

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana M. Prijć

**POLNE SPECIFIČNOSTI U MODULATORNOM  
DELOVANJU NORADRENALINA NA CD4+ T-LIMFOCITE U  
MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG  
ENCEFALOMIJELITISA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana M. Prijic

**SEX SPECIFICITIES IN THE MODULATORY ACTION OF  
NORADRENALINE ON CD4+ T LYMPHOCYTES IN  
EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS  
MODEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

**Mentori:**

---

**Dr Ivan Pilipović**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**Dr Biljana Božić Nedeljković**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

**Dr Mirjana Dimitrijević**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**Dr Nebojša Jasnić**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

**Dr Tanja Lunić**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Datum odbrane:**

## ZAHVALNICA

Najveći deo eksperimentalnog rada čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji urađen je 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“. Projekat je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se rukovodiocu projekta, dr sc. Gordani Leposavić što je uvek bila spremna da svojim idejama i sugestijama uobliči moj rad, i što mi je pokazala da mašta pomera granice nauke.

Veliko hvala mom mentoru, dr Ivanu Pilipoviću, na svemu čemu me je naučio, kao i na pedantnosti i preciznosti od kojih nije odstupao uprkos svemu. Nadam se da smo uspeli.

Hvala mentorki, dr Biljani Božić Nedeljković, na želji da podigne kvalitet ovog rada i dobroj komunikaciji tokom celog procesa koji nije bio lak.

Veoma sam zahvalna dr Nebojši Jasniću na pomoći u eksperimentalnom radu i tokom pisanja disertacije, a najviše na pozitivnom stavu koji je bio lekovit.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mirjani Dimitrijević što je priskočila u pomoć, i kao i uvek imala vrlo praktične i korisne komentare.

Hvala dr Tanji Lunić na korekcijama koje su ovaj rad učinile boljim.

Dr sc. Zorici Stojić Vukanić i dr sc. Neveni Arsenović-Ranin dugujem zahvalnost za pomoć u eksperimentalnom radu, kao i pri tumačenju i oblikovanju dobijenih rezultata.

Zahvaljujem kolegamicama Jasmini, Bilji i Mirjani na pomoći tokom dugotrajnih eksperimenata i razgovorima koji su pomogli da se oni prebrode.

Hvala Donjem labu na čelu sa Canom što su mi pružili utočište. Kolegama Ivani, Raisi i Veljku ne mogu dovoljno da zahvalim što su uvek bili tu i davali mi snagu da istrajem i privedem ovo poglavlje kraju. Eto, Raisa, poslušala sam te. Ivana, ti si legenda! Veljko, izgleda smo spremni za apokalipsu.

Želim da se zahvalim i ostalim kolegama iz Centra, starim i novim, na pozitivnosti i podršci u trenucima kada mi je to bilo potrebno.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, koji su mi uvek bili glavni oslonac. Sada znam koliko je to i lepo i teško, i ovu disertaciju posvećujem vama. Nikola, hvala što si celog života tu da me nasmeješ i da mi čuvaš leđa, kako samo stariji brat ume.

Saletu, Danilu i Filipu hvala na ljubavi, strpljenju i podršci na svakom koraku. Daki, nikako posao nije bitniji, vi ste sadržaj mog života.

Mojim prijateljima želim da zahvalim što su tu, na pravom mestu u pravo vreme, da pomognu, oraspolože, ohrabre i da stvaramo zajedničke trenutke za pamćenje. Biće to i ovaj.

## SAŽETAK

Pretpostavljeno je da disfunkcija u, suštinski polno dimorfnoj, aktivnosti simpatičkog nervnog sistema (SNS) doprinosi patogenezi eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE). Ova hipoteza je testirana ispitivanjem uticaja farmakoloških manipulacija delovanjem noradrenalina (krajnji medijator SNS), na CD4<sup>+</sup> T-limfocite u drenirajućim limfnim čvorovima (dLČ) i na inflamaciju posredovanu CD4<sup>+</sup> T-limfocitima u kičmenoj moždini (KM) ženki i mužjaka pacova soja *Dark Agouti* (DA) kod kojih je indukovano EAE. Kako je blokada  $\beta$ -adrenalinskih receptora (AR), ali ne i  $\alpha$ -AR, pokazala polno dimorfne efekte, istraživanje je bilo usmereno na efekte blokade  $\beta$ -AR. *In vivo* blokada  $\beta$ -AR propranololom (PROP) u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE smanjila je proliferaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita i njihovu diferencijaciju u potencijalno patogene ćelije u dLČ nezavisno od pola. Ovakav efekat je rezultanta polno-specifičnog (izraženijeg kod mužjaka) (a) inhibitornog delovanja PROP na migraciju antigen-prezentujućih ćelija (APĆ) *in vivo*, i (b) stimulativnog efekta PROP na ekspresiju IL-1 $\beta$  i IL-23 u APĆ, te proliferaciju i diferencijaciju CD4<sup>+</sup> limfocita u potencijalno visoko patogene IL-17+GM-CSF<sup>+</sup> ćelije, uočenog *in vitro*. Tretman PROP u efektorskoj fazi EAE je stimulisao razvoj anti-inflamatornog fenotipa mikroglije, direktnom ili indirektnom (stimulacijom CX3CL1/CX3CR1 signalnog puta) transkripcionom aktivacijom Nrf2/HO-1 osovine, i inhibitornim delovanjem na komponente IL-6/Stat3 osovine (delom kroz ushodnu regulaciju ekspresije Socs3), i time smanjio infiltraciju KM mijeloidnim ćelijama i CD4<sup>+</sup> T-limfocitima, i njihovu reaktivaciju i diferencijaciju u IL-17+GM-CSF<sup>+</sup> ćelije. Ovi efekti PROP su bili izraženiji kod mužjaka nego ženki pacova, objašnjavajući, delom, izraženije smanjenje težine EAE kod pacova muškog pola.

**Ključne reči:** noradrenalin,  $\beta$ -AR, tirozin-hidroksilaza, EAE, DA pacovi, polni dimorfizam, Th17 limfociti, antigen-prezentujuće ćelije, mikroglija, monociti.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

## ABSTRACT

It has been hypothesized that dysfunction in, basically sexually dimorphic, activity of the sympathetic nervous system (SNS) contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). To test the hypothesis, the influence of pharmacological manipulations with action of noradrenaline (end point mediator of the SNS) on CD4<sup>+</sup> T-cells in draining lymph nodes (dLNs) and CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated inflammation in the spinal cord (SC) of female and male *Dark Agouti* (DA) rats immunized for EAE was investigated. Since blockade of  $\beta$ -adrenoceptors (ARs), but not  $\alpha$ -ARs, produced sexually dimorphic effects, study was focused on the effects of  $\beta$ -AR blockade. *In vivo* blockade of  $\beta$ -AR with propranolol (PROP) over the peri-inductive/inductive phase of EAE decreased dLN CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation and differentiation into potentially pathogenic cells regardless of sex. This reflected the net effect of sex-specific (greater in males) PROP-induced (a) inhibition of antigen presenting cell (APC) migration *in vivo*, and (b) stimulation of IL-1 $\beta$  and IL-23 expression in APCs, and CD4<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation into potentially highly pathogenic IL-17+GM-CSF<sup>+</sup> cells, observed *in vitro*. PROP treatment in the effector phase of EAE promoted anti-inflammatory phenotype of microglia by direct or indirect (via CX3CL1/CX3CR1 pathway stimulation) transcriptional activation of Nrf2/HO-1 axis and inhibitory action on IL-6/Stat3 axis components expression (partly via upregulation of Socs3), and thereby decreased SC infiltration with blood-borne myeloid cells and CD4<sup>+</sup> T-cells, and their reactivation and differentiation into IL-17+GM-CSF<sup>+</sup> cells. Effects of PROP were more prominent in male than female rats, partly explaining greater decrease in EAE severity in PROP-treated males.

**Keywords:** noradrenaline,  $\beta$ -AR, tyrosine hydroxylase, EAE, DA rats, sexual dimorphism, Th17 lymphocytes, antigen presenting cells, microglia, monocytes.

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Immunobiology

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Polne razlike u imunskom odgovoru</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Kateholamini u regulaciji imunskog odgovora</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Multipla skleroza i animalni model, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4. Polne razlike u multiploj sklerozi i EAE</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5. Mogući doprinos imunomodulatornog delovanja kateholamina polnim razlikama u multiploj sklerozi i EAE</b> .....	<b>12</b>
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Ogladne životinje</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Eksperimentalni protokol</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3. Eksperimentalne procedure</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.1. Indukcija EAE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.2. Praćenje neurološke slike EAE životinja</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.3. Tretman propranololom in vivo</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4. Reagensi, rastvori i antitela</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5. Izolovanje mononuklearnih ćelija</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija limfnih čvorova</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5.2. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5.3. Magnetno izdvajanje mijeloidnih CD11b+ ćelija kičmene moždine</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6. Određivanje koncentracije noradrenalina metodom HPLC</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6.1. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije noradrenalina</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6.2. HPLC</b> .....	<b>24</b>
<b>3.7. Kulture ćelija</b> .....	<b>25</b>
<b>3.7.1. Stimulacija ćelija drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine za ispitivanje produkcije citokina</b> .....	<b>25</b>
<b>3.7.2. Ispitivanje efekata agonista i/ili antagonista AR u kulturi mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora</b> .....	<b>25</b>
<b>3.8. Analiza kapaciteta za fagocitozu/endocitozu</b> .....	<b>26</b>
<b>3.8.1. Ispitivanje fagocitoze čestica lateksa</b> .....	<b>26</b>

3.8.2. <i>Analiza endocitoze dekstrana</i> .....	26
3.9. <b>Test za ispitivanje migracije antigen-prezentujućih ćelija</b> .....	26
3.10. <b>Protočna citofluorimetrija</b> .....	26
3.10.1. <i>Priprema uzoraka za ispitivanje ekspresije membranskih molekula</i> .....	26
3.10.2. <i>Priprema uzoraka za ispitivanje ekspresije unutarćelijskih molekula</i> .....	27
3.10.3. <i>Priprema uzoraka za analizu proliferacije CD4+ limfocita u kulturi</i> .....	27
3.10.4. <i>Analiza uzoraka protočnom citofluorimetrijom</i> .....	27
3.11. <b>Određivanje koncentracije citokina ELISA metodom</b> .....	28
3.11.1. <i>Određivanje koncentracije IL-17A</i> .....	28
3.11.2. <i>Određivanje koncentracije IL-2</i> .....	29
3.12. <b>Ispitivanje ekspresije gena metodom RT-qPCR</b> .....	29
3.12.1. <i>Izolacija ukupne RNK iz tkiva i mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova</i> ...	29
3.12.2. <i>Izolacija ukupne RNK iz tkiva i mononuklearnih ćelija kičmene moždine</i> .....	30
3.12.3. <i>Prevođenje ukupne RNK u cDNK</i> .....	30
3.12.4. <i>Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu</i> .....	30
3.13. <b>Statistika</b> .....	31
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>32</b>
4.1. <b>Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na razvoj bolesti kod ženki i mužjaka pacova</b> .....	32
4.1.1. <i>Tretman propranololom je efikasniji u ublažavanju bolesti kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	32
4.1.2. <i>Tretman propranololom smanjuje veličinu mononuklearnog infiltrata u kičmenoj moždini pacova oba pola u induktivnoj fazi bolesti, uključujući i sadržaj IL-17+CD4+ T-limfocita u tom infiltratu</i> .....	33
4.2. <b>Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na (auto)imunski odgovor u drenirajućim limfnim čvorovima ženki i mužjaka pacova u induktivnoj fazi bolesti</b> .....	34
4.2.1. <i>Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu i ekspresiji <math>\beta_2</math>-AR na ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova</i> .....	34
4.2.1.1. <i>Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova</i> .....	34
4.2.1.2. <i>Promene u ekspresiji <math>\beta_2</math>-AR na membrani mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova</i> .....	35
4.2.2. <i>Uticaj tretmana propranololom na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE u drenirajućim limfnim čvorovima ženki i mužjaka pacova</i> .....	35



4.2.2.1. <u>Tretman propranololom smanjuje migraciju aktiviranih antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove kod pacova oba pola, ali je efikasniji kod mužjaka</u> .....	35
4.2.2.2. <u>Tretman propranololom menja fenotipske i funkcijske karakteristike CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova</u> .....	39
<b>4.3. In vitro efekti propranolola na proliferaciju i diferencijaciju CD4+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova</b> .....	40
<b>4.3.1. Uticaj propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja</b> .....	40
4.3.1.1. <u>Ćelije limfnih čvorova sintetišu noradrenalin koji autokrino/parakrino deluje na proliferaciju limfocita</u> .....	41
4.3.1.2. <u>Propranolol povećava sintezu/sekreciju IL-2 u kulturama ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola, ali je efikasniji kod mužjaka</u> .....	44
4.3.1.3. <u>Veća procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita koji ekspimiraju <math>\beta_2</math>-AR u drenirajućim limfnim čvorovim mužjaka pacova u poređenju sa ženkama</u> .....	45
4.3.1.4. <u>Blokada <math>\alpha_1</math>-AR suprimira proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija izolovanih 7. d.p.i. EAE iz drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola</u> .....	45
<b>4.3.2. Efekti propranolola na diferencijaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja</b> .....	46
4.3.2.1. <u>Blokada <math>\alpha_1</math>-AR smanjuje zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola</u> .....	49
4.3.2.2. <u>Propranolol povećava ekspresiju gena za ROR<math>\gamma</math>t u kulturama ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova kod kojih je indukovano EAE</u> .....	50
4.3.2.3. <u>Propranolol deluje na CD4+ limfocite u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova kod kojih je indukovano EAE i indirektno, modulišući aktivnost CD11b+ ćelija</u> .....	51
4.3.2.3.1. <u>CD11b+ ćelije drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola kod kojih je indukovano EAE ekspimiraju <math>\beta_2</math>-AR i imaju sposobnost sinteze noradrenalina</u> .....	51
4.3.2.3.2. <u>Propranolol povećava ekspresiju gena za citokine od ključnog značaja za diferencijaciju Th17 limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova, ali je ovaj efekat više izražen kod mužjaka</u> .....	52
<b>4.4. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na težinu bolesti kod ženki i mužjaka pacova</b> .....	53
4.4.1. <u>Tretman propranololom je bio efikasniji u ublažavanju bolesti kod mužjaka nego kod ženki pacova</u> .....	53
4.4.2. <u>Tretman propranololom efikasnije smanjuje veličinu mononukleranog infiltrata u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova</u> .....	55
<b>4.5. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu i ekspresiji <math>\beta_2</math>-AR na CD11b+ ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka EAE pacova</b> .....	56
4.5.1. <u>Koncentracija noradrenalina u tkivu kičmene moždine</u> .....	56

4.5.2. <i>Ekspresija <math>\beta_2</math>-AR na membrani CD11b+ ćelija kičmene moždine</i> .....	56
<b>4.6. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike ćelija mikroglije u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova na vrhuncu bolesti</b> .....	<b>57</b>
4.6.1. <i>Tretman propranololom efikasnije smanjuje broj ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti</i> .....	57
4.6.1.1. <i>Tretman propranololom efikasnije stimuliše aktivnost CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalne osovine u ćelijama mikroglije mužjaka nego ženki pacova</i> .....	58
4.6.1.2. <i>Tretman propranololom efikasnije stimuliše aktivnost CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalne osovine u ćelijama mikroglije mužjaka nego ženki pacova</i> .....	61
4.6.2. <i>Tretman propranololom efikasnije stimuliše diferencijaciju ćelija mikroglije anti-inflamatornog fenotipa kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	62
4.6.2.1. <i>Tretman propranololom efikasnije smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego u mikrogliji ženki pacova</i> .....	62
4.6.2.2. <i>Tretman propranololom efikasnije povećava ekspresiju anti-inflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego ženki pacova</i> .....	63
4.6.2.3. <i>Tretman propranololom snažnije podstiče sposobnost mikroglije za fagocitozu i endocitozu kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	65
4.6.3. <i>Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine mijeloidnim ćelijama kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	67
4.6.4. <i>Tretman propranololom efikasnije podstiče razvoj anti-inflamatornog citokinskog profila mijeloidnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	68
<b>4.7. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike T-limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu ženki i mužjaka pacova na vrhuncu bolesti</b> .....	<b>69</b>
4.7.1. <i>Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine CD4+ T-limfocitima, i reaktivaciju ovih ćelija, kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	69
4.7.2. <i>Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine izuzetno patogenim T-limfocitima kod mužjaka nego kod ženki pacova</i> .....	70
4.7.3. <i>Tretman propranololom u većoj meri utiče na odnos IL-17+ efektorskih i Treg ćelija u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova</i> .....	71
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>73</b>
5.1. <i>Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na primarni (auto)imunski odgovor u drenirajućim limfnim čvorovima i razvoj bolesti kod ženki i mužjaka pacova soja DA</i> .....	73
5.2. <i>In vitro efekti propranolola na proliferaciju i diferencijaciju CD4+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova soja DA izolovanih u induktivnoj fazi EAE</i> .....	76

<b>5.3. Uticaj tretmana propranololom tokom efektorske faze EAE na težinu neurološkog deficita i fenotipske/funkcijske karakteristike imunskih ćelija kičmene moždine ženki i mužjaka pacova soja DA na vrhuncu bolesti.....</b>	<b>80</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>88</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>90</b>
<b>8. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>122</b>
<b>9. IZJAVE.....</b>	<b>123</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Polne razlike u imunskom odgovoru

Imunski odgovor na strane i sopstvene antigene razlikuje se među polovima, a polne razlike su prisutne i u urođenoj i u stečenoj komponenti imunskog sistema (Klein i Flanagan, 2016). Ženski pol odlikuju veća brojnost i aktivnost ćelija urođenog imunskog odgovora (uključujući monocite, makrofage i dendritske ćelije), kao i jači inflamatorni odgovor, što je pokazano kako kod ljudi, tako i kod ogleđnih životinja (Xia i sar., 2009; Klein i sar., 2010; Melgert i sar., 2010). Antigenprezentujuće ćelije ženki su efikasnije u prezentovanju peptida od mužjaka (Weinstein i sar., 1984). Sposobnost fagocitoze makrofaga i neutrofila je veća kod jedinki ženskog nego muškog pola (Spitzer, 1999). Ipak, broj i aktivnost urođenoubilačkih (engl. *natural killer*; NK) ćelija najčešće su veći kod muškaraca (Yovel i sar., 2001). U kontekstu ove doktorske disertacije važno je istaći i polne razlike u broju u funkcijskim karakteristikama mikroglije, rezidentnih makrofaga u centralnom nervnom sistemu (CNS) (Ghorpade i sar., 2008). Ćelije mikroglije kod odraslih mužjaka miševa pokazuju veću gustinu, u različitim regionima CNS, i morfološke karakteristike u skladu sa povećanom aktivacijom (Guneykaya i sar., 2018), u odnosu na mikrogliju ženki. Sa druge strane, postoje podaci koji ukazuju na veću sposobnost fagocitoze mikroglije ženki, u odnosu na ćelije mužjaka pacova i miševa (Yanguas-Casás, 2020).

