., Sivilia, S., Lorenzini, L., Giatti, S., Melcangi, R.C., Calzà, L., Giardino, L., 2012. Gender effect on neurodegeneration and myelin markers in an animal model for multiple sclerosis. *BMC Neurosci.* 13, 12.
- McCombe, P.A., Greer, J.M., Mackay, I.R., 2009. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 9(9), 1058-1079.
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 28, 445-453.
- Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., McEwen, B.S., 1998. Glucocorticoid Receptors Are Differentially Expressed in the Cells and Tissues of the Immune System. *Cell Immunol.* 186(1), 45-54.
- Oukka, M., 2007. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 66(Supplement 3), iii87-iii90.
- Papenfuss, T.L., Rogers, C.J., Gienapp, I., Yurrita, M., McClain, M., Damico, N., Valo, J., Song, F., Whitacre, C.C., 2004. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol.* 150, 59-69.
- Parajuli, B., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Doi, Y., Noda, M., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2012. GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J Neuroinflammation.* 9, 268.
- Pawelec, G., Hirokawa, K., Fülöp, T., 2001. Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev.* 122(14), 1613-1637.
- Prochazkova, J., Pokorna, K., Holan, V., 2012. IL-12 inhibits the TGF- $\beta$ -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- $\beta$ -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology.* 217, 74-82.
- Santoli, D., Trinchieri, G., Zmijewski, C.M., Koprowski, H., 1976. HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *J Immunol.* 117, 765-770.
- Savarin, C., Stohlman, S., Hinton, D., Ransohoff, R., Cua, D., Bergmann, C., 2012. IFN- $\gamma$  protects from lethal IL-17 mediated viral encephalomyelitis independent of neutrophils. *J Neuroinflammation.* 9(1), 104.
- Seo, J.-E., Hasan, M., Sarma, S., Kang, M.-J., Jung, B.-H., Cho, M.-L., N. S.W., Park, W.S., Kim, H.-Y., Kwon, O.-S., 2013. Gene analysis of brain in aged-experimental autoimmune encephalomyelitis mice reveals over-expression of stress response pathway-related genes (P4104). *J Immunol.* 190(Meeting Abstracts 1), 51.18.

Spach, K., Blake, M., Bunn, J., McElvany, B., Noubade, R., Blankenhorn, E., Teuscher, C., 2009. Cutting edge: The Y chromosome controls the age-dependent experimental allergic encephalomyelitis sexual dimorphism in SJL/J mice. *J Immunol.* 182(4), 1789-1793.

Su, L., Kidd, B., Han, A., Kotzin, J., Davis, M., 2013. Virus-specific CD4<sup>+</sup> memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity.* 38(2), 373-383.

Tamir, A., Eisenbraun, M., Garcia, G., Miller, R., 2000. Age-Dependent Alterations in the Assembly of Signal Transduction Complexes at the Site of T Cell/APC Interaction. *J Immunol.* 165(3), 1243-1251.

Tatari-Calderone, Z., Stojaković, M., Dewan, R., Le Bouder, G., Janković, D., Vukmanović, S., 2012. Age-related accumulation of T cells with markers of relatively stronger autoreactivity leads to functional erosion of T cells. *BMC Immunology.* 13, 8.

Voskuhl, R.R., Pitchekian-Halabi, H., MacKenzie-Graham, A., McFarland, H.F., Raine, C.S., 1996. Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 39, 724–733.

Willenborg, D., Sjollem, P., Danta, G., 1986. Immunoregulation of passively induced allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 136(5), 1676-1679.

Zhang, M.A., Rego, D., Moshkova, M., Kebir, H., Chruscinski, A., Nguyen, H., Akkermann, R., Stanczyk, F.Z., Prat, A., Steinman, L., Dunn, S.E., 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  and  $\gamma$  regulate IFN $\gamma$  and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 9505-9510.

Zhao, L., Sun, L., Wang, H., Ma, H., Liu, G., Zhao, Y., 2007. Changes of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in aged BALB/c mice. *J Leukocyte Biol.* 81, 1386–1394.