Uopšteno, jedinke ženskog pola pokazuju i veću efikasnost adaptivne imunosti nego jedinke muškog pola. Kod žena je prisutan veći broj T-limfocita, kao i CD4+ T-limfocita, ali manji broj CD8+ T-limfocita; sledstveno, žene pokazuju i veći odnos CD4+/CD8+ T-limfocita od muškaraca (Klein, 2012). Osim toga, T-limfociti žena pokazuju izraženiju aktivaciju i proliferaciju (Klein, 2012), kao i veću citotoksičnu aktivnost i ekspresiju antivirusnih i proinflamatornih gena u odnosu na limfocite muškaraca (Hewagama i sar., 2009). Žene imaju viši bazalni nivo imonoglobulina, i snažniju produkciju antitela u odgovoru na infekcije virusima i vakcinaciju (Butterworth i sar., 1967; Cook, 2008; Klein i Roberts, 2010; Klein i sar., 2010). Takođe, u animalnim modelima je pokazano da su, nakon imunizacije, aktivacija T-limfocita i produkcija antitela veći kod ženki nego kod mužjaka (Weinstein i sar., 1984; Lorenzo i sar., 2011; Fink i sar., 2018). Sumirano, imunski odgovor pokrenut prisustvom antigena ili infekcije, a i vakcinacijom, generalno je snažniji kod jedinki ženskog pola, što ih čini otpornijim na infektivne bolesti, ali s druge strane i podložnijim razvoju autoimunskih oboljenja, alergija i astme u odnosu na muškarce (Zuk, 1996; Bouman i sar., 2005; Klein, 2012).

Neke polne razlike u funkcijama imunskog sistema prisutne su tokom celog života, dok su druge izražene samo nakon puberteta, a pre dostizanja starosti, što ukazuje da na njih utiču kako genetski, tako i hormonski faktori (Klein i Flanagan, 2016). Ovi činioci, u interakciji sa faktorima sredine (ishrana, pušenje, izloženost infektivnim agensima, hemikalijama, zračenju i sl.), doprinose razlikama u imunskom odgovoru među polovima (Ngo i sar., 2014; Taneja, 2018). Najveći deo razlika u odgovoru imunskog sistema među polovima pripisuje se dejstvu polnih hormona na funkciju imunskih ćelija (Klein, 2012). Polni hormoni se vezuju za specifične receptore, koje eksprimiraju različite ćelije limfnih tkiva i organa, kao i limfociti i mijelodne ćelije u cirkulaciji, a čija aktivacija utiče na diferencijaciju i/ili funkciju ovih ćelija (Kovats i sar., 2010). Pokazano je da polni hormoni direktno modulišu prezentaciju antigena, aktivaciju limfocita, ekspresiju citokina i/ili hemokina i migraciju imunskih ćelija u tkiva (Whitacre, 2001; Klein, 2012). Opšte gledano, smatra se da testosteron pokazuje imunosupresivne efekte, dok se estrogenu pripisuju stimulatívni efekti na imunski sistem (Taneja, 2018), iako efekat estrogena zavisi od njegove koncentracije, tipa ćelija i receptora na koji deluje, kao i drugih faktora (Straub, 2007). Dejstvo progesterona je najčešće antiinflamatorno (Klein, 2012).

Polimorfizmi gena na polnim hromozomima, kao i autozomima, koji kodiraju proteine važne za funkcije imunskog sistema, doprinose polnim razlikama u imunskom odgovoru (Poland i

sar., 2008), i u vezi su sa razlikama u osetljivosti na bakterijske (Yeretssian i sar., 2009) i virusne infekcije (Siddiqui i sar., 2009) među polovima. Važno je pomenuti da, iako je veliki broj gena koji regulišu funkcije imunskog sistema povezan sa X hromozomom (Libert i sar., 2010), polne razlike u imunskom odgovoru, pa i u razvoju imunski-posredovanih bolesti, sve se više pripisuju i genima lociranim na Y hromozomu, odnosno polimorfizmima ovih gena (Klein, 2012; Maan i sar., 2017). Takođe, primećeno je da se ekspresija mnogih gena na autozomima razlikuje između žena i muškaraca (Dupuis i sar., 2019).

Osim direktnog uticaja na imunске ćelije, važno je naglasiti i indirektnе efekte polnih steroidnih hormona. Naime, ovi hormoni modulišu funkcije sistema odgovora na stres, hipotalamusno-hipofizno-adrenalne (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*; HPA) osovine, kao i simpato-adrenomedularne osovine, odnosno osovine koju sačinjavaju simpatički nervni sistem (SNS) i srž nadbubrežne žlezde (Padgett i Glaser, 2003), koji predstavljaju dva osnovna puta komunikacije između CNS i imunskog sistema (Elenkov i sar., 2000; Padgett i Glaser, 2003). Poznato je da ovarijektomija smanjuje produkciju kortikosteroida u odgovoru na aktivaciju HPA osovine, dok je orhidektomija povećava (Wilder, 1995). Jedinke ženskog pola miševa, pacova i ljudi pokazuju veću koncentraciju glukokortikoida u plazmi od jedinki muškog pola (Griffin i Whitacre, 1991; Wilder, 1995). Osim toga, utvrđeno je da glukokortikoidi modulišu razvoj i aktivnost ćelija urođene i adaptivne imunosti, kao i da su ovi efekti polno-specifični (Bereshchenko i sar., 2018), te je postulirano da kompleksne interakcije između polnih hormona, HPA osovine i imunskog sistema doprinose polnim razlikama u imunskom sistemu (Da Silva, 1999). Sa druge strane, pokazano je da polni hormoni utiču i na aktivnost SNS. Generalno, dostupni podaci sugerišu da jedinke muškog pola pokazuju višu aktivnost SNS u odnosu na jedinke ženskog pola, koje pokazuju izraženiju aktivnost parasimpatikusa, kod eksperimentalnih životinja i ljudi, u bazalnom stanju, kao i u stresu (Dart i sar., 2002). Ove razlike su povezane sa delovanjem polnih steroidnih hormona u CNS, kao i na periferiji. Naime, estrogen inhibira aktivnost SNS, smanjuje gustinu simpatičkih nervnih vlakana i stimuliše inaktivaciju kateholamina delovanjem katehol-O-metiltransferaze i monoamino-oksidade (Dart i sar., 2002; So i Savidge, 2021). Nasuprot tome, delovanje androgena je povezano sa simpatičkom hiperaktivnošću, stimulacijom sinteze noradrenalina i inhibicijom njegove inaktivacije (Dart i sar., 2002; So i Savidge, 2021). Na osnovu svega navedenog, jasno je da i kompleksne interakcije polnih hormona, SNS i imunskog sistema treba imati u vidu kada se razmatraju polne razlike u imunskom odgovoru (Whitacre, 2001). U prilog tome govori činjenica da neuroendokrini i imunski sistem predstavljaju dva osnovna adaptivna sistema u organizmu, koji međusobno komuniciraju, posredstvom HPA osovine i SNS, u cilju održanja homeostaze (Elenkov i sar., 2000). Međutim, za razliku od glukokortikoida, koji su već dugo u kliničkoj upotrebi, zahvaljujući dobro okarakterisanim imunosupresivnim i anti-inflamatornim efektima (Padgett i Glaser, 2003), delovanje kateholamina u modulaciji imunskih funkcija, uključujući i moguće polne razlike u njihovim efektima, daleko je manje izučeno.

### **1.2. Kateholamini u regulaciji imunskog odgovora**

Kateholamini (dopamin, noradrenalin i adrenalin) obavljaju funkciju neurotransmitera u CNS i SNS, kao i hormona srži nadbubrežne žlezde u endokrinom sistemu (Nagatsu, 2007) i predstavljaju krajnje medijatore simpato-adrenalne osovine (Padgett i Glaser, 2003). U hromafinim ćelijama srži nadbubrežne žlezde i simpatičkim ganglijama, kateholamini se sintetišu iz tirozina, koji se dejstvom tirozin-hidroksilaze prevodi u dihidroksi-fenilalanin (engl. *dihydroxyphenylalanine*; DOPA), a on dekarboksilacijom posredstvom DOPA-dekarboksilaze daje dopamin. Dopamin se transportuje u vezikule i u njima se konvertuje u noradrenalin dejstvom dopamin- $\beta$ -hidroksilaze. U hromafinim ćelijama srži nabubrežne žlezde, noradrenalin se prevodi u adrenalin delovanjem feniletanolamin-N-metiltransferaze (Flierl i sar., 2008).

Ključni regulator aktivnosti SNS, istovremeno i osnovni izvor noradrenalina u CNS, jeste *locus coeruleus* (LC), jedro Varolijevog mosta iz kojeg se aksoni pružaju u različite regione mozga i kičmenu moždinu (Elenkov i sar., 2000). Centralno, aktivacija LC za posledicu ima intenzivno oslobađanje noradrenalina u mozgu i kičmenoj moždini, prevashodno iz nesinaptičkih varikoznih nervnih završetaka, što omogućava delovanje ovog medijatora na različite tipove ćelija u okruženju, uključujući i imunske ćelije (Elenkov i sar., 2000; Benarroch, 2009; O'Donnell i sar., 2012). Na periferiji, aktivacija LC rezultuje oslobađanjem noradrenalina na krajevima simpatičkih nervnih vlakana, odnosno adrenalina iz srži nadbubrežne žlezde (Elenkov i sar., 2000; Padgett i Glaser, 2003).

Pokazano je da nervna vlakna SNS inervišu sve primarne (timus i kostna srž) i sekundarne (slezina, limfni čvorovi, mukozna limfna tkiva) limfne organe/tkiva. Spletovi nervnih vlakana inervišu krvne sudove ali i parenhim limfnih organa, završavajući se u neposrednoj blizini imunskih ćelija, uključujući limfocite, dendritske ćelije i makrofage (Felten i sar., 1985; Livnat i sar., 1985; Bellinger i Lorton, 2014). U limfnim organima, simpatička vlakna oslobađaju noradrenalin (Livnat i sar., 1985), ključni krajnji medijator postganglijskih neurona SNS (Chrousos i Gold, 1992), kojem se pripisuje presudna uloga u nervnoj regulaciji funkcija imunskog sistema (Nance i Sanders, 2007; Bellinger i Lorton, 2014). Takođe, adrenalin srži nadbubrežnih žlezda, koji putem cirkulacije dospeva u limfne organe, indukuje iste efekte na imunske ćelije kao i noradrenalin poreklom iz SNS (Elenkov i sar., 2000; Padgett i Glaser, 2003). Osim toga, utvrđeno je da i u ćelijama imunskog sistema postoje funkcionalni klasični mehanizmi za sintezu, skladištenje i oslobađanje, kao i preuzimanje i degradaciju kateholamina, karakteristični za nervne ćelije (Flierl i sar., 2008; Marino i Cosentino, 2013). Smatra se da su i kateholamini sintetisani u imunskim ćelijama uključeni u regulaciju imunskih funkcija (Flierl i sar., 2008; Marino i Cosentino, 2013). Sumirano, kateholamini mogu vršiti imunomodulatorno dejstvo endokrinim (sistemski, posredstvom adrenalina srži nadbubrežnih žlezda), neurokrinim (regionalno, posredstvom noradrenalina SNS) i autokrinim/parakrinim (lokalno, posredstvom kateholamina poreklom iz imunskih ćelija) mehanizmima (Miyake i sar., 2012; Deckx i sar., 2013).

Noradrenalin deluje na ćelije koje na svojoj membrani poseduju adrenalinske receptore (AR). Postoje dva glavna tipa ovih receptora,  $\alpha$ - i  $\beta$ -AR, pri čemu se  $\alpha$ -AR mogu podeliti na podtipove  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ , od kojih svaki sadrži dodatne podtipove ( $\alpha_{1A,B,D}$ ;  $\alpha_{2A,B,C}$ ), a  $\beta$ -AR na podtipove  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  (Chhatar i Lal, 2021; Roth i sar., 1991). Tipovi AR se razlikuju ne samo prema afinitetu vezivanja liganda, već su spregnuti sa različitim G-proteinima (engl. *guanine nucleotide-binding regulatory proteins*; *G-proteins*) i, sledstveno, aktivacijom različitih signalnih puteva u ćelijama. Načelno, aktivacija  $\beta$ -AR stimuliše sintezu cikličnog adenzin-monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*; cAMP) kao sekundarnog glasnika, dok se posredstvom  $\alpha_2$ -AR njegova sinteza smanjuje; aktivacija  $\alpha_1$ -AR rezultuje stvaranjem diacilglicerola i inozitol-trifosfata kao sekundarnih glasnika (Roth i sar., 1991).

Ćelije urođenog i stečenog imunskog odgovora ispoljavaju AR na svojoj membrani, i na različitim tipovima imunskih ćelija (T- i B-limfociti, dendritske ćelije, monociti/makrofagi, mikroglia, NK ćelije, granulociti i astrociti) životinja i čoveka pokazano je prisustvo  $\beta$ - i/ili  $\alpha$ -AR (Chhatar i Lal, 2021). Kako  $\beta_2$ -AR ispoljavaju gotovo svi tipovi imunskih ćelija, smatra se da ovaj tip receptora ima ključnu ulogu u modulaciji njihovih funkcija (Bellinger i Lorton, 2014; Nance i Sanders, 2007; Sharma i Farrar, 2020). Broj  $\beta_2$ -AR ispoljen na membrani, osim što varira između različitih tipova imunskih ćelija, regulisan je brojnim faktorima, uključujući stadijum aktivacije ćelija, dejstvo citokina, hormona i neurotransmitera (Sanders i sar., 2001), što ukazuje na to da vremenski period u kojem je receptor eksprimiran može imati važnu ulogu u regulaciji imunskih funkcija nervnim sistemom (Sanders i Straub, 2002).

**Ekspresija i funkcijski značaj  $\beta$ -AR u imunskom sistemu.** Ekspresija  $\beta_2$ -AR je pokazana na svim tipovima ćelija urođene imunosti, i povezana je sa modulacijom njihove funkcije. Aktivacija  $\beta_2$ -AR na dendritskim ćelijama, kritičnim u regulaciji pokretanja i intenziteta imunskog odgovora (Steinman, 1991), reguliše njihovo sazrevanje i migraciju, produkciju citokina i, sledstveno, polarizaciju odgovora CD4<sup>+</sup> pomoćničkih T-limfocita (engl. *T helper*; Th), ali ne utiče na ekspresiju kostimulativnih molekula na membrani dendritskih ćelija (Marino i Cosentino, 2013; Padro i Sanders, 2014). Sugerisano je da aktivacija  $\beta_2$ -AR moduliše sekreciju citokina dendritskih ćelija, što za posledicu može imati favorizovanje Th2/Th17 ćelijskog odgovora na račun odgovora Th1 limfocita (Bellinger i Lorton, 2014). Monociti/makrofagi se odlikuju ekspresijom  $\beta_1$ - i  $\beta_2$ -AR, koji su uključeni u modulaciju njihove proliferacije i diferencijacije, kao i funkcija, uključujući migraciju, fagocitozu i produkciju citokina (Padro i Sanders, 2014). Važno je napomenuti da se geni koji kodiraju citokine u ovim ćelijama smatraju jednim od ključnih mesta delovanja noradrenalina u imunskom sistemu (Padro i Sanders, 2014). Slično, i mikroglia ispoljava  $\beta_1$ - i  $\beta_2$ -AR (Hertz i sar., 2010). Pokazano je da kateholamini, posredstvom ovih receptora, utiču na aktivaciju mikroglie, ekspresiju kostimulativnih molekula, produkciju citokina i sposobnost produkcije reaktivnih oblika kiseonika i azota (Walker i sar., 2013; Mori i sar., 2002; Dello Russo i sar., 2004; Blandino i sar., 2006; Wohleb i sar., 2011; Johnson i sar., 2013).

Generalno, smatra se da ćelije adaptivne imunosti, Th limfociti, CD8<sup>+</sup> citotoksični T-limfociti i B-limfociti, ispoljavaju isključivo  $\beta_2$ -AR (Nance i Sanders, 2007; Padro i Sanders, 2014). U kontekstu istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, potrebno je istaći da gotovo sve osnovne subpopulacije Th limfocita, uključujući naivne i Th1 limfocite (Sanders i sar., 1997; Sanders i sar., 2001), regulatorne T (Treg) (Guereschi i sar., 2013) i, sudeći po funkcijskim studijama, Th17 limfocite (Ebbinghaus i sar., 2012; Kim i Jones, 2010) ispoljavaju funkcionalne  $\beta_2$ -AR. Izuzetak su Th2 limfociti na kojima ovaj tip receptora nije detektovan (Sanders i sar., 1997; Sanders i sar., 2001). Takođe, važni su podaci koji pokazuju da aktivacija  $\beta_2$ -AR na membrani Th limfocita utiče na njihovu migraciju, aktivaciju, proliferaciju, diferencijaciju i efektorske funkcije (Nance i Sanders, 2007; Bellinger i Lorton, 2014; Sharma i Farrar, 2020). Generalno, smatra se da noradrenalin, posredstvom  $\beta_2$ -AR, u kontekstu citokinskog okruženja koje „oblikuju“ antigenprezentujuće ćelije, može da stimuliše diferencijaciju naivnih T-limfocita u pravcu Th1 i Th17 limfocita, ali suprimira njihove efektorske funkcije, dok, sa druge strane, stimuliše i diferencijaciju i funkcije Treg ćelija (Bellinger i Lorton, 2014).

**Ekspresija i funkcijski značaj  $\alpha$ -AR u imunskom sistemu.** Podaci koji se odnose na ekspresiju i funkciju  $\alpha$ -AR na membrani imunskih ćelija daleko su oskudniji i prevashodno se odnose na ćelije urođene imunosti. Dendritske ćelije dobijene iz kostne srži ekspresiraju  $\alpha_1$ - (Maestroni, 2000) i  $\alpha_2$ -AR (Maestroni i Mazzola, 2003), koji mogu modulisati sposobnost migracije ovih ćelija. Takođe, utvrđeno je da Langerhansove ćelije ispoljavaju  $\alpha_1$ -AR (Maestroni, 2000; Seiffert i sar., 2002), ali, u zavisnosti od eksperimentalnog sistema, aktivacija ovih receptora ili ne dovodi do promena u funkciji Langerhansovih ćelija (Seiffert i sar., 2002) ili može da moduliše njihovu funkciju (Maestroni, 2000). Funkcijski značaj  $\alpha$ -AR na dendritskim ćelijama nije pouzdano utvrđen, i moguće je da zavisi od tkiva iz kojeg ove ćelije potiču (Padro i Sanders, 2014). Makrofagi peritoneuma miša ispoljavaju  $\alpha_2$ -AR (Spengler i sar., 1990; Miles i sar., 1996), a postoje i podaci o ekspresiji funkcionalnih  $\alpha_1$ -AR (Heijnen i sar., 2002; Grisanti i sar., 2011a) i  $\alpha_2$ -AR (Maes i sar., 2000) na membrani humanih monocita. U nekim studijama, međutim, ekspresija  $\alpha_1$ -AR na ovim ćelijama nije pokazana (Roupe van der Voort i sar., 1999). Dostupna istraživanja pokazuju da aktivacija  $\alpha$ -AR monocita/makrofaga stimuliše njihove efektorske funkcije, uključujući fagocitozu i produkciju proinflamatornih citokina (Bellinger i Lorton, 2014). Ćelije mikroglie, ispoljavaju  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ -AR (Mori i sar., 2002; Hertz i sar., 2010), koji bi mogao biti uključen u

regulaciju njihove aktivacije (Xu i sar., 2010) i produkcije proinflammatoryh citokina (Mori i sar., 2002). Uopšteno, smatra se da aktivacija  $\alpha$ -AR na ćelijama urođene imunosti pokazuje imunostimulatorne/proinflammatoryh efekte (Bellinger i Lorton, 2014; Staedtke i sar., 2018). Rašireno je mišljenje da T-limfociti u fiziološkim uslovima ne ispoljavaju  $\alpha$ -AR, ali je sugerisano da se njihova ekspresija u ovim ćelijama može pokrenuti u specifičnim limfnim odeljcima, ili u patološkim stanjima (Kavelaars, 2002; Grisanti i sar., 2011b). U retkim dostupnim studijama, nije utvrđen funkcijski značaj  $\alpha_1$ -AR na T-limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova naivnih pacova, iako jeste sugerisano da bi  $\alpha_2$ -AR mogli doprineti regulaciji funkcija ovih ćelija (Bao i sar., 2007).

**Mogući doprinos disfunkcije SNS razvoju autoimunskih bolesti.** SNS, kao homeostatski regulatorni sistem, preuzima različite funkcije tokom trajanja imunskog odgovora. U slučajevima infekcije, povrede tkiva ili inflamacije, dolazi do povećanja aktivnosti simpato-adrenomedularne osovine i, sledstveno, pojačanog oslobađanja noradrenalina u limfnim organima i tkivima, odnosno adrenalina u cirkulaciju (Elenkov i sar., 2000; Lorton i Bellinger, 2015). U fiziološkim uslovima, u incijalnim fazama imunskog odgovora, dejstvo SNS je proinflammatoryh/imunostimulatorno, u cilju što brže eliminacije patogena, dok u kasnijim fazama on preuzima anti-inflamatornu ulogu, u cilju ograničavanja imunskog odgovora i ponovnog uspostavljanja homeostaze (Nance i Sanders, 2007; Lorton i Bellinger, 2015). Međutim, u slučaju perzistentne ili abnormalne aktivacije SNS ili imunskog sistema, uspostavljanje imunске homeostaze može biti narušeno i doprineti razvoju hronične inflamacije, oštećenju tkiva i razvoju autoimunosti (Lorton i Bellinger, 2015). Utvrđeno je da u stanjima hronične inflamacije dolazi do povećanja tonusa SNS (MacNeil i sar., 1996; Meltzer i sar., 2003), a zatim i njegove perzistentne hiperaktivacije, što su uslovi u kojima aktivacija  $\beta_2$ -AR, umesto klasičnog signalnog puta kojeg sačinjavaju cAMP i protein-kinaza A, može pokrenuti druge puteve prenosa signala, poput onih posredovanih mitogenom aktiviranim protein kinazama (MAPK)/ekstracelularnim signalom regulisanom (ERK) kinazom, koji se karakterišu proinflammatoryh i imunostimulatornim efektima (Lorton i Bellinger, 2015; Chhatar i Lal, 2021). Osim toga, u ovim uslovima, proinflammatoryh delovanju SNS mogli bi da doprinesu i efekti posredovani  $\alpha$ -AR na membrani ćelija mijeloidnog porekla, delom i usled autokrinog/parakrinog delovanja kateholamina sintetisanih u samim imunskim ćelijama (Flierl i sar., 2008; Bellinger i Lorton, 2014; Staedtke i sar., 2018). Ovi podaci podržavaju hipotezu da izmenjena aktivnost SNS, poput one u stresu, može predstavljati faktor rizika za pojavu inflamatornih autoimunskih bolesti, uključujući sistemski eritemski lupus, reumatoidni artritis, psorijazu i multiplu sklerozu, i uticati na njihovu progresiju i ishod (Stojanovich i Marisavljevich, 2008; Bellinger i Lorton, 2018).

### **1.3. Multipla skleroza i animalni model, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis**

Multipla skleroza je hronična autoimunska, inflamatorna, demijelinizirajuća i neurodegenerativna bolest CNS (Goldenberg, 2012), i predstavlja najčešću netraumatsku bolest mladih odraslih osoba koja dovodi do invalidnosti (Kobelt i sar., 2017). U pitanju je heterogena, imunski-posredovana, bolest čiji razvoj zavisi od kompleksne interakcije većeg broja faktora (Filippi i sar., 2018). Multipla skleroza najčešće otpočinje u uzrastu između dvadesete i četrdesete godine (Dobson i Giovannoni, 2019), iako postoje podaci da se kod 10 % obolelih prvi demijelinizacioni događaj javlja u uzrastu ispod 18 godina (Yeshokumar i sar., 2017). Procenjeno je da ova bolest pogađa oko 2,8 miliona ljudi širom sveta (Walton i sar., 2020).

Multipla skleroza je kompleksno oboljenje čiji uzrok nije do kraja poznat, ali se smatra da njenom razvoju doprinose genetski faktori u interakciji sa sredinskim faktorima rizika (Filippi i sar., 2018). Uticaj gena na podložnost multiploj sklerozu ilustruje podatak da kod, približno, jednog od osam pacijenata ova bolest postoji u porodičnoj istoriji (Harirchian i sar., 2018). Nasleđivanje multiple skleroze je poligeno i uključuje polimorfizme većeg broja gena, pri čemu je svaki od



ovih polimorfizama povezan sa malim povećanjem rizika od razvoja bolesti (Filippi i sar., 2018). Identifikovano je više od 200 polimorfizama gena koji utiču na razvoj bolesti (Baranzini i Oksenberg, 2017), pri čemu je većina ovih gena u tesnoj vezi sa funkcijama imunskog sistema, poput regulacije aktivacije i proliferacije T-limfocita ili drugih funkcija urođene i adaptivne imunosti (Filippi i sar., 2018). Ova grupa uključuje gene koji kodiraju receptore za interleukin (IL)-2, IL-7 i faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*; TNF) (Maier i sar., 2009; Lundmark i sar., 2007; Gregory i sar., 2012), ali glavne faktore rizika predstavljaju određeni aleli gena za humane leukocitne antigene (HLA) I i II klase (Olsson i sar., 2017), kao što je HLA-DRB1\*15:01 (Hollenbach i Oksenberg, 2015). Među faktorima sredine, potrebno je istaći infektivne bolesti kao moguće pokretače multiple skleroze. Infekcija Epštajn-Barovim virusom se smatra posebno važnim faktorom rizika. Naime, odsustvo infekcije Epštajn-Barovim virusom smanjuje verovatnoću razvoja multiple skleroze, dok prisustvo simptomatske infekcije ovim virusom dvostruko povećava rizik od razvoja multiple skleroze (Dobson i Giovannoni, 2019). Smatra se da bi mehanizmom molekularne mimikrije infekcija Epštajn-Barovim virusom mogla da dovede do razvoja unakrsno reaktivnih T-limfocita ili antitela, i na taj način poveća rizik od razvoja multiple skleroze, ali direktna veza još nije dokazana (Filippi i sar., 2018). Osim toga, nedostatak vitamina D povećava rizik od pojave multiple skleroze i aktivnost bolesti, sugerišući da normalni nivoi vitamina D predstavljaju zaštitni faktor tokom čitavog toka bolesti (Olsson i sar., 2017; Filippi i sar., 2018). Aktivno ili pasivno pušenje duvana identifikovano je kao faktor sredine koji povećava rizik za razvoj multiple skleroze i/ili razvoj njenih težih oblika (Ascherio, 2013; Filippi i sar., 2018). Potrebno je istaći da činioci sredine mogu da interaguju sa genetskim faktorima, sudeći prema činjenicama da prisustvo HLA-DRB1\*15:01 alela kod pušača, osoba inficiranih Epštajn-Barovim virusom, ili onih koje su pokazivale gojaznost u periodu adolescencije, značajno više povećava rizik od razvoja multiple skleroze nego u odsustvu delovanja ovih sredinskih faktora (Filippi i sar., 2018).

Multipla skleroza se javlja u tri kliničke forme. Relapsno-remitentni oblik bolesti je najčešći, i javlja se u oko 90% slučajeva, a karakterišu ga epizode pogoršanja simptoma (relapsi), između kojih nastupaju periodi oporavka/stabilnosti (remisije) (Atkins i sar., 2012). Sekundarno progresivna forma multiple skleroze se razvija iz relapsno-remitentne, obično između 10 i 15 godina od pojave prvih simptoma, kroz postepenu tranziciju pojedinačnih relapsa u bolest koja se sporo ali konstantno razvija (Lassmann i Bradl, 2017; Dobson i Giovannoni, 2019). Najređa forma, koja se javlja u 5-15% slučajeva, jeste primarno progresivna multipla skleroza, u kojoj relapsno remitentna faza izostaje a razvoj bolesti pokazuje progresiju od njene pojave (Atkins i sar., 2012). Smatra se da je u ranom inflamatornom stadijumu bolest relapsno-remitentna, a da sa razvojem neurodegeneracije ona poprima progresivni oblik (Dobson i Giovannoni, 2019).

Jedinstvena patološka karakteristika multiple skleroze, u odnosu na druge inflamatorne bolesti CNS, jeste izražena primarana demijelinizacija koja dovodi do nastanka velikih zona demijelinizacije, plakova ili lezija, koje se karakterišu potpunim gubitkom mijelina (Lassmann i Bradl, 2007), a koje se posebno često javljaju u optičkim nervima, moždanom stablu, periventrikularnoj zoni, malom mozgu i kičmenoj moždini (Karussis, 2014; Pearce, 2005). Osim demijelinizacije, u plakovima može doći do degeneracije i gubitka aksona (Lassmann i Bradl, 2017). U aktivnim lezijama uočavaju se limfocitni inflamatorni infiltrati, koje dominantno sačinjavaju CD8+ T-limfociti, uz znatno manju zastupljenost CD4+ T-limfocita i B-limfocita, kao i aktivirana mikroglia, makrofagi i astrociti, koji doprinose propagaciji inflamacije, demijelinizaciji i neurodegeneraciji (Minagar i Alexander, 2003; Lassmann i Bradl, 2017). Osim toga, u infiltratima su prisustni  $\gamma\delta$  T-limfociti i NK ćelije (Atkins i sar., 2012). Lezije su uobičajeno prisutne u zonama postkapilarnih venula, koje se karakterišu gubitkom integriteta krvno-moždane barijere, što, kako se smatra, doprinosi infiltraciji parenhima CNS proinflamatornim ćelijama (Filippi i sar., 2018). U

ranim stadijumima bolesti uočena je remijelinizacija, koja omogućava prolazni oporavak, ali u kasnijim stadijumima, sa izraženom neurodegeneracijom, dolazi do razvoja nepovratne invalidnosti (Atkins i sar., 2012).

Još nije razjašnjeno da li razvoj multiple skleroze započinje periferno ili u CNS. Prema „perifernom modelu“, primarni događaj jeste aktivacija autoreaktivnih T-limfocita na periferiji, praćena njihovom migracijom u CNS, što inicira inflamatornu kaskadu i stimuliše dalju infiltraciju T- i B-limfocitima i mijeloidnim ćelijama (Dendrou i sar., 2015). Prema „CNS-intrinzičnom modelu“, inicijalni događaj, poput virusne infekcije ili primarne neurodegeneracije, odigrava se u CNS, da bi tek sekundarno došlo do infiltracije perifernim imunskim ćelijama (Dendrou i sar., 2015).

Najšire je prihvaćen „periferni model“ razvoja multiple skleroze, po kojem bolest otpočinje u perifernim limfnim organima, abnormalnom aktivacijom CD4+ T-limfocita specifičnih za antigene mijelinskog omotača (Bielekova i sar., 2004; Cruciani i sar., 2021). Sledstveno, ove ćelije se smatraju okidačima inflamatorne kaskade pri pojavi bolesti (Lassmann i Bradl, 2017). Smatra se da periferno aktivirani T-limfociti eksprimiraju adhezivne molekule, poput VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) i MCAM (engl. *melanoma cell adhesion molecule*), i receptore za hemokine, poput CCR2 (engl. *C-C motif chemokine receptor 2*), CCR5 i CCR6 koji im omogućavaju migraciju iz limfnih organa i krvi i prolazak kroz krvno-moždanu barijeru u CNS (Constantinescu, 2011; Filippi i sar., 2018). Nakon ulaska u CNS, i prepoznavanja autoantigena u interakciji sa antigen-prezentujućim ćelijama (ćelije mikroglije, makrofagi i, u nekim slučajevima, dendritske ćelije ili astrociti) autoreaktivni T-limfociti se reaktiviraju, diferenciraju i sekretuju efektorske citokine, koji dovode do aktivacije rezidentnih imunskih ili nervnih ćelija CNS (Constantinescu, 2011). Usled direktnog delovanja proinflamatornih citokina, pre svega interferona (IFN)- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$  i IL-6, koje sintetišu rezidentne i endotelne ćelije CNS, ili aktivirani T-limfociti, dolazi do disfunkcije krvno-moždane barijere (Minagar i Alexander, 2003), što za posledicu ima migraciju aktiviranih leukocita, uključujući T- i B-limfocite, i monocite, u CNS, dalju inflamaciju i demijelinizaciju, gubitak oligodendrocita i degeneraciju/gubitak aksona (Atkins i sar., 2012; Filippi i sar., 2018). Ovim procesima doprinose rezidentne ćelije CNS, prevashodno mikroglija i astrociti, koje produkcijom neurotoksičnih medijatora, citokina, hemokina, reaktivnih oblika kiseonika, promovišu i održavaju neuro-aksonalno oštećenje i neurodegeneraciju u multiploj sklerozi (Dendrou i sar., 2015), pri čemu se smatra da hronično aktivirana mikroglija ima presudan značaj u procesu neurodegeneracije (Lassmann i von Horssen, 2011) i progresiji bolesti (Witte i sar., 2010).

Centralna uloga u razvoju multiple skleroze pripisuje se Th17 limfocitima, koji se karakterišu produkcijom IL-17, čije je prisustvo povećano na periferiji i u CNS obolelih od ove bolesti (Filippi i sar., 2018). Sugerisano je da ove ćelije mogu direktno doprineti oštećenju oligodendrocita i neurona (Kebir i sar., 2007) ili da mogu delovati indirektno, utičući na funkcije drugih imunskih ćelija, poput makrofaga ili neutrofila (Tahmasebinia i Pourgholaminejad, 2017; Filippi i sar., 2018). Smatra se da i druge subpopulacije Th limfocita imaju ulogu u razvoju multiple skleroze, uključujući Th1 limfocite, koji produkuju IFN- $\gamma$ , i T-limfocite koje odlikuje sinteza faktora stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF) (Rasouli i sar., 2015; Segal., 2019). Važno je napomenuti i izuzetnu plastičnost Th17 limfocita nakon infiltracije u CNS, koja se manifestuje konverzijom u „bivše Th17“ (engl. *ex-Th17*) limfocite povećanog patogenetskog potencijala, usled istovremene produkcije citokina IL-17, IFN- $\gamma$  i/ili GM-CSF (Lofti i sar., 2019). Potrebno je još jednom istaći da bi abnormalnoj aktivaciji autoreaktivnih T-limfocita, i pojavi relapsa u multiploj sklerozi, značajno mogle doprineti proinflamatorne antigen-prezentujuće ćelije (Filippi i sar., 2018), koje, osim prezentacijom antigena, stimulišu Th17 i Th1 ćelijske odgovore kroz preteranu produkciju

proinflammatory citokina uključenih u diferencijaciju Th1 (IL-12) i Th17 (IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ ) limfocita (Kroenke i sar., 2008; Moore i sar., 2013). Sa druge strane, autoreaktivni T-limfociti su prisutni i kod zdravih ljudi, pa se smatra da samo njihovo prisustvo nije dovoljno za pokretanje bolesti, već da njihovoj neadekvatnoj aktivaciji može doprineti i nedovoljan regulatorni kapacitet Treg ćelija (Costantino i sar., 2008; Venken i sar., 2008).

Uprkos ključnom značaju Th limfocita u pokretanju razvoja multiple skleroze (Segal, 2019), dostupni podaci sugerišu da bi CD8+ T-limfociti i/ili B-limfociti mogli imati važnu ulogu u kasnijim fazama, kada je bolest već razvijena (Lassmann i Bradl, 2017). U inflamatornim lezijama multiple skleroze, u odnosu na CD4+ T-limfocite i B-limfocite, veća je zastupljenost CD8+ T-limfocita (Marik i sar., 2007), koji bi mogli doprineti demijelinizaciji i oštećenju aksona, ali značaj ovih mehanizama za tok i aktivnost bolesti, kao i patologiju lezija, nije pouzdano utvrđen (Lassmann i van Horssen, 2011). Takođe, CD8+ T-limfociti specifični za neuroantigen mogu imati i regulatornu funkciju u multiploj sklerozi, ali su kod obolelih osoba ove ćelije nefunkcionalne tokom relapsa (Atkins i sar., 2012). Iako su autoreaktivna antitela protiv mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina (MOG), kao i prisustvo imunoglobulina i aktiviranih proteina komplementa u zonama aktivne demijelinizacije detektovani kod malog broja pacijenata, smatra se da je malo verovatno da antitela kritično doprinose patogenezi multiple skleroze (Lassmann i van Horssen, 2011; Filippi i sar., 2018). Međutim, B-limfociti mogu doprineti razvoju bolesti abnormalnom produkcijom proinflammatory citokina (uključujući IL-6, GM-CSF, TNF), koja je praćena deficijencijom u sintezi regulatornih citokina, poput IL-10. Ovo bi moglo doprineti indukciji neadekvatnih odgovora Th17 i Th1 limfocita, posredstvom IL-6 i TNF, kao i proinflammatory odgovora mijeloidnih ćelija, putem GM-CSF (Filippi i sar., 2018). Pored toga, B-limfocitima je pripisan neurotoksičan efekat u bolesti, koji se ostvaruje sekrecijom solubilnih faktora koji ubijaju oligodendrocite i nervne ćelije *in vitro* (Lisak i sar., 2012). Sa druge strane, u lezijama multiple skleroze su prisutni i plazmablasti i plazma ćelije koje sekretuju IL-10 (Machado-Santos i sar., 2018), kao i mala populacija B-limfocita anti-inflamatornog fenotipa (Mitsdoerffer i sar., 2021). U tom kontekstu, moguće je da bi promena u ravnoteži između proinflammatory i anti-inflamatornih B-limfocita mogla doprineti pojavi relapsa (Filippi i sar., 2018).

Za multiplu sklerozu ne postoji lek, već su razvijene različite terapije koje ublažavaju simptome i usporavaju napredak bolesti, a usmerene su na supresiju i modulaciju imunskog odgovora (Hauser i Cree, 2020). Pokazano je da terapija koja smanjuje relapse takođe deluje i na usporavanje progresije multiple skleroze (Montalban i sar., 2017). Ovaj podatak podržava tezu da sve kliničke forme multiple skleroze reflektuju isti patološki proces, pa iako se inflamacija povezuje sa relapsima, a neurodegeneracija sa progresijom multiple skleroze, oba procesa su prisutna kod skoro svih pacijenata od samog početka bolesti (Hauser i Cree, 2020). Ne postoji razlika u sastavu infiltrata, niti jasna histološka karakteristika različitih formi multiple skleroze (Dobson i Giovannoni, 2019). Terapeutici kao što su IFN- $\beta$ , glatiramer-acetat i dimetil-fumarat različitim mehanizmima ostvaruju anti-inflamatorno dejstvo, dok novije biološke terapije pokazuju veću efikasnost i utiču na migraciju limfocita u CNS ili vrše depleciju B-limfocita ili svih limfocita monoklonskim antitelima (Hauser i Cree, 2020).

**Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE)** se smatra eksperimentalnim modelom multiple skleroze (Robinson i sar., 2014). Međutim, potrebno je naglasiti da EAE nije jedan, univerzalan, model, koji potpuno odslikava sve aspekte multiple skleroze, već široka grupa eksperimentalno indukovanih bolesti u kojima je moguće ispitati pojedine kliničke, patološke i imunološke karakteristike humanog oboljenja (Lassmann i Bradl., 2017). Stoga, iako EAE predstavlja životinjski model autoimunski-posredovane inflamatorne demijelinizacije, koja u mnogim aspektima odražava patologiju i simptome multiple skleroze, postoje i značajne razlike

između ovih bolesti koje odražavaju heterogenost u načinu indukcije EAE i vrsti/soju ogleđnih životinja, i, sledstveno, u toku, neurološkim i patološkim karakteristikama bolesti (Fletcher i sar., 2010; Constantinescu i sar., 2011; Lassmann i Bradl., 2017; Robinson i sar., 2014). Ključnu razliku između multiple skleroze i EAE predstavlja potreba za imunizacijom životinja u cilju indukcije EAE (Gran i sar., 2007). U indukciji EAE, antigeni koji izazivaju imunski odgovor su definisani, dok u multiploj sklerozi univerzalni antigen odgovoran za razvoj bolesti nije identifikovan. Stoga, važne razlike između multiple skleroze i animalnih modela mogu biti uzrokovane razlikama u načinu aktivacije autoreaktivnih T-limfocita (Constantinescu et al., 2011). Uz sva ograničenja, korišćenje EAE je doprinelo razjašnjavanju određenih imunopatogenetskih mehanizama bolesti i omogućilo razvoj različitih terapija koje su odobrene za primenu u lečenju multiple skleroze ('t Hart i sar., 2011).

Najčešće korišćeni modeli EAE su razvijeni na visokosrodnim sojevima miševa i pacova ('t Hart i sar., 2011). Indukcija EAE može biti aktivna ili pasivna. Klasičan, „aktivni“, EAE se izaziva imunizacijom životinja homogenatom tkiva CNS ili peptidima mijelina, kao što su bazni protein mijelina (MBP), proteolipidni protein (PLP), ili MOG, uz dodatak adjuvansa, najčešće kompletnog Frojndovog adjuvansa (Stromnes i Goverman, 2006a). Uloga adjuvansa primarno se sastoji u stimulaciji ćelija urođene imunosti, tj. u stimulaciji ekspresije MHC molekula II klase, kostimulatornih molekula i relevantnih citokina, u cilju efikasnijeg pokretanja adaptivnog imunskog odgovora, kao i produžavanja prisustva antigena na mestu imunizacije (Billiau i Matthys, 2001). Dodavanje inaktivirane bakterije *Bordetella pertussis*, ili njenog toksina, doprinosi povećanju incidence i težine bolesti, tj. osigurava robusnost modela i reproducibilnost indukovane bolesti, ne samo u mišjim modelima (Levine i Sowinski, 1973), već i u modelu akutnog EAE kod pacova soja DA (engl. *Dark Agouti*) (Tanuma i sar., 2000; Miyakoshi i sar., 2003) kakav je korišćen u ovoj studiji.

„Pasivni“ EAE se izaziva adoptivnim transferom patogenih CD4+ T-limfocita specifičnih za antigene mijelina u naivne eksperimentalne životinje podložne indukciji bolesti. Ove ćelije se dobijaju aktivnom imunizacijom životinja donora, njihovom izolacijom iz limfnih tkiva i restimulacijom *in vitro* (Stromnes i Goverman, 2006b). Neurološki deficit u EAE kod eksperimentalnih glodara uobičajeno se ogleda u paralizi koja počinje od repa i napreduje u kranijalnom smeru, prema zadnjim i, zatim, prednjim ekstremitetima (Stromnes i Goverman, 2006a). Znaci neurološkog deficita se najčešće javljaju između 9. i 14. dana nakon aktivne imunizacije (Stromnes i Goverman, 2006a), a najmanje tri dana posle adoptivnog transfera (Flügel i sar., 2001; Stromnes i Goverman, 2006b).

U modelima klasičnog EAE, u induktivnoj fazi bolesti, aktivacija i proliferacija perifernih autoreaktivnih Th limfocita ključno zavise od interakcija sa dendritskim ćelijama koje prezentuju peptide mijelina (Kurschus, 2015). Osim toga, ove ćelije produkuju citokine, poput IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23, faktora transformacije rasta- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* ; TGF- $\beta$ ), neophodne za diferencijaciju Th17 limfocita (O'Brien i sar., 2010), koji se smatraju ključnim pokretačima bolesti u klasičnim modelima EAE kod miša (Kurschus i sar., 2010; Kurschus, 2015) i pacova (Nacka-Aleksić i sar., 2015; Stojić-Vukanić i sar., 2018a). Diferencijacija ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima inicijalno podrazmeva produkciju IL-17, a nakon toga, zahvaljujući plastičnosti njihovog fenotipa, sticanje sposobnosti produkcije više citokina, uključujući IL-17, IFN- $\gamma$  i/ili GM-CSF (Kurschus i sar., 2010; Hirota i sar., 2011; Nacka-Aleksić i sar., 2015) i prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (Constantinescu et al., 2011). Kao i u multiploj sklerozi, Th limfociti koji istovremeno sintetišu IL-17, IFN- $\gamma$  i/ili GM-CSF smatraju se izrazito patogenim i u modelima EAE (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011; Komuczki i sar., 2019; Sheng i sar., 2015; Stadhouders i sar., 2018). U efektorskoj fazi bolesti, nakon transmigracije u CNS, Th limfociti se reaktiviraju u

interakciji sa lokalnim antigen-prezentujućim ćelijama. Kada je u pitanju prvi talas encefalitogenih Th limfocita, ova uloga se pripisuje ćelijama mikroglije (Sosa i sar., 2013), dok u kasnijim fazama ovu ulogu preuzimaju makrofagi, dendritske ćelije i B-limfociti (Sosa i sar., 2013; Kurschus i sar., 2010). Nakon reaktivacije, Th limfociti sintetišu efektorske citokine IL-17, TNF, IFN- $\gamma$  i GM-CSF, što pokreće inflamatornu kaskadu: (1) IL-17 pokreće sekreciju citokina (GM-CSF, IL-6), hemokina, uključujući CCL2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*), CCL7, CCL20, i niza matriksnih-metaloproteinaza koje dovode do oštećenja krvno-moždane barijere i privlačenja dodatnih T-limfocita i mijeloidnih ćelija u CNS (Kurschus, 2015); (2) GM-CSF najverovatnije utiče na kapacitet inflamatornih dendritskih ćelija da stimulišu diferencijaciju Th17 limfocita (Ko i sar., 2014); (3) IFN- $\gamma$  i TNF, osim što pokazuju direktan toksičan efekat na oligodendrocite, primarno stimulišu mijeloidne efektorske ćelije, monocite i makrofage, koji produkcijom reaktivnih oblika kiseonika oštećuju mijelin (Honorat i sar., 2013), ili direktno uklanjaju delove mijelinskog omotača fagocitozom (Lampert, 1967). Posledica opisane inflamatorne kaskade jeste formiranje inflamatornog infiltrata sastavljenog od T- i B-limfocita i makrofaga i, u nekim modelima, demijelinizacionih plakova koji podsećaju na one koje se javljaju u multiploj sklerozi (Stromnes i Goverman, 2006a).

Rezolucija neuroinflamacije u EAE povezuje se sa sintezom anti-inflamatornih i neuroprotektivnih citokina, poput IL-10 i TGF- $\beta$  (Dobolyi i sar., 2012; Lobo-Silva i sar., 2016) i aktivnošću Treg ćelija (Constantinescu i sar., 2011). Treg ćelije smanjuju proliferaciju i aktivnost antigen-specifičnih encefalitogenih T-limfocita (Zhang i sar., 2010). Odnos Treg ćelija i efektorskih T-limfocita reguliše hroničnost, relapse i remisije u EAE, a smanjena zastupljenost i funkcija Treg ćelija pogoršavaju težinu bolesti (Gültner i sar., 2010). Smatra se da Treg ćelije ostvaruju svoju funkciju direktnim kontaktom sa drugim ćelijama, kao i proizvodnjom anti-inflamatornih citokina (Atkins i sar., 2012). Osim toga, važno je istaći i dvostruku ulogu ćelija mikroglije u razvoju EAE. Inicijalni odgovor mikroglije određuje težinu neuroinflamatorne bolesti (Sinner i sar., 2023), usled ekspresije MHC molekula II klase, kostimulatornih i adhezivnih molekula, i sekrecije proinflamatornih citokina i hemokina, što podstiče infiltraciju CNS leukocitima i prezentovanje antigena limfocitima (Atkins i sar., 2012). Smatra se da nakon pojave patologije CNS i znaka bolesti, mikroglija ostvaruje protektivnu ulogu, koja se ogleda u ekspresiji anti-inflamatornih citokina i fagocitozi ostataka mijelina i ćelijskog otpada, koji su nužni za reparaciju tkiva (Atkins i sar., 2012; Dobolyi i sar., 2012; Sosa i sar., 2013; Lobo-Silva i sar., 2016).

#### **1.4. Polne razlike u multiploj sklerozi i EAE**

**Multipla skleroza.** Epidemiološki podaci jasno ukazuju da žene ispoljavaju veći rizik od razvoja multiple skleroze u odnosu na muškarce, pri čemu veća prevalenca bolesti kod žena postaje sve izraženija u današnje vreme. Ranije je bilo procenjeno da se ova bolest javlja dvostruko češće kod žena u odnosu na muškarce (Confavreux i sar., 1980), dok se sada procenjuje da tri puta više žena oboleva (Coyle, 2021). Veća prevalenca multiple skleroze među ženama odnosi se prevashodno na lakši relapsno-remitentni oblik bolesti (Alvarez-Sanchez i Dunn, 2023). Ova razlika se povezuje sa robusnijim, efikasnijim T-ćelijskim autoimunskim odgovorom kod žena (Nicot, 2009; Ortona i sar., 2016; Alvarez-Sanchez i Dunn, 2023). Muškarci ređe razvijaju multiplu sklerozu, ali, ako do razvoja bolesti dođe, kod njih se češće javlja teži primarno progresivni oblik bolesti, podložniji su neurodegenerativnim promenama i, generalno, imaju lošiju prognozu bolesti u odnosu na žene (Coyle, 2021; Alvarez-Sanchez i Dunn, 2023). Muškarci se teže oporavljaju od relapsa, imaju veće gubitke moždane mase, izraženije kognitivne i motoričke poremećaje i veću stopu razvoja sekundarno progresivne forme bolesti (Golden i Voskuhl, 2017; Safi i Krieger, 2021).

Uzrok ovakvih polnih razlika može se naći u polno-specifičnim efektima faktora rizika za razvoj multiple skleroze. Utvrđeno je da postoji veća verovatnoća prenosa alela visokog rizika

HLA-DRB1\*15:01 sa majke na potomstvo, kao i rizika za razvoj multiple skleroze kod potomstva (Bove i Chitnis, 2014). Osim toga, haplotip HLA-DRB5\*0101–HLA-DRB1\*1501–HLA-DQA1\*0102–HLA-DQB1\*0602, koji se smatra kritičnim genetskim faktorom (Smith i sar., 1998), češće je prisutan kod žena nego muškaraca obolelih od multiple skleroze (Sadovnick, 2013). Pored toga, slični nalazi postoje i kada su u pitanju faktori sredine, koji mogu povećati rizik od razvoja bolesti samo kod jedinki ženskog pola (npr. pušenje duvana) (Marie i sar., 2011) ili je njihov značaj veći kod žena nego kod muškaraca (npr. imunomodulatorni efekti vitamina D) (Correale i sar., 2013). Konačno, polne razlike u riziku za razvoj multiple skleroze, i u kliničkim manifestacijama bolesti, mogu se povezati i sa delovanjem polnih steroidnih hormona. U eksperimentalnim životinjskim modelima, pokazano je da estrogeni imaju dozno-zavisani efekat na inflamaciju, pokazujući proinflamatorno delovanje u niskim koncentracijama, ali anti-inflamatorno delovanje u visokim koncentracijama (Gold i Voskuhl, 2009). Sa druge strane, testosteronu i progesteronu se pripisuje prevashodno anti-inflamatorna uloga (Gold i Voskuhl, 2009). U prilog značaju hormonskih faktora, utvrđeno je da nakon puberteta nastupa dramatičan porast rizika za razvoj multiple skleroze isključivo kod žena, što ukazuje na moguću značajnu promenu nivoa estrogena za pojavu bolesti (Chitnis, 2013), kao i da raniji ulazak u pubertet značajno povećava rizik od oboljevanja (Bove i Chitnis, 2014). Kod žena obolelih od multiple skleroze, tokom trudnoće dolazi do poboljšanja simptoma i smanjenja rizika od pojave relapsa, posebno u poslednjem trimestru, da bi do relapsa došlo u prva tri meseca nakon porođaja (Confavreux i sar., 1998; Pozzilli i Pugliatti, 2015), što je ukazalo na potencijalno značajnu ulogu estriola i progesterona, čije se koncentracije povećavaju tokom trudnoće. Mogući doprinos anti-inflamatornog i neuroprotektivnog efekta testosterona na razvoj multiple skleroze nije dovoljno proučen. Ipak, u prilog tome, pokazano je da 40% muškaraca u ranim fazama multiple skleroze pokazuje snižene nivoe testosterona, dok je kod obolelih muškaraca koji su primali testosteron nađeno poboljšanje kognitivnih sposobnosti usled usporenja atrofije mozga (Bove i Chitnis, 2014). Dakle, polne razlike u incidenci i težini multiple skleroze mogu se povezati sa genetskim, sredinskim i hormonskim faktorima (Voskuhl i Gold, 2012).

Trebalo bi naglasiti i da se sve veći značaj pridaje polnim razlikama u mehanizmima kontrole autoimunosti ili reparacije u CNS (Bove i Chitnis, 2014; Alvarez-Sanchez i Dunn, 2023). Na primer, sugerisano je da su, na nivou pojedinačnih ćelija, efektorski Th17 limfociti muškaraca obolelih od multiple skleroze patogeniji od Th17 limfocita žena (Doss i sar., 2021), kao i da njihove ćelije mikroglije u lezijama pokazuju veću sposobnost produkcije proinflamatornih citokina, poput TNF (Luchetti i sar., 2014), u odnosu na ćelije mikroglije žena. Sa druge strane, obolele žene, najverovatnije, pokazuju veći potencijal za remijelinizaciju nego muškarci (Goldschmidt i sar., 2009).

**EAE.** Pored toga što se pokazao korisnim za razumevanje imunopatogenetskih mehanizama multiple skleroze, EAE takođe odslikava jednu od ključnih karakteristika ove bolesti, i autoimunskih oboljenja generalno, a to je postojanje polnih razlika u njenoj incidenci i težini (Ryan i Mills, 2022). Ovakve razlike jesu uočene, iako rezultati različitih studija nisu konzistentni. U prvim istraživanjima na pacovima soja *Lewis* utvrđeno je da ženke razvijaju relapsno-remitentni oblik EAE, u poređenju sa akutnom monofaznom bolešću kod mužjaka, ali razlike u težini bolesti nisu uočene (Keith, 1978), da bi naknadno bilo pokazano da pacovi oba pola razvijaju relapsno-remitentnu formu bolesti, težu kod mužjaka (Trooster i sar., 1996). Novija istraživanja pokazuju smanjenu incidencu i odložen početak aktivno indukovano EAE kod ženki pacova soja DA, ali izraženiji neurološki deficit kod mužjaka (Nacka-Aleksić i sar., 2015). Imajući u vidu da smer polnih razlika odgovara onom u multiploj sklerozi, ovaj model bolesti je korišćen i u istraživanjima sprovedenim u sklopu ove doktorske disertacije. Sa druge strane, korišćenjem mišjih modela EAE,

koji su uključivali različite protokole indukcije bolesti, različite antigene korišćene za imunizaciju i različite sojeve životinja, generalno je pokazano da se, kada polne razlike postoje, ženke karakterišu većom incidencom, težinom i/ili trajanjem bolesti u odnosu na mužjake (Nicot, 2009; McCombe i Greer, 2022).

Takođe, kao i u multiploj sklerozi, polne specifičnosti u interakciji genetskih, sredinskih i hormonskih faktora doprinose polnim razlikama u osetljivosti eksperimentalnih životinja na indukciju EAE, kao i na razvoj i težinu bolesti (Nicot, 2009; Kremmentsov i Teuscher, 2013; McCombe i Greer, 2022). Ovi faktori uključuju genske lokuse koji određuju podložnost eksperimentalnih glodara razvoju relapsno-remitentnog i akutnog neremitentnog EAE (Butterfield i sar., 1999), iako ovi lokusi nisu povezani sa genima koji kodiraju MHC molekule (Nicot, 2009), kao i izloženost infektivnim agensima (Goverman i sar., 1993) i nedostatak vitamina D (Spach i Hayes, 2005).

Dodatno, istraživanja sprovedena u modelima EAE sugerišu značajan doprinos polnih razlika u efikasnosti mehanizama oštećenja i/ili reparacije tkiva CNS razlikama u razvoju i neurološkoj prezentaciji bolesti. Utvrđeno je da Th17 limfociti mužjaka pacova (Nacka-Aleksić i sar., 2015), kao i miševa (Doss i sar., 2021), pokazuju veću sposobnost produkcije IFN- $\gamma$  i time veći patogenetski potencijal, u odnosu na ćelije ženki. Th1 limfociti mužjaka miševa pokazuju veću encefalitogenost nego ćelije ženki, zahvaljujući efikasnijoj diferencijaciji u pravcu memorijskog/efektorskog fenotipa (Williams i sar., 2011). Takođe, i ćelije mikroglije se morfološki i funkcijski razlikuju među polovima (Bordeleau i sar., 2019; Han i sar., 2021; Nacka-Aleksić i sar., 2017; Schwarz i sar., 2012). Razlike obuhvataju povećanu ekspresiju MHC molekula I i II klase, i sposobnost prezentacije antigena (Guneykaya i sar., 2018), i veću ekspresiju gena uključenih u procese inflamacije koji se nalaze pod kontrolom nuklearnog faktora kapa B (NF- $\kappa$ B) (Villa i sar., 2018) u ćelijama mikroglije mužjaka miševa, u odnosu na mikrogliju ženki. Sa druge strane, mikroglija ženki miševa pokazuje veću ekspresiju gena koji doprinose neuroprotektivnim funkcijama (Villa i sar., 2018). Konačno, smatra se da je proces remijelinizacije efikasniji kod jedinki ženskog pola, dok su neuroni jedinki muškog pola podložniji oštećenju (Alvarez-Sanchez i Dunn, 2023).

### **1.5. Mogući doprinos imunomodulatornog delovanja kateholamina polnim razlikama u multiploj sklerozi i EAE**

Uz prethodno navedene faktore sredine koji doprinose razvoju multiple skleroze, sve veći broj istraživanja identifikuje fizičke i psihološke stresore kao okidače ove bolesti i faktore koji doprinose njenom pogoršanju (Li i sar., 2004; Mohr i sar., 2004; Shepshelovich i Shoenfeld, 2006; Djelilovic-Vranic i sar., 2012; Briones-Buixassa i sar., 2015), pri čemu i sam razvoj bolesti izaziva stres, stvarajući začaran krug (Shepshelovich i Shoenfeld, 2006; Briones-Buixassa i sar., 2015). Efekti stresa su povezani sa delovanjem krajnjih medijatora HPA osovine, glukokortiokoida, kao i simpato-adrenalne osovine, kateholamina (Gold i sar., 2005).

Osim senzornih, kognitivnih i motornih manifestacija, kod 45-84% pacijenata obolelih od multiple skleroze dolazi i do poremećaja u funkciji autonomnog nervnog sistema (ANS) (Racosta i Kremenchutzky, 2014). Ovo se ogleda u poremećajima u radu kardiovaskularnog sistema, bešike i creva, kao i seksualnoj disfunkciji i pojavi umora, što značajno umanjuje kvalitet života pacijenata (Flachenecker i sar., 2003; Haensch i Jörg, 2006; Kodounis i sar., 2005). Imajući u vidu da je simpatička grana ANS jedan od ključnih puteva komunikacije CNS i imunskog sistema, pretpostavljeno je da (1) promene u funkciji simpato-adrenalnog sistema usled delovanja stresora, u ranim fazama multiple skleroze i pri pojavi relapsa, i (2) oštećenja neurona simpato-adrenalnog sistema i njihovih projekcija, tokom progresije bolesti, predstavljaju ne samo posledicu bolesti, već i značajan patogenetski mehanizam koji doprinosi njenom razvoju (Flachenecker i sar., 2001;

Merkelbach i sar., 2006; Shepshelovich i Shoenfeld, 2006; Habek, 2019; Habek i Krbot Skorić, 2020). U prilog ovoj tezi govore podaci da nedostatak vitamina D i infekcija Epstein-Barr virusom, kao faktori rizika za razvoj multiple skleroze, mogu doprineti disfunkciji SNS (Racosta i sar., 2015).

U prilog poremećenoj simpatičkoj regulaciji u multiploj sklerozi/EAE govore dve grupe podataka (Gold i sar., 2005). Prvo, kod obolelih od multiple skleroze utvrđene su promene u koncentracijama kateholamina. Kod pacijenata sa hronično progresivnim oblikom multiple skleroze koncentracija noradrenalina u cirkulaciji je povećana (Karaszewski i sar., 1990), dok je kod pacijenata sa relapsno-remitentnom formom bolesti ona smanjena, u odnosu na zdrave kontrole (Mel'nikov i sar., 2018). U limfocitima periferne krvi pacijenata sa relapsno-remitentnim oblikom multiple skleroze, tokom prvog napada, sadržaj noradrenalina je manji (Rajda i sar., 2002), ali je u remisiji sadržaj noradrenalina veći, u odnosu na ćelije zdravih osoba. Takođe, primećena je povećana gustina ekspresije  $\beta$ -AR na membrani mononuklearnih ćelija periferne krvi pacijenata obolelih od multiple skleroze (Zoukos i sar., 1992; 1994). Pokazatelji disfunkcije SNS su uočeni i u različitim modelima EAE. Smanjena koncentracija noradrenalina u slezini u induktivnoj fazi aktivnog EAE kod pacova soja *Lewis* praćena je povećanjem gustine  $\beta$ -AR na limfocitima slezine (Mackenzie i sar., 1989). U kičmenoj moždini i/ili moždanom stablu pacova soja *Lewis* zabeležena je smanjena koncentracija noradrenalina na vrhuncu EAE (Krenger i sar., 1986; Krenger i sar., 1989; White i sar., 1983). U mišjim modelima EAE je, takođe, uočeno smanjenje koncentracije noradrenalina u kičmenoj moždini tokom razvoja EAE (Musgrave i sar., 2011; Polak i sar., 2011). Drugo, eksperimentalno indukovane promene u delovanju kateholamina, pre svega noradrenalina, dovode do promena u razvoju i težini EAE. Elektrolitičko uništavanje neurona LC kod pacova soja *Wistar* (Jovanova-Nešić i sar., 1993), kao i hemijska deplecija noradrenalina u CNS kod pacova soja *Lewis* (Karpus i sar., 1988; Konkol i sar., 1990), dovode do smanjenja težine bolesti. Pored toga, pokazano je i da periferna simpatektomija smanjuje težinu neurološkog deficita aktivnog EAE kod miševa soja C57BL/6 (engl. *C57 black 6*) (Bhowmick i sar., 2009), ali povećava težinu bolesti kod pacova soja *Lewis* (Chelmicka-Schorr i sar., 1988). Farmakološkom blokadom AR, takođe, može se modulisati razvoj EAE u različitim modelima. Tretman životinja propranololom, neselektivnim antagonistom  $\beta$ -AR, tokom čitavog trajanja bolesti, ublažava neurološke i histološke znake aktivnog EAE kod pacova soja DA (Dimitrijević i sar., 2007), ali kod životinja soja *Lewis* dovodi do razvoja teške bolesti (Chelmicka-Schorr i sar., 1989). Primena propranolola tokom efektorske faze aktivnog EAE kod pacova soja *Lewis* ne utiče (Chelmicka-Schorr i sar., 1989), ili dovodi do povećanja težine bolesti (Brosnan i sar., 1985), dok kod pacova soja DA umanjuje težinu neurološkog deficita (Pilipović i sar., 2020). Osim toga, primena prazosina, neselektivnog antagonista  $\alpha_1$ -AR, u različitim protokolima primene, dovodi do smanjenja neurološkog deficita kod pacova soja *Lewis*, nakon aktivne indukcije EAE ili adoptivnog transfera encefalitogenih ćelija (Brosnan i sar., 1985). Bez obzira na kontradiktorne rezultate dobijene istraživanjem efekata modulacije delovanja kateholamina, najverovatnije usled razlika u protokolima imunizacije i sprovođenja tretmana, kao i genetskoj podlozi životinja, navedeni rezultati jasno ukazuju da disfunkcija SNS u multiploj sklerozi/EAE može doprineti poremećajima u imunoregulaciji i, samim tim, patogenezi ovih bolesti (Flachenecker i sar., 2001; Racosta i Kimpinski, 2016).

Uzimajući u obzir činjenicu da polne specifičnosti u anatomiji CNS mogu doprineti različitim fiziološkim i hormonskim odgovorima kod jedinki ženskog i muškog pola, sugerisano je da razlike u odgovoru na stres mogu doprineti polnim razlikama u podložnosti razvoju i težini multiple skleroze i EAE (Nicot, 2009). U skladu sa ovom hipotezom jeste dobro poznato postojanje polnih razlika u reaktivnosti HPA osovine (Morale i sar., 2001; Roca i sar., 2005), kao i simpatoadrenomedularne osovine (Hinojosa-Laborde i sar., 1999; Nicot, 2009), osnovnih puteva



neuroendokrine modulacije imunskih funkcija (Elenkov i Chrousos, 1999; Elenkov i sar., 2000; Padgett i Glaser, 2003; Bereshchenko i sar., 2018). Malobrojne studije koje su ispitivale ovu mogućnost prevashodno su bile usmerene na polno-specifičan doprinos glukokortikoida razvoju EAE (Griffin i sar., 1993; Sieve i sar., 2004; 2006; Harpaz i sar., 2013). Uprkos značaju, mogućnost da polne specifičnosti u imunomodulatornom delovanju noradrenalina doprinose polnim razlikama u razvoju EAE, i potencijalno multiple skleroze, nije bila predmet detaljnih istraživanja. Ovakvu mogućnost podržavaju podaci koji pokazuju postojanje polnih razlika u gustini simpatičkih nervnih vlakana u sekundarnim limfnim organima (ThyagaRajan i sar., 2011) i sadržaju noradrenalina u imunskim ćelijama (Leposavić i sar., 2011) zdravih eksperimentalnih glodara. Takođe, polne razlike su pokazane i u gustini ekspresije  $\beta_2$ -AR na ćelijama imunskog sistema (Leposavić i sar., 2011), kao i u imunomodulatornim efektima koji se ostvaruju posredstvom ovog tipa receptora, kod zdravih ljudi i eksperimentalnih glodara (de Coupade i sar., 2004; de Coupade i sar., 2007). U tom smislu, potrebno je istaći da efekti kateholamina na imunske funkcije, bar delom, zavise od razlika u dostupnosti ovih medijatora u okruženju imunskih ćelija, kao i razlika u membranskoj ekspresiji i/ili aktivnosti  $\beta$ -AR na ovim ćelijama (Bellinger i Lorton, 2014). Konačno, potrebno je istaći da su razlike u aktivnosti SNS povezane sa polnim specifičnostima u regulaciji funkcija drugih sistema i, sledstveno, sa razlikama u incidenci i kliničkim manifestacijama poremećaja koji ove sisteme pogađaju (npr. kardiovaskularni sistem) (Dart i sar., 2002).

## 2. CILJEVI

Na osnovu prethodno iznetih podataka, predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita mogući doprinos noradrenalina, kao krajnjeg medijatora SNS, razvoju polnih razlika u imunopatogenezi autoimunske neuroinflamacije u modelu akutnog EAE kod pacova soja DA.

Krajnji cilj istraživanja bio je da se ispita postojanje polnih razlika u imunomodulatornom delovanju noradrenalina na odgovor CD4<sup>+</sup> T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima i razvoj autoimunske inflamacije u ciljnom organu (kičmenoj moždini) kod mladih odraslih pacova soja DA imunizovanih homogenatom singene kičmene moždine u cilju indukcije EAE i, ako se pokaže da je njegovo delovanje polno-specifično, da se identifikuju celularni i molekularni mehanizmi koji stoje u njegovoj osnovi, a u cilju boljeg razumevanja prethodno pokazanog polnog dimorfizma u razvoju i težini ove bolesti.

Radi realizacije krajnjeg cilja istraživanja, postavljeni su sledeći specifični istraživački zadaci:

1. da se (a) ispita uticaj farmakološke blokade primarno  $\beta$ -AR, a u zavisnosti od dobijenih rezultata, i  $\alpha$ -AR, u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike antigen-prezentujućih ćelija i CD4<sup>+</sup> T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova sedmog dana posle indukcije EAE, kao i da se (b) ispita uticaj blokade navedenih AR u prisustvu i odsustvu egzogenog liganda za ove receptore u kulturi ćelija, izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova u istoj vremenskoj tački posle indukcije EAE, na proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita i njihovu diferencijaciju u potencijalno patogene ćelije koje sintetišu IL-17 i GM-CSF, i definišu mehanizmi delovanja, te da se (c) utvrdi da li se moguće polne razlike u efektima blokade mogu povezati sa polnim razlikama u raspoloživosti noradrenalina, kao ključnog endogenog liganda, i/ili ekspresiji AR na imunskim ćelijama.

2. da se kod mužjaka i ženki pacova soja DA kod kojih je indukovao EAE ispita uticaj farmakološke blokade primarno  $\beta$ -AR u efektorskoj fazi bolesti na (a) fenotipske i funkcijske karakteristike ćelija mikroglije kičmene moždine i mijeloidnih ćelija i T-limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu na vrhuncu bolesti i definišu mehanizmi delovanja, a ako se pokaže da postoje polne razlike, i da se (b) ispita da li ove razlike koreliraju sa potencijalnim razlikama u raspoloživosti noradrenalina i/ili ekspresiji AR na imunskim ćelijama.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ogledne životinje

U studiji su korišćene ženke i mušjaci mladih adultnih pacova (starosti 3-4 meseca) visokosrodnog DA soja. Životinje su gajene u vivarijumu Centra za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu, pri standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od  $21 \pm 2$  °C, relativna vlažnost vazduha 50-60%, režim smenjivanja svetla i mraka u intervalima od 12h, uz neograničen pristup hrani i vodi. U jednom kavezu su gajena po tri pacova istog pola.

Sve eksperimentalne procedure u ovoj studiji obavljene su u skladu sa smernicama direktive Evropske komisije i Saveta Evrope 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe i Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. Odobrenje za izvođenje eksperimenata pod brojem 323-07-01577/2016-05/14 dala je Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. U skladu sa konceptima 3R, eksperimenti su osmišljeni tako da se validni rezultati dobiju upotrebom najmanjeg neophodnog broja oglednih životinja, a da se njihova patnja, bol i distress uklone u najvećoj mogućoj meri.

#### 3.2. Eksperimentalni protokol

Studija je obuhvatila dve velike eksperimentalne celine, koje su za cilj imale:

1. utvrđivanje značaja perifernog imunomodulatornog delovanja noradrenalina za polno-specifičnu patogenezu EAE tj. za polne razlike u mehanizmima odgovornim za aktivaciju autoreaktivnih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima i pokretanje primarnog (auto)imunskog odgovora.
2. ispitivanje značaja centralnog imunomodulatornog delovanja noradrenalina za polne specifičnosti u razvoju neurološkog deficita u EAE, tj. za polne razlike u mehanizmima odgovornim za ulazak i reaktivaciju patogenih (autoreaktivnih) T-limfocita u kičmenu moždinu i kontrolu neuroinflamacije u ovom organu.

Prva celina obuhvata dve veće grupe eksperimenata: U prvoj grupi eksperimenata, ženke i mušjaci DA pacova podvrgnuti su tretmanu propranololom (neselektivnim antagonistom  $\beta$ -AR) ili fiziološkim rastvorom *in vivo* tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE, odnosno od dana indukcije EAE („nulti“ dan) do dana žrtvovanja, 7. dana posle indukcije (d.p.i.) EAE. U preliminarnom eksperimentu je utvrđen efekat navedenog tretmana na tok bolesti životinja sve do njihovog potpunog oporavka (odsustva neuroloških znaka bolesti). Eksperimenti su ponavljani dva puta, i u okviru svake eksperimentalne grupe deo pacova je žrtvovan 7. d.p.i., a manji broj životinja je dalje praćen do potpunog oporavka radi potvrde efekata tretmana propranololom na tok EAE. U drugoj grupi eksperimenata su ispitani *in vitro* efekti propranolola na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova koje učestvuju u patogenezi EAE. U tom cilju su životinje imunizovane radi indukcije EAE i žrtvovane u induktivnoj fazi bolesti (7. d.p.i.). Eksperimenti su ponavljani dva puta.

Druga celina podrazumeva eksperimente u kojima je ženkama i mušjacima DA pacova ubrizgavan propranolol ili fiziološki rastvor *in vivo* tokom efektorske faze EAE, odnosno počevši od 10. d.p.i. pa do potpunog oporavka/žrtvovanja na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.). Za početak tretmana određen je 10. d.p.i. EAE jer se tada pojavljuju prvi neurološki znaci bolesti. U uvodnom eksperimentu je ispitana efekat tretmana propranololom tokom efektorske faze EAE na tok bolesti, primenom propranolola/fiziološkog rastvora i praćenjem životinja sve do njihovog potpunog oporavka. Eksperimenti su ponavljani dva puta, i deo EAE životinja žrtvovan je na vrhuncu bolesti, dok je kod manjeg broja pacova svake eksperimentalne grupe nastavljena primena

propranolola/fiziološkog rastvora i praćen je tok EAE sve do potpunog oporavka, radi potvrde efekata tretmana primećenih u uvodnom eksperimentu.

Za utvrđivanje razlika u sintezi i/ili koncentraciji noradrenalina i ekspresiji AR u limfnim čvorovima i kičmenoj moždini ženki i mužjaka DA pacova tokom razvoja EAE, korišćene su netretirane EAE (žrtvovane u induktivnoj ili efektorskoj fazi EAE), kao i zdrave neimunizovane životinje oba pola. Ovi podaci predstavljali su bazu za razumevanje rezultata dobijenih istraživanjima značaja perifernog (prva eksperimentalna celina) i centralnog (druga eksperimentalna celina) imunomodulatornog delovanja noradrenalina za polno-specifičnu patogenezu EAE.

Životinje su žrtvovane intrakardijalnom perfuzijom fosfatom puferisanim fiziološkim rastvorom (engl. *phosphate buffered saline*; PBS; pH 7,3), nakon uvođenja u duboku anesteziju intraperitonealnom primenom rastvora ketamina (80 mg/kg telesne mase; Ketamidol, Richter Pharma AG, Wels, Austrija) i ksilazina (8 mg/kg telesne mase; Xylased, Bioveta, Ivanovice na Hané, Češka Republika) u fiziološkom rastvoru.

Nakon perfuzije, iz životinja žrtvovanih 7. d.p.i., izolovani su limfni čvorovi koji dreniraju mesto imunizacije (poplitealni) i kičmena moždina, a od pacova žrtvovanih 14. d.p.i. uzimana je kičmena moždina. Iz zdravih neimunizovanih životinja izolovani su poplitealni i ingvinalni limfni čvorovi i kičmena moždina.

Kod ženki i mužjaka DA pacova podvrgnutih tretmanu propranololom ili fiziološkim rastvorom od dana imunizacije do 7. d.p.i. u induktivnoj fazi EAE je u kičmenoj moždini ispitivan broj mononuklearnih ćelija i Th17 limfocita. U drenirajućim limfnim čvorovima je metodom protočne citofluorimetrije ispitivana migracija mijeloidnih CD11b+ antigen-prezentujućih ćelija i njihov status aktivacije, kao i aktivacija/proliferacija konvencionalnih T-limfocita i broj Th17 limfocita. Sekretacija/sekrecija citokina IL-17 merena je metodom enzimske imunoadsorpcije (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA). Ispitivana je i ekspresija hemokina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*; RT-qPCR).

Pri utvrđivanju *in vitro* efekata noradrenalina u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova (izolovanih 7. d.p.i. EAE) ženki i mužjaka pacova metodom protočne citofluorimetrije ispitivana je proliferacija CD4+ limfocita i njihova diferencijacija u patogene Th17 limfociti. RT-qPCR metodom je merena genska ekspresija glavnih citokina/transkripcionih faktora odgovornih za proliferaciju i diferencijaciju ovih ćelija, a ELISA tehnikom je merena koncentracija IL-2 u supernatantima ćelijskih kultura.

Kod ženki i mužjaka DA pacova koji su tokom efektorske faze EAE dobijali propranolol ili fiziološki rastvor su na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.) ispitivana fenotipska i funkcijska svojstva mijeloidnih ćelija (mikroglia, monociti/makrofagi poreklom iz krvi) i T ćelija kičmene moždine. Tkivo kičmene moždine obolelih pacova je uzimano za: (i) analizu mononuklearnih ćelija kičmene moždine i utvrđivanje *in vitro* fagocitnog kapaciteta mikroglije protočnom citofluorimetrijom; (ii) kvantifikaciju ekspresije proinflamatornih i anti-inflamatornih faktora RT-qPCR metodom u mijeloidnim ćelijama izolovanim magnetnom separacijom iz mononuklearnih ćelija kičmene moždine; (iii) analizu ekspresije hemokina u tkivu RT-qPCR metodom.

Pri ispitivanju uticaja EAE na koncentraciju/sadržaj noradrenalina u tkivu/ćelijama limfnih čvorova i tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka DA pacova korišćena je metoda tečne hromatografije pod visokim pritiskom (engl. *high-pressure liquid chromatography*; HPLC). U mononuklearnim ćelijama limfnih čvorova zdravih i životinja u induktivnoj fazi EAE, kao i u subpopulacijama mijeloidnih i CD4+ T-limfocita EAE pacova (7. d.p.i.) su protočnom citofluorimetrijom ispitivane potencijalne polne razlike u ekspresiji tirozin-hidroksilaze i AR. U

mijeloidnim ćelijama kičmene moždine dobijenim magnetnom separacijom, RT-qPCR metodom je analizirana ekspresija  $\beta$ -AR kod zdravih i EAE pacova.

### 3.3. Eksperimentalne procedure

#### 3.3.1. Indukcija EAE

Za indukciju EAE, u plantarnu stranu zadnje desne šape, intradermalno je ubrizgavano 100  $\mu$ l emulzije homogenata kičmene moždine singenih životinja u kompletnom Frojndovom adjuvansu koji je sadržao 1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka). Kičmena moždina (1 g) homogenizovana je u fiziološkom rastvoru (2,5 ml) na ledu, a emulzija je dobijena mešanjem jednakih zapremina homogenata i kompletnog Frojndovog adjuvansa, protiskivanjem između špriceva povezanih plastičnom spojnicom. Mešanje je započinjano potiskivanjem vodene faze u uljanu, da bi se obezbedila encefalitogenost emulzije (Beeton i sar., 2007). Suspenzija (250  $\mu$ l)  $5 \times 10^8$  inaktivirane bakterije *Bordetella pertussis* u fiziološkom rastvoru supkutano je primenjivana u istu šapu dorzalno, s obzirom na to da toksin ove bakterije povećava propustljivost krvno-moždane barijere i olakšava prolazak ćelija iz periferne krvi u CNS (Bergman i sar., 1978). Pre indukcije EAE, životinjama je indukovana anestezija intraperitonealnom injekcijom rastvora ketamina (50 mg/kg telesne mase) i ksilazina (5 mg/kg telesne mase).

#### 3.3.2. Praćenje neurološke slike EAE životinja

Od dana indukcije EAE, životinje su svakodnevno pregledane, uz praćenje telesne mase i neuroloških znaka EAE. Procena težine bolesti vršena je upotrebom sledeće skale neurološkog deficita: 0, odsustvo neuroloških znaka bolesti; 0,5, atonija distalnog dela repa; 1, potpuna atonija repa; 2, slabost (pareza) zadnjih ekstremiteta; 3, oduzetost (paraliza) zadnjih ekstremiteta. Životinjama kod kojih se bolest ispoljila, olakšan je pristup izgnječenoj hrani i vodi njihovim postavljanjem u niži položaj u kavezu.

Analizirani su incidenca (broj životinja sa neurološkim znacima EAE/ukupan broj imunizovanih životinja u grupi), dan početka bolesti (dan nakon indukcije EAE kada su uočeni prvi neurološki znaci EAE) i njeno trajanje, gubitak telesne mase sa razvojem EAE, maksimalan neurološki skor (suma najvećih neuroloških znaka/broj životinja koje su razvile neurološki EAE) i indeks neurološke težine bolesti (kumulativni neurološki skor/broj dana sa neurološkim znacima EAE).

#### 3.3.3. Tretman propranololom in vivo

Propranolol [engl. ( $\pm$ )-*propranolol hydrochloride*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH] ili sterilan fiziološki rastvor primenjivani su kod ženki i mužjaka pacova supkutano, dva puta dnevno. Prva eksperimentalna grupa dobijala je fiziološki rastvor/propranolol od dana indukcije EAE do 7. d.p.i., odnosno tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE, s obzirom na to da je započinjanje tretmana prethodilo imunizaciji. Druga eksperimentalna grupa je dobijala fiziološki rastvor/propranolol od 10. do 14. d.p.i. EAE, odnosno potpunog oporavka kod životinja kojima je praćen kompletan tok bolesti. Za početak tretmana određen je dan kada se ispoljavaju prvi neurološki znaci bolesti (10. d.p.i.). Način primene propranolola odabran je imajući u vidu da supkutana, u poređenju sa oralnom primenom propranolola pruža višestruko veću bioraspodivnost (Rao i sar., 2003), kao i da se na takav način umanjuje efekat izuzetno visokog metabolizma prvog prolaza kroz jetru karakterističnog za propranolol (Barnes i Eltherington, 1966; Borchard, 1990). Doza propranolola od 10 mg/ml fiziološkog rastvora/kg telesne mase životinje odabrana je s obzirom na njen kapacitet da blokira sve  $\beta$ -AR bez toksičnog efekta (Niarchos i sar., 1977;

Robinson i sar., 2011), kao i rezultate preliminarnog eksperimenta koji su pokazali da ona odlaže početak bolesti kod ženki i mužjaka DA pacova. Kontrolnim životinjama je ubrizgavan sterilan fiziološki rastvor, 1 ml/kg telesne mase.

### 3.4. Reagensi, rastvori i antitela

Za pripremu emulzije kojom su životinje imunizovane, korišćen je kompletan Frojndov adjuvans koji sadrži 1 mg inaktiviranih bakterija *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177), 0,85 ml parafinskog ulja i 0,15 ml manid-monooleata u mililitru. Suspenzija inaktiviranih bakterija *Bordetella pertussis* proizvedena je u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”.

Za izdvajanje mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine centrifugiranjem u gustinskom gradijentu korišćen je komercijalni medijum perkol (engl. *Percoll*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), gustine 1,13 g/ml. Izotonični perkol, gustine 1,122 g/ml, pravljen je mešanjem 10 puta koncentrovanog PBS i medijuma perkol u odnosu 1:10. Od izotoničnog perkola su dobijeni gradijenti gustine 1,085 g/ml (70% perkol) i 1,048 g/ml (40% perkol), dodavanjem odgovarajuće količine PBS.

PBS je proizveden u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, a u njegov sastav ulaze: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,8 mM), NaCl (137 mM) i KCl (2,7 mM).

Za obeležavanje membranskih i unutarćelijskih molekula radi analize metodom protočne citofluorimetrije, u ovoj studiji su korišćena antitela i sekundarni reagensi navedeni u Tabeli 1.

**Tabela 1. Antitela i sekundarni reagensi korišćeni za analizu membranskih i unutarćelijskih molekula protočnom citofluorimetrijom**

	Antitelo/reagens	Domaćin	Klon	Proizvođač
<b>Fluorohromom-konjugovana antitela</b>				
1.	CD11b-FITC	miš	ED8	Serotec, Oxford, Ujedinjeno Kraljevstvo
2.	CD11b-biotin	miš	WT.5	BD Biosciences Pharmingen, Mountain View, CA, SAD
3.	CD45-PE	miš	OX-1	Serotec
4.	CD45-biotin	miš	OX-1	BD Biosciences Pharmingen
5.	ED2 (CD163)-PE	miš	HIS36	BD Biosciences Pharmingen
6.	CD4-FITC	miš	OX-38	BD Biosciences Pharmingen
7.	CD4-PE	miš	OX-38	BD Biosciences Pharmingen
8.	CD4-APC	miš	OX35	eBioscience, San Diego, CA, SAD

9.	TCR $\alpha$ $\beta$ -PerCP	miš	R73	BD Biosciences Pharmingen
10.	TCR $\alpha$ $\beta$ -AF647	miš	R73	BioLegend, San Diego, CA, SAD
11.	CD25-PerCPeF710	miš	OX39	eBioscience
12.	CD4-APC	miš	OX35	eBioscience
13.	Foxp3-FITC	pacov	FJK-16s	eBioscience
14.	IFN- $\gamma$ -FITC	miš	DB-1	BD Biosciences Pharmingen
15.	IL-10-PE	miš	A5-4	BD Biosciences Pharmingen
16.	IL-17-FITC	pacov	eBio17B7	eBioscience
17.	IL-17A-PE	pacov	TC11- 18H10	BD Biosciences Pharmingen
18.	Ki-67-PE	miš	B56	BD Biosciences Pharmingen
19.	GM-CSF-AF647	miš	83308	Novus Biologicals, Littleton, CO, SAD
20.	TGF- $\beta$ 1-AF647	miš	9016	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD
21.	CD40-FITC	hrčak	HM40-3	BD Biosciences Pharmingen
22.	CD86-biotin	miš	24F	BD Biosciences Pharmingen
23.	CD80-biotin	miš	3H5	BD Biosciences Pharmingen
24.	MHCII-PE	miš	HIS19	eBioscience

**Nekonjugovana primarna antitela**

1.	Tirozin-hidroksilaza	kunić	poliklonsko	EMD Millipore, Billerica, MA, SAD
2.	$\beta$ 2-AR	kunić	poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD

3.	$\alpha_{1B}$ -AR	koza	poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology
4.	CX3CR1	kunić	poliklonsko	Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
5.	IL-23	kunić	poliklonsko	Bioss Inc. Woburn, MA, SAD
6.	IL-1 $\beta$	kunić	poliklonsko	Novus Biologicals
7.	CCR7	kunić	poliklonsko	Abcam

#### Sekundarni reagensi

1.	Anti-kunić IgG–FITC	koza	poliklonsko	BD Biosciences Pharmingen
2.	Anti-kozje IgG–PE	magarac	poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology
3.	Anti-kunić IgG–PE	magarac	poliklonsko, F(ab') <sub>2</sub>	BD Biosciences Pharmingen
4.	Straptavidin–PerCP	–	–	BioLegend
5.	Straptavidin–PerCP cijanin 5.5	–	–	BioLegend

Skracenicе: FITC, fluorescein-izotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridinin hlorofil protein; AF647, aleksa fluor 647; PerCpPeF710, PerCP eFluor 710; APC, alofikocijanin.

U proceduri obeležavanja molekula korišćen je FACS (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*) pufer, sačinjen od PBS sa dodatkom 2% fetalnog telećeg seruma (engl. *fetal calf serum*; FCS; Gibco, New York, SAD) i 0.09% natrijum-azida (NaN<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Obeležavanje ćelija koje proliferišu vršeno je pomoću 7-aminoaktinomicina D (7-AAD; BD Biosciences Pharmingen), boje koja se vezuje za DNK.

Za ispitivanje produkcije/sekrecije citokina, mononuklearne ćelije su stimulisane pomoću forbol-12-miristat-13-acetata (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*; PMA) i jonomicina proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Za analizu ćelija protočnom citofluorimetrijom dodavan je i brefeldin A (eBioscience).

Za stimulaciju proliferacije CD4+ limfocita u kulturi mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora, korišćeni su mitogen, konkanavalin A (engl. *concanavalin A*; ConA) i neuroantigen, MBP iz mozga zamorčeta, nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

Za kultivaciju mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora korišćen je medijum RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute*), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). On je obogaćen dodavanjem 2 mM L-glutamina (Serva, Heidelberg, Nemačka), 1 mM natrijum-piruvata (Serva), rastvora penicilina (100 i.j./ml) i streptomicina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 50 µM β-merkaptotetanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) i 10% FCS. Kada su kulturama



ćelija dodavani i agonist/antagonisti AR, korišćen je kompletan RPMI-1640 medijum sa dodatkom 100  $\mu$ M askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

U procedurama merenja koncentracije noradrenalina korišćeni su etilen-glikol-tetrasirćetna kiselina (EGTA), perhlorna kiselina ( $\text{HClO}_4$ ), magnezijum-hlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) i DL-noradrenalin-hidrohlorid proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Pored toga, amonijum-formijat je nabavljen od proizvođača Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, SAD), metanska kiselina od firme Fluka Chemie AG (Buchs, Švajcarska), a metanol je proizveo J.T. Baker (Griesheim, Nemačka). Prečišćena voda je dobijena upotrebom BlueClear-RO600P sistema za reverznu osmozu (Euro-Clear Ltd., Gönyű, Mađarska).

Reagensi i neophodan potrošni materijal korišćeni prilikom ispitivanja ekspresije gena nabavljeni su od firme Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD), osim ukoliko nije navedeno drugačije. Za izolovanje ukupne ribonukleinske kiseline (RNK) iz uzoraka tkiva i mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora korišćen je Total RNA Chemistry Starter Kit. Ovaj komplet reagenasa uključuje rastvore za pranje (engl. *Wash Solution 1 i 2*), rastvor za ispiranje (engl. *Elution Solution*) i rastvor dezoksiribonukleaze (engl. *Absolute RNA Wash Solution*). Izolacija ukupne RNK iz tkiva i mononuklearnih ćelija kičmene moždine rađena je pomoću trizola (TRIzol™; Life Technologies-Thermo Fisher Scientific), reagensa za ekstrakciju nukleinskih kiseline i proteina iz različitih tipova uzoraka. Za sintezu komplementarne dezoksiribonukleinske kiseline (engl. *complementary DNA*; cDNK), korišćen je High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, sastavljen od pufera za reverznu transkripciju (engl. *10 $\times$  RT Buffer*), rastvora nukleotida (engl. *25 $\times$  dNTP Mix*) i nasumičnih prajmera (engl. *10 $\times$  RT Random Primers*), reverzne transkriptaze (engl. *Multiscribe Reverse Transcriptase*) i inhibitora aktivnosti ribonukleaze (RNAze) (engl. *RNAse inhibitor*). Kvantifikacija ekspresije gena metodom RT-qPCR vršena je pomoću smeše reagenasa za merenje ekspresije gena (engl. *TaqMan Gene Expression Master Mix*) i komercijalno dostupnih smeša prajmera i proba obeleženih fluorescentnim bojama za merenje ekspresije informacionih RNK (iRNK) pacova (engl. *TaqMan Gene Expression Assays*) prikazanih u Tabeli 2.

**Tabela 2. Eseji za merenje ekspresije iRNK korišćeni u RT-qPCR analizama**

	<b>Simbol</b>	<b>Naziv gena</b>	<b>Identifikacioni broj</b>
1.	<i>Rorc</i>	RAR-related orphan receptor C	Rn01261022_m1
2.	<i>Il1b</i>	interleukin 1 beta	Rn99999009_m1
3.	<i>Il23a</i>	interleukin 23, alpha subunit p19	Rn00590334_g1
4.	<i>Il2</i>	interleukin 2	Rn00587673_m1
5.	<i>Ccl2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	Rn00580555_m1
6.	<i>Ccl19</i>	chemokine (C-C motif) ligand 19	Rn01439563_m1
7.	<i>Ccl21</i>	chemokine (C-C motif) ligand 21	Rn01764651_g1
8.	<i>Cx3cl1</i>	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Rn00593186_m1

9.	<i>Adrb1</i>	adrenoceptor beta 1	Rn00824536_s1
10.	<i>Adrb2</i>	adrenoceptor beta 2	Rn00560650_s1
11.	<i>Il6</i>	interleukin 6	Rn99999011_m1
12.	<i>Hmox1</i>	heme oxygenase	Rn00561387_m1
13.	<i>Nfe2l2</i>	nuclear factor, erythroid 2-like 2	Rn00582415_m1
14.	<i>Stat3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	Rn00562562_m1
15.	<i>Socs3</i>	suppressor of cytokine signaling 3	Rn00585674_s1
16.	<i>Nos2</i>	nitric oxide synthase 2, inducible	Rn00561646_m1
17.	<i>Cybb</i>	cytochrome b-245, beta polypeptide; Nox2	Rn00576710_m1
18.	<i>Arg1</i>	arginase 1	Rn00691090_m1
19.	<i>Actb</i>	actin, beta	Rn00667869_m1

Za merenje koncentracije citokina u supernatantima ćelijskih kultura ELISA metodom, korišćeni su komercijalno dostupni kompleti za detekciju IL-17A (Biolegend) i IL-2 (R&D Systems). Za ispiranje bazena mikrotitracione ploče prilikom određivanja koncentracije IL-17A ELISA testom, korišćen je PBS sa dodatkom 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

### 3.5. Izolovanje mononuklearnih ćelija

#### 3.5.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija limfnih čvorova

Limfni čvorovi su macerirani i protiskivani kroz mrežicu sa porama veličine 60  $\mu\text{m}$ , pri čemu su tako dobijene ćelije spirane hladnim FACS puferom i nakon toga tri puta ispirane u istom rastvoru (350  $\times$  g, 5 min na +4  $^{\circ}\text{C}$ ). Vitalna boja tripan plavo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) korišćena je za brojanje živih ćelija pomoću poboljšanog Neubauerovog hemocitometra.

#### 3.5.2. Izolovanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Kičmene moždine su protiskivane kroz mrežice sa porama veličine 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, Erembodegem, Belgija), a tako dobijene ćelije spirane su hladnim RPMI-1640 medijumom sa 5% FCS, na ledu. Ćelijske suspenzije su centrifugirane (800  $\times$  g, 6 min na 4  $^{\circ}\text{C}$ ) i ispirane u RPMI-1640 medijumu sa 5% FCS (350  $\times$  g, 5 min na +4  $^{\circ}\text{C}$ ). Dobijeni talog ćelija je resuspendovan u 4 ml 40% perkola i naslojen na 2,5 ml 70% perkola, a zatim je centrifugiran na 1000  $\times$  g, 50 min na sobnoj temperaturi, bez kočnice pri zaustavljanju centrifuge. Mononuklearne ćelije izdvojene na interfazi gradijenata različite gustine pažljivo su prikupljane i dva puta ispirane korišćenjem RPMI-1640 medijuma sa 5% FCS (350  $\times$  g, 5 min na +4  $^{\circ}\text{C}$ ). Brojanje živih ćelija vršeno je pomoću poboljšanog Neubauerovog hemocitometra i vitalne boje tripan plavo.

### 3.5.3. Magnetno izdvajanje mijeloidnih CD11b+ ćelija kičmene moždine

Za izdvajanje populacije mijeloidnih ćelija, korišćena je magnetna separacija (engl. *magnetic-activated cell sorting*; MACS) mononuklearnih ćelija kičmene moždine na osnovu ekspresije CD11b površinskog molekula. U proceduri je korišćen MACS pufer koji sadrži PBS uz dodatak 2 mM etilen-diamin-tetrasirćetne kiseline (EDTA, Fluka Chemie AG) i 0.5% goveđeg serum albumina (engl. *bovine serum albumine*; BSA) (Fluka AG Chemie AG). Oprema i reagensi su nabavljeni od Miltenyi Biotec (Gladbach, Nemačka), ukoliko nije drugačije navedeno. Ćelije su obeležene monoklonskim anti-CD11b antitelom konjugovanim sa biotinom (Tabela 1), i nakon inkubacije i pranja dodavane su anti-biotin mikročestice (engl. *MicroBeads*). Ovako obeležene ćelije su nalivane na LS kolonu i izdvajana je pozitivna frakcija korišćenjem Quadro MACS separatora. Protočno-citofluorimetrijskom analizom je pokazano da su pozitivnu frakciju 90-95% činile CD11b+ ćelije, kao i da su ovu populaciju većinski sačinjavale ćelije mikroglije.

### 3.6. Određivanje koncentracije noradrenalina metodom HPLC

HPLC princip rada podrazumeva razdvajanje supstanci iz tečnih uzoraka njihovim prolaskom kroz kolonu u kojoj se nalazi medijum za razdvajanje (stacionarna faza), a uz pomoć mobilne faze, odnosno rastvarača koji pod pritiskom prolazi kroz sistem za hromatografsko razdvajanje, a u koji se dodaje uzorak. Komponente uzorka se različitim afinitetom adsorbuju na stacionarnu fazu, pa je njihovo vreme spiranja sa kolone pomoću mobilne faze karakteristično za svaku određenu supstancu. Nakon prolaska supstance kroz kolonu, tok mobilne faze je dovodi do detektora koji proizvodi promenu napona u funkciji vremena (hromatogram). Na osnovu signala detektora, korišćenjem odgovarajućeg standarda, moguće je identifikovati supstancu, kao i utvrditi njenu količinu u uzorku.

#### 3.6.1. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije noradrenalina

Uzorci ćelija drenirajućih limfnih čvorova ( $1 \times 10^7$ ) prikupljeni su u 300  $\mu$ l DEPROT rastvora, sačinjenog od 2% EGTA, 0,1N HClO<sub>4</sub> i 0,2% MgCl<sub>2</sub>. Uzorci tkiva drenirajućih limfnih čvorova i kičmene moždine zamrzavani su u tečnom azotu. Svi uzorci su čuvani na temperaturi od -70 °C do analize. Homogenizacija tkiva vršena je u DEPROT rastvoru, korišćenjem Ultra-Turrax homogenizera (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka), u odnosu 1 mg:20  $\mu$ l (kičmena moždina) ili 1 mg:40  $\mu$ l (drenirajući limfni čvor). Uzorci ćelija i homogenati tkiva su sonifikovani i centrifugirani (30 min, 18000 obrtaja/min, +4 °C) a dobijeni supernatanti prikupljeni za analizu.

#### 3.6.2. HPLC

Za analizu prikupljenih supernatana korišćen je Dionex UltiMate 3000 HPLC sistem (Thermo Scientific, Sunnyvale, SAD), sačinjen od jedinice za degasiranje, binarne pumpe, automatskog injektora, odeljka za kolonu i elektrohemijskog detektora sa radnom elektrodom od staklastog ugljenika. Sistem je bio opremljen Hibar 125-4 LiCrospher100 RP-18 (5  $\mu$ m) kolonom za hromatografiju (Merck Millipore, Darmstadt, Nemačka). Za kontrolu aparata, kao i prikupljanje i analizu podataka korišćen je kompjuterski program Chromeleon7 Chromatography Data System (Thermo Scientific).

Uslovi detekcije i merenja koncentracije noradrenalina definisani su prilikom optimizacije metode. Brzina protoka mobilne faze bila je 500  $\mu$ l/min, dok se njen sastav menjao tokom vremena trajanja analize (gradijentni režim rada): inicijalno, mobilna faza je sadržala 98% amonijum-formijatnog pufera (100 mM, pH 3,6) i 2% metanola, da bi se od 9. do 13. min udeo metanola povećao do 80% i održavao na tom nivou do 18. min, nakon čega je, do završetka merenja (25. min), učešće metanola u mobilnoj fazi smanjivano do inicijalne koncentracije (2%). Potencijal elektrohemijskih merenja bio je podešen na +850 mV a temperatura separacije na 25 °C.

Razblaženja standarda za noradrenalin (DL-noradrenalin-hidrochlorid) pravljena su u DEPROT rastvoru od početnog razblaženja (1mg/ml noradrenalina u metanolu) kako bi se dobili standardni rastvori koncentracija 25, 20, 8, 4, 2, 1 i 0,5 µg/ml, na osnovu kojih je konstruisana standardna kriva za kvantifikaciju koncentracije noradrenalina u uzorcima. Uzorci i standardni rastvori unošeni su u sistem pomoću automatskog injektora u zapremini od 20 µl. Koncentracija noradrenalina u tkivu izražena je u odnosu na masu tkiva (ng/mg tkiva), a sadržaj noradrenalina u ćelijama u odnosu njihov broj (ng/10<sup>7</sup> ćelija).

### 3.7. Kulture ćelija

#### 3.7.1. Stimulacija ćelija drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine za ispitivanje produkcije citokina

Za analizu produkcije citokina, mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora i kičmene moždine stimulirane su sa 200 ng/ml PMA i 400 ng/ml jonomicina. Ukoliko su ćelije analizirane protočnom citofluorimetrijom, dodavano je 3 µg/ml brefeldina A, u cilju blokade transporta proteina u Goldžijev kompleks, kako bi sintetisani citokini ostali u citoplazmi i bili efikasnije detektovani. Ćelije (10<sup>6</sup>/ml) su inkubirane četiri sata na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, u kompletnom RPMI-1640 medijumu.

Nakon inkubacije, ćelije su staložene centrifugiranjem i prikupljani su supernatanti za analizu koncentracije citokina ELISA metodom iz kultura bez brefeldina A. Ćelije kojima je dodavan brefeldin A dva puta su ispirane u hladnom FACS puferu (350 × g, 5 min na +4 °C), čime su pripremane za unutarćelijsko bojenje citokina i analizu metodom protočne citofluorimetrije.

#### 3.7.2. Ispitivanje efekata agonista i/ili antagonista AR u kulturi mononuklearnih ćelija drenirajućeg limfnog čvora

Za ispitivanje efekta agonista i/ili antagonista AR na proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita, produkciju/sekreciju citokina i ekspresiju gena u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova, ćelije su kultivisane (2×10<sup>5</sup>/200µl/ bazenu) u prisustvu ili odsustvu mitogena (2.5 µg/ml ConA) ili neuroantigena (20 µg/ml MBP), u kompletnom RPMI-1640 medijumu sa dodatkom 100 µM askorbinske kiseline, 72 sata na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Korišćene su ploče sa 96 bazena i "U" dnom (Nunc, Thermo Fisher Scientific).

Pre stimulacije mitogenom ili neuroantigenom, ćelije su izlagane dejstvu 10<sup>-6</sup> M agonista AR, arterenola [engl. (±)-noradrenaline(+)-bitartrate salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH] u prisustvu ili odsustvu 10<sup>-5</sup> M antagonista β-AR propranolola, ili 10<sup>-5</sup> M antagonista α<sub>1</sub>-AR prazosina (engl. prazosin hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Koncentracija arterenola je izabrana s obzirom na to da je pokazano da je koncentracija noradrenalina u bliskom okruženju limfocita u sekundarnim limfnim organima reda veličine 0,3-3mM (Felten i sar., 1986), kao i da su za izazivanje funkcijskih promena u imunskim ćelijama *in vitro* potrebne suprafiziološke koncentracije (≥10<sup>-6</sup> M) noradrenalina (Padro i Sanders, 2014). Arterenol je dodavan u medijum 1h, a antagonisti AR (propranolol ili prazosin) 15 min pre stimulacije sa ConA ili MBP. Kada su bili prisutni u kombinaciji, propranolol je stavljan 15 min pre arterenola. Ćelije kultivisane u odsustvu ili gajene u prisustvu ConA ili MBP, bez prethodnog tretmana, služile su kao kontrole.

Dodatno, za ispitivanje specifičnosti delovanja propranolola u kulturi posredstvom β-AR, ćelije su 1h pre dodavanja ConA, u odsustvu ili prisustvu propranolola, tretirane sa 10<sup>-5</sup> M alfa-metil-DL-tirozina (engl. alpha-methyl-dl-tyrosine, AMPT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), inhibitora sinteze kateholamina.

Nakon kultivacije, ćelije su taložene centrifugiranjem (350 × g, 5 min na +4 °C), a supernatanti su sakupljani radi određivanja koncentracije citokina u njima, i čuvani na -70 °C do

analize ELISA metodom. Čelije su ispirane dva puta u hladnom FACS puferu ( $350 \times g$ , 5 min na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i prikupljane za analizu ekspresije gena RT-qPCR metodom, analizu proliferacije pomoću 7-AAD, ili su restimulisane za analizu produkcije citokina kao što je opisano u odeljku 3.7.1.

### **3.8. Analiza kapaciteta za fagocitozu/endocitozu**

#### **3.8.1. Ispitivanje fagocitoze čestica lateksa**

Za ispitivanje sposobnosti ćelija mikroglije za fagocitozu, korišćene su žutozelene fluorescentne čestice lateksa (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) prečnika  $1 \mu\text{m}$ , pre upotrebe sonifikovane u ultrazvučnom kupatilu (2 min, sobna temperatura). Mononuklearne ćelije kičmene moždine su u odnosu 1 ćelija:50 čestica inkubirane 1h na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  u kompletnom RPMI-1640 medijumu sa 5% FCS. Fagocitoza je prekidana stavljanjem ćelija na led 5-10 min, a kao kontrole korišćene su ćelije inkubirane sa česticama lateksa na temperaturi od  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon pranja ćelija hladnim PBS, obeležavani su membranski molekuli, a dobijeni uzorci su potom analizirani protočnom citofluorimetrijom.

#### **3.8.2. Analiza endocitoze dekstrana**

Za ispitivanje sposobnosti ćelija mikroglije za endocitozu, mononuklearne ćelije kičmene moždine u kompletnom RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 5% FCS ( $10^6$  ćelija/ml) inkubirane su 90 min na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sa FITC-konjugovanim dekstranom (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Kontrolni uzorci su inkubirani na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Endocitoza je prekidana dodavanjem hladnog FACS pufera, nakon čega su ćelije dva puta ispirane radi otklanjanja viška dekstrana. Nakon obeležavanja membranskih molekula, ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom.

### **3.9. Test za ispitivanje migracije antigen-prezentujućih ćelija**

Za praćenje migracije antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove, korišćen je test zasnovan na obeležavanju ovih ćelija pomoću 5(6)-karboksifluorescein-diacetat-sukcinimidil estra (engl. 5-[and-6]-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CFSE, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (Bollampalli i sar., 2016). CFSE pasivno difunduje u ćelije, i po ulasku formira intracelularne aminske fluorescentne konjugate koji su stabilni u ćeliji (Parish i sar., 2009). Za test migracije, CFSE ( $50 \mu\text{l}$ , 0,5 mM) ubrizgava se *in situ*, u imunizovanu šapu životinja u induktivnoj fazi EAE, jedan dan pre žrtvovanja (6. d.p.i). Dan kasnije (7. d.p.i.), u drenirajućim limfnim čvorovima se mogu identifikovati ćelije koje sadrže CFSE, tj. one koje su migrirale sa mesta imunizacije. Protočnom citofluorimetrijom je ispitivan procenat ćelija obeleženih CFSE koje na svojoj površini paralelno ispoljavaju CD11b i CD86 molekule.

### **3.10. Protočna citofluorimetrija**

#### **3.10.1. Priprema uzoraka za ispitivanje ekspresije membranskih molekula**

Mononuklearne ćelije drenirajućih limfnih čvorova/kičmene moždine u FACS puferu ( $1-5 \times 10^5$  ćelija/uzorku) su taložene centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 min,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i na talog su dodavana odgovarajuća antitela. Uzorci su inkubirani 30 min, u mraku, na temperaturi od  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ukoliko su antitela bila direktno obeležena fluorohromima, uzorci su pripremani za analizu unutarćelijskih molekula ili analizirani protočnim citofluorimetrom. Ukoliko su antitela bila nekonjugovana ili obeležena biotinom, uzorci su nakon inkubacije dva puta ispirani ( $350 \times g$ , 5 min,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u FACS puferu, pa zatim inkubirani (30 min, u mraku,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa odgovarajućim sekundarnim reagensima. Pre analize protočnim citofluorimetrom, ćelije su oprane centrifugiranjem ( $350 \times g$ , 5 min,  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) dva puta u FACS puferu i jednom u PBS sa 0,09%  $\text{NaN}_3$ , u kome su i resuspendovane za analizu.

### **3.10.2. Priprema uzoraka za ispitivanje ekspresije unutarćelijskih molekula**

Za analizu unutarćelijskih molekula, nakon obeležavanja površinskih markera (opisano u odeljku 3.10.1.), ćelije su fiksirane i permeabilizovane im je membrana upotrebom Fix/Perm pufera iz komercijalnog kompleta (eBioscience), preko noći na temperaturi od +4 °C. Posle dva pranja sa puferom za permeabilizaciju iz navedenog komercijalnog kompleta (350 × g, 5 min), uzorci su inkubirani sa odgovarajućim antitelom 30 min u mraku (na sobnoj temperaturi, osim za anti-Foxp3 antitelo, koje je inkubirano na +4 °C). Nakon toga, ćelije su ponovo ispirane dva puta istim puferom, i resuspendovane u PBS sa 0,09% NaN<sub>3</sub> za analizu metodom protočne citofluorimetrije. Ukoliko je u prvom koraku korišćeno nekonjugovano antitelo, nakon pranja su ćelije inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima koja su obeležena fluorohromom (30 min, u mraku, sobna temperatura), i potom pripremane za analizu kao što je opisano.

### **3.10.3. Priprema uzoraka za analizu proliferacije CD4+ limfocita u kulturi**

Za analizu proliferišućih CD4+ limfocita, odnosno onih u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, korišćena je DNK-vezujuća boja 7AAD (BD Biosciences Pharmingen). Nakon 72 h kultivacije i pranja (opisano u odeljku 3.7.2.), ćelije drenirajućih limfnih čvorova su inkubirane sa anti-CD4 antitelom, kao što je opisano u odeljku 3.10.1. Nakon dva pranja (350 × g, 5 min, +4 °C), na talog ćelija je dodavano 150 µl rastvora 50% FCS u PBS sa 0,09% NaN<sub>3</sub>. Fiksiranje ćelija i permeabilizovanje njihovih membrane postignuto je postepenim dodavanjem 450 µl hladnog 70% rastvora etanola (Alkaloid, Skoplje, Makedonija) i inkubacijom preko noći na +4 °C. Nakon dva pranja, ćelije su resuspendovane u 300 µl PBS sa 0,09% NaN<sub>3</sub> i inkubirane sa 10 µl 7-AAD u mraku, 30 min na +4 °C. Uzorci su zatim analizirani protočnom citofluorimetrijom. Ćelijski agregati su isključeni iz analize na osnovu širine i površine 7-AAD fluorescentnog signala, a pomoću modula za razlikovanje agregata ćelija (engl. *doublet discrimination module*; DDM). Frekvencija proliferišućih ćelija određivana je upotrebom *Dean-Jett-Fox* modela platforme za analizu ćelijskog ciklusa kompjuterskog programa FlowJo software v.7.8 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, SAD).

### **3.10.4. Analiza uzoraka protočnom citofluorimetrijom**

Za analizu uzoraka u ovoj studiji korišćeni su analogni FACSCalibur i digitalni FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) protočni citofluorimetri. Oni kao izvore svetlosti poseduju argonski jonski laser talasne dužine 488 nm, kao i diodni laser talasne dužine 635 nm, što omogućava istovremenu analizu većeg broja molekula (do četiri u ovoj studiji) obeleženih fluorohromima čiji se emisijski spektri međusobno ne preklapaju.

Princip rada protočnih citometara zaniva se na prolasku ćelija kroz laserski snop, prilikom čega detektori beleže prednje (engl. *forward scatter channel*; FSC) i bočno rasipanje svetlosti (engl. *side scatter channel*; SSC). FSC pruža informaciju o veličini ćelije, dok SSC govori o granuliranosti ćelija, odnosno njihovoj unutrašnjoj strukturi. Svetlosnim snopom odgovarajućeg lasera pobuđuju se i fluorohromi kojima su obeležene ćelije, i na osnovu emitovane fluorescencije dobijaju se podaci o zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju ispitivane molekule, kao i o gustini njihove ekspresije.

Za prikupljanje podataka na FACSCalibur citometru korišćen je CellQuest™ softver (BD Biosciences), a za FACSVerse prateći FACSuite™ softver (BD Biosciences). U poređnom analizom više uzoraka na ova dva citometra, pokazano je da su dobijeni rezultati uporedivi. Iz svakog uzorka je učitavano 50 000 ćelija, a dobijeni podaci su analizirani upotrebom kompjuterskog programa FlowJo software v.7.8. Mrtve ćelije i ćelijski otpad isključeni su iz analize, prema njihovim FSC i SSC karakteristikama. Pored utvrđivanja procenta ćelija pozitivnih za određeni marker, za neke od markera analiza je uključivala i merenje srednjeg intenziteta fluorescence (engl. *mean fluorescence*

*intensity*; MFI) koju emituju fluorohromi vezani za antitelo određene specifičnosti. Na osnovu vrednosti MFI vrši se procena gustine ekspresije membranskih ili unutarćelijskih molekula (Kamath i sar., 1998). MFI vrednost izražena je kao MFI odnos (MFI ćelija obeleženih antitelom/MFI kontrolnih, neobeleženih ćelija) (Reguzzoni i sar., 2002).

Pri korišćenju sekundarnih antitela/reagenasa postojale su odgovarajuće kontrole bojenja u kojima je izostavljeno primarno antitelo, radi isključivanja nespecifičnog vezivanja sekundarnih reagenasa. Kod višekolornih bojenja korišćene su FMO (engl. *fluorescence minus one*) kontrole, uzorci koji su obeleženi svim antitelima upotrebljenim za dato bojenje, osim jednog koje je od interesa. Tako se dobija uvid u eventualno prelivanje fluorescencije iz drugih kanala u kanal od interesa, što omogućava adekvatno postavljanje granice za selekciju ćelija obeleženih fluorohromom (Roederer, 2002).

### **3.11. Određivanje koncentracije citokina ELISA metodom**

Koncentracije citokina ispitivane su metodom ELISA u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova (IL-17A i IL-2). Ćelije su bile stimulisane na načine opisane u sekcijama 3.7.1. i 3.7.2. Izdvojeni supernatanti su čuvani na temperaturi od -70 °C do analize. U svim ELISA procedurama korišćene su komponente iz komercijalno dostupnih kompleta, prema uputstvu proizvođača, a uzorci i standardi su testirani u duplikatu.

Svi korišćeni testovi su zasnovani na kvantitativnoj sendvič ELISA tehnici. Antitelo specifično za ispitivani citokin vezano je za bazene ploče, i za njega se vezuje citokin iz standardnih rastvora i uzoraka. Zatim se dodaje antitelo specifično za ispitivani citokin koje je ili direktno konjugovano peroksidazom rena, ili je obeleženo biotinom za koji se naknadno vezuje peroksidaza rena konjugovana avidinom/streptavidinom. Ime same tehnike potiče od toga što se na ovaj način ispitivani citokin nalazi “u sendviču” između antitela koje ga vezuje za bazen ploče i onog koje omogućava njegovu detekciju pomoću bojene enzimske reakcije. Na kraju se dodaje supstrat za peroksidazu koji reakcijom sa enzimom daje bojeni proizvod. Intenzitet boje je proporcionalan količini prisutnog citokina u standardnim rastvorima i uzorcima, i njegova koncentracija se određuje pomoću standardne krive.

#### **3.11.1. Određivanje koncentracije IL-17A**

Antitelom koje specifično prepoznaje IL-17A pacova (u preporučenom razblaženju, 1:200), jedan dan pre izvođenja testa, obloženi su potrebni bazeni ploče sa 96 bazena i preko noći inkubirani na temperaturi +4 °C. Sutradan su bazeni isprani četiri puta puferom za ispiranje. Potom je u bazene dodavan rastvarač za standard, u cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja i smanjenja nespecifičnog signala, i ploča je inkubirana 1h na sobnoj temperaturi, uz mešanje (orbitalna mešalica, 500 obrtaja/min). Nakon inkubacije i četiri ispiranja, u odgovarajuće bazene su dodavani rastvori standarda za IL-17A pacova i uzorci. Korišćeno je sedam različitih, dvostruko opadajućih koncentracija standarda, počev od 1000 pg/ml, a komercijalni rastvarač za standard i uzorke predstavljao je nultu koncentraciju. Posle 2h inkubacije na sobnoj temperaturi, uz mešanje, bazeni su ispirani, pa je usledila inkubacija u istim uslovima sa anti-IL-17A antitelom za detekciju konjugovanim biotinom. Potom je u isprane bazene dodavana peroksidaza rena konjugovana avidinom (engl. *avidin-horseradish peroxidase*; avidin-HRP), koji se visokim afinitetom vezuje za biotin. Nakon 30 min, u isprane bazene je dodavan rastvor supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB), koji se dejstvom peroksidaze transformiše u bojeni produkt. Boja se razvijala 15 min u mraku, nakon čega je reakcija prekidana dodavanjem rastvora za zaustavljanje reakcije (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Korišćenjem spektrofotometra (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 450 nm. Metodom linearne regresije računata je koncentracija citokina u

uzorku, u odnosu na standardnu krivu konstruisanu korišćenjem rastvora standarda poznatih koncentracija. U ovom testu najmanja detektabilna koncentracija IL-17A iznosi 8 pg/ml.

### **3.11.2. Određivanje koncentracije IL-2**

U bazene obložene poliklonskim antitelom specifičnim za IL-2 pacova, dodavan je rastvarač za standarde i uzorke i, nakon toga, ista zapremina rastvora standarda IL-2 pacova ili uzoraka. Ploča je inkubirana 2h na sobnoj temperaturi, posle čega je pet puta isprana puferom za ispiranje. Inkubacija sa poliklonskim antitelom specifičnim za IL-2 pacova konjugovanim peroksidazom rena trajala je 2h na sobnoj temperaturi, a potom su bazeni ponovo ispirani. Rastvor supstrata ( $H_2O_2$  + TMB) inkubiran je 30 min u mraku, na sobnoj temperaturi, kada je bazenima dodavan rastvor za zaustavljanje reakcije (razblažen rastvor HCl). Apsorbancija je merena spektrofotometrom, na talasnoj dužini od 450 nm, a koncentracija IL-2 u uzorcima je računata upotrebom standardne krive konstruisane pomoću poznatih, dvostruko opadajućih koncentracija standardnih rastvora. Najveća koncentracija standarda bila je 2000 pg/ml. Minimalne koncentracije IL-2 koje se mogu detektovati ovim testom u ispitivanim uzorcima su manje od 15 pg/ml.

### **3.12. Ispitivanje ekspresije gena metodom RT-qPCR**

Za ispitivanje ekspresije gena u tkivu i ćelijama drenirajućeg limfnog čvora/kičmene moždine, pripremljenih na način opisan u odeljcima 3.5.1., 3.5.2. i 3.5.3. korišćena je tehnika RT-qPCR. U pitanju je modifikacija klasične lančane reakcije polimeraze koja je omogućena razvojem oligonukleotidnih proba, obeleženih fluorescentnim bojama, koje se specifično vezuju za sekvencu od interesa. Dok je proba kompletna, fluorescenciju koju emituje boja vezana za njen 5' kraj (engl. *reporter*) apsorbuje blisko smeštena boja na 3' kraju (engl. *quencher*). Tokom PCR reakcije, proba se degradira, obeleživači se razdvajaju, a fluorescencija koju emituje boja sa 5' kraja probe se povećava. U svakom ciklusu oslobađaju se novi molekuli boje, a intenzitet oslobođenog signala proporcionalan je količini proizvoda reakcije koji je nastao. U reakciji lančanog umnožavanja, produkcija kopija DNK matrice odvija se eksponencijalno, tako da postoji kvantitativni odnos između polazne količine sekvence od interesa i količine proizvoda reakcije u svakom njenom ciklusu. Na ovaj način moguće je umnožiti i detektovati čak i jednu kopiju sekvence od interesa. Međutim, usled prisustva inhibitora reakcije, trošenja reagenasa i nakupljanja molekula pirofosfata, eksponencijalno odvijanje reakcije u jednom trenutku se prekida (faza „platoa“), što kvantifikaciju proizvoda reakcije u njenoj krajnjoj tački čini nepouzdanom. Stoga, merenje količine produkata reakcije tokom njihove akumulacije omogućava kvantifikaciju u eksponencijalnoj fazi, čime se uklanja varijabilnost koja karakteriše konvencionalni PCR (Arya i sar., 2005).

U proceduri su korišćeni komercijalni reagensi, precizno navedeni u odeljku 3.4.

#### **3.12.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva i mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova**

Uzorci tkiva (~20 mg) drenirajućeg limfnog čvora zamrzavani su u 1 ml dva puta koncentrovanog rastvora za prečišćavanje nukleinskih kiselina (2× Nucleic Acid Purification Lysis Solution) i čuvani do analize na -70 °C. Za izolaciju ukupne RNK, uzorci su odmrzavani, rastvor za prečišćavanje nukleinskih kiselina u kojem su čuvani je podešavan na radnu koncentraciju (1×) dodavanjem 1 ml PBS, a tkivo je ručno homogenizovano. Homogenati tkiva su pre izolacije ukupne RNK podvrgnuti postupku prefiltracije korišćenjem aparata ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems), u cilju smanjenja viskoznosti i uklanjanja krupnijih nečistoća iz uzoraka. Mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora ( $1 \times 10^5$ ) lizirane su u 200  $\mu$ l 1× rastvora za prečišćavanje nukleinskih kiselina, a uzorci su do analize čuvani na -70 °C.



Za izolaciju ukupne RNK, prečišćene od proteina, nukleaza i drugih nečistoća, korišćen je aparat ABI Prism 6100 sa pripadajućim kompletom reagenasa (Total RNA Chemistry Starter Kit) prema uputstvima proizvođača.

### **3.12.2. Izolacija ukupne RNK iz tkiva i mononuklearnih ćelija kičmene moždine**

Uzorci tkiva (~20 mg) kičmene moždine trenutno su zamrzavani u tečnom azotu, dok su CD11b+ mononuklearne ćelije kičmene moždine ( $1 \times 10^5$ ) sakupljane u 500  $\mu$ l trizol reagensa. Svi uzorci su skladišteni na  $-70$  °C do prečišćavanja RNK. Za izolaciju RNK, uzorci su odmrzavani, a ćelije u trizolu su zatim lizirane tako što su nekoliko puta uvučene i izbačene iz nastavka automatske pipete, dok su uzorci tkiva ručno homogenizovani. Koncentracija i čistoća ukupne RNK izolovane iz uzoraka određivane su analizom na spektrofotometru (Orion™ AquaMate 8000, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). RNK izolovana iz ćelija je razblažena u odnosu 1:3, a RNK izolovana iz tkiva u odnosu 1:20 u vodi za primenu u molekularnoj biologiji (bez kontaminacije nukleazama, nukleotidima, nukleinskim kiselinama), a zatim su merene apsorbancije uzoraka na talasnim dužinama od 260 nm (određuje sadržaj nukleinskih kiselina) i 280 nm (određuje čistoću uzorka). Na osnovu apsorbancije na talasnoj dužini od 260 nm određivana je koncentracija RNK ( $\mu$ g/ml) u uzorku prema formuli:  $A_{260} \times \text{razblaženje} \times 40$ . Na osnovu odnosa  $A_{260}/A_{280}$  procenjuje se čistoća RNK; u svim uzorcima odnos  $A_{260}/A_{280}$  bio je između 1,8 i 2,0, što se smatra čistim.

### **3.12.3. Prevođenje ukupne RNK u cDNK**

Nakon izolacije ukupne RNK, reverznom transkripcijom je sintetisana cDNK prema uputstvima proizvođača, korišćenjem rastvora iz High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a. Reakcionu smešu je činilo 10  $\mu$ l prečišćene RNK, 2  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju, 0,8  $\mu$ l mešavine nukleotida (100 mM), 2  $\mu$ l smeše nasumičnih prajmera, 1  $\mu$ l reverzne transkriptaze (50 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l inhibitora RNaze (20 U/ $\mu$ l) i 3,2  $\mu$ l vode za primenu u molekularnoj biologiji. Reverzna transkripcija je vršena pod uslovima koje preporučuje proizvođač: 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C i 5 s na 85 °C, upotrebom aparata Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR u pripadajućim reakcionim mikrotubama (MicroAmp Optical 8-Tube Strip). Dobijena cDNK korišćena je za kvantifikaciju genske ekspresije RT-qPCR metodom, i to u koncentrovanom obliku za uzorke drenirajućeg limfnog čvora, odnosno razblažena 1:4 za uzorke kičmene moždine.

### **3.12.4. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu**

Sve PCR reakcije za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije su rađene na aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, korišćenjem reagenasa detaljnije opisanih u odeljku 3.4. Reakcionu smešu je činilo 5  $\mu$ l cDNK, 12,5  $\mu$ l smeše reagenasa za merenje ekspresije gena ( $2 \times$  TaqMan Gene Expression Master Mix), 1,25  $\mu$ l smeše oligonukleotidnih prajmera i probe ( $20 \times$  TaqMan Gene Expression Assay) i 6,25  $\mu$ l vode za primenu u molekularnoj biologiji, u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ l. Reakcije u triplikatu izvedene su u odgovarajućim mikrotubama (MicroAmp Optical 8-Tube Strip) ili pločama sa 96 bazena (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate). Uslovi PCR reakcije, prema uputstvu proizvođača, podrazumevali su inkubaciju reakcione smeše 2 min na 50 °C, 10 min na 95 °C i zatim 40 ciklusa umnožavanja sa inkubacijama od 15 sekundi na 95 °C i jednog min na 60 °C.

Kao referentni gen, korišćen je  $\beta$ -aktin, s obzirom na stabilnost njegove ekspresije u svim eksperimentalnim grupama i različitim eksperimentalnim uslovima. U odnosu na njega, "normalizovane" su vrednosti ekspresije svih ispitivnih gena, kako bi se umanjila mogućnost grešaka koje mogu nastati kao posledica malih razlika u početnim količinama RNK i njenom kvalitetu, odnosno u efikasnosti sinteze cDNK i umnožavanja u PCR reakciji. Kvantifikacija genske

ekspresije rađena je u eksponencijalnoj fazi na osnovu broja ciklusa (engl. *threshold cycle*; Ct) u kojem je fluorescentni signal prešao arbitrarnu granicu (engl. *threshold*); signal koji je registrovan iznad ove granice smatra se ispravnim i može se koristiti za definisanje vrednosti Ct. Kompjuterski program SDS software v.1.4.0. korišćen je za automatsko izračunavanje srednjih vrednosti Ct, dobijenih iz triplikata, za svaki od ispitivanih gena. Relativne vrednosti ekspresije gena od interesa računane su prema formuli  $2^{-dCt}$ , pri čemu je  $dCt = Ct$  gena od interesa – Ct referentnog gena. Odnos ekspresije gena za inducibilnu sintazu azot-monoksida (iNOS) i arginazu 1 (Arg1) je računat kao:  $2^{-dCt} \text{iNOS} / 2^{-dCt} \text{Arg1}$  (Brown i sar., 2009).

### 3.13. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rađena je pomoću GraphPad Prism softvera 5 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, SAD). Polne razlike u ekspresiji tirozin-hidroksilaze i AR u CD4+ T-limfocitima i CD11b+ ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ispitivane su upotrebom Studentovog t-testa. Za testiranje uticaja pola i bolesti/tretmana/uslova kultivacije na ispitivane parametre, korišćena je metoda dvofaktorske analize varijanse (engl. *2-way analysis of variance*; ANOVA), nakon čega je za *post hoc* poređenje primenjen Bonferronijev test (engl. *Bonferroni test*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (engl. *standard error of the mean*; SEM), a vrednost  $p \leq 0.05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na razvoj bolesti kod ženki i mužjaka pacova

Prvi deo studije je osmišljen na osnovu podataka o polnim razlikama uočenim u aktivnosti SNS (Hinojosa-Laborde i sar., 1999), gustini simpatičkih nervnih vlakana u sekundarnim limfnim organima (ThyagaRajan i sar., 2011), i sintezi noradrenalina u imunskim ćelijama (Leposavić i sar., 2011). Osim toga, uočen je polni dimorfizam u gustini ekspresije  $\beta$ -AR na imunskim ćelijama (Leposavić i sar., 2011) i, posebno značajno, imunskim efektima njihove aktivacije (de Coupade i sar., 2004; de Coupade i sar., 2007). Ispitano je da li se polne razlike u neurološkoj prezentaciji EAE indukovanoj aktivnom imunizacijom (Nacka-Aleksić i sar., 2015) mogu povezati sa polnim razlikama u imunomodulatornom delovanju noradrenalina, posredstvom  $\beta$ -AR, na primarni (auto)imunski odgovor na antigen.

#### 4.1.1. Tretman propranololom je efikasniji u ublažavanju bolesti kod mužjaka nego kod ženki pacova

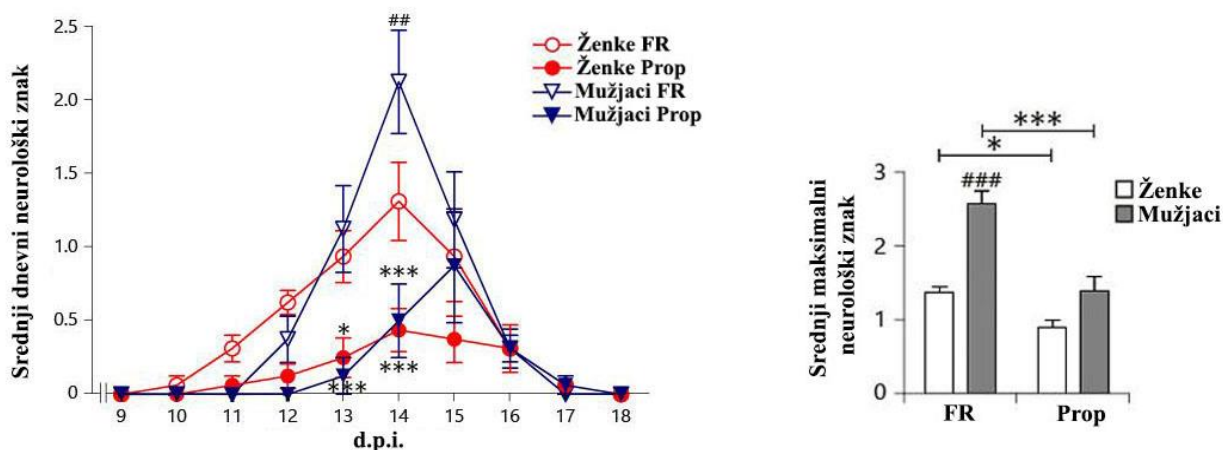
Pacovi koji su primali propranolol od dana indukcije EAE do 7. d.p.i. EAE, kao i oni kod kojih je primenjivan fiziološki rastvor (kontrolne životinje) razvili su akutni, monofazni oblik bolesti. Tretman propranololom je smanjio incidencu pojave bolesti kod EAE ženki i kod mužjaka, u odnosu na kontrolne EAE životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Tabela 3). Osim toga, primena propranolola dovela je i do značajnog odlaganja početka bolesti i kod ženki ( $p < 0,05$ ) i kod mužjaka ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3, Slika 1). Prve neurološke znake EAE mužjaci tretirani fiziološkim rastvorom ( $p < 0,05$ ), kao i oni tretirani propranololom ( $p < 0,01$ ), ispoljili su kasnije od ženki (Tabela 3, Slika 1).

**Tabela 3. Tretman ženki i mužjaka pacova propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE smanjuje incidencu i odlaže početak bolesti**

		Incidenca <sup>a</sup>	Početak bolesti <sup>b</sup> (d.p.i.)
FR	Ženke	8/8	11,0 ± 0,19
	Mušjaci	7/8	12,2 ± 0,31 #
Prop	Ženke	5/8	12,0 ± 0,32 *
	Mušjaci	5/8	14,0 ± 0,63 ##.**

<sup>a</sup> Broj obolelih/broj imunizovanih DA pacova u grupi; <sup>b</sup> Dan posle indukcije (d.p.i.) EAE kada su ispoljeni prvi neurološki znaci bolesti. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM (n = 5-8). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  tretman (Propranolol) u poređenju sa kontrolama (Fiziološki Rastvor) istog pola; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Daljim praćenjem toka bolesti, primećeno je da propranolol dovodi i do značajnog smanjenja maksimalnog neurološkog znaka (zbir najvećih neuroloških znaka EAE svakog pacova u eksperimentalnoj grupi/broj pacova sa neurološkim znacima bolesti u grupi) kod životinja oba pola ( $p < 0,05$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mužjaka) (Slika 1). Statistički značajne polne razlike u vrednostima maksimalnog neurološkog znaka, koje su postojale kod kontrolnih EAE životinja, nisu uočene kod EAE pacova kod kojih je primenjivan propranolol (Slika 1).

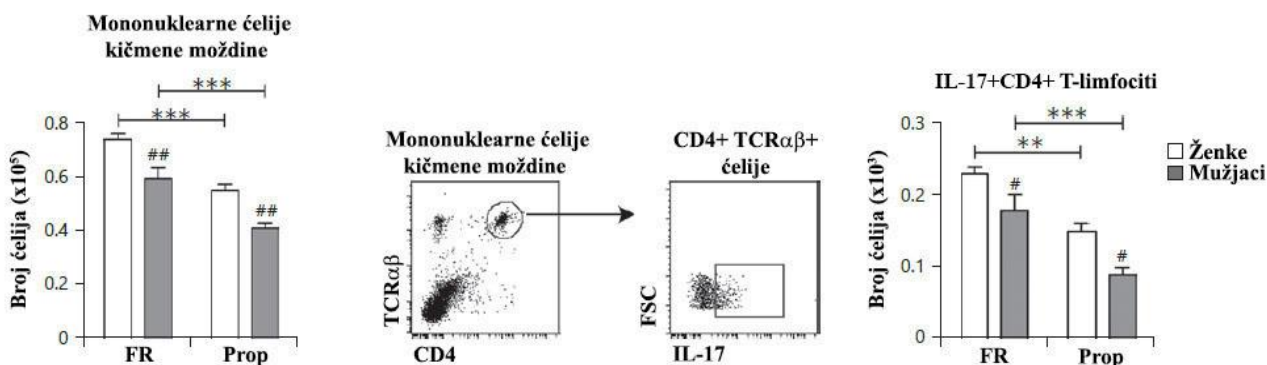


**Slika 1. Tretman ženki i mušjaka pacova propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE odlaže početak i smanjuje težinu bolesti.**

Linijski dijagram predstavlja srednji dnevni neurološki znak EAE ženki i mušjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) tokom 7 dana od dana indukcije EAE. Histogram označava srednju vrednost maksimalnog neurološkog znaka. Podaci su na linijskom dijagramu predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ), a na histogramu kao srednja vrednost + SEM ( $n = 5-8$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  tretman u poređenju sa kontrolama istog pola; ##  $p \leq 0,01$ , ###  $p \leq 0,001$  mušjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

**4.1.2. Tretman propranololom smanjuje veličinu mononuklearnog infiltrata u kičmenoj moždini pacova oba pola u induktivnoj fazi bolesti, uključujući i sadržaj IL-17+CD4+ T-limfocita u tom infiltratu**

Imajući u vidu da razvoj bolesti korelira sa intenzitetom infiltracije mononuklearnih ćelija u kičmenu moždinu (Nacka-Aleksić i sar., 2015), određivan je ukupan broj mononuklearnih ćelija u kičmenoj moždini, uključujući i broj IL-17+CD4+ (Th17) limfocita. Iz kičmene moždine izolovane u induktivnoj fazi EAE (7. d.p.i.) izdvojen je manji ( $p < 0,001$ ) broj mononuklearnih ćelija kod EAE životinja oba pola tretiranih propranololom u odnosu na kontrolne EAE životinje tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 2). Takođe je nađeno da tretman propranololom smanjuje ( $p < 0,01$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mušjaka) broj Th17 limfocita u kičmenoj moždini životinja oba pola (Slika 2). Broj svih mononuklearnih ćelija ( $p < 0,01$ ), kao i Th17 limfocita ( $p < 0,05$ ), bio je manji kod mušjaka nego kod ženki pacova, nezavisno od toga da li je primenjivan propranolol ili fiziološki rastvor (Slika 2).



## Slika 2. Tretman ženki i mužjaka pacova propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE smanjuje broj mononuklearnih ćelija i Th17 limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu.

Histogrami prikazuju (levo) broj mononuklearnih ćelija i (desno) broj Th17 limfocita u okviru mononuklearnih ćelija izdvojenih 7. d.p.i. EAE iz kičmene moždine ženki i mužjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profil (desno) prikazuje strategiju izdvajanja Th17 limfocita u okviru CD4+TCR $\alpha\beta$ + ćelija izdvojenih kao što je prikazano na levom tačkastom profilu. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\* p  $\leq$  0,001; # p  $\leq$  0,05, ## p  $\leq$  0,01 mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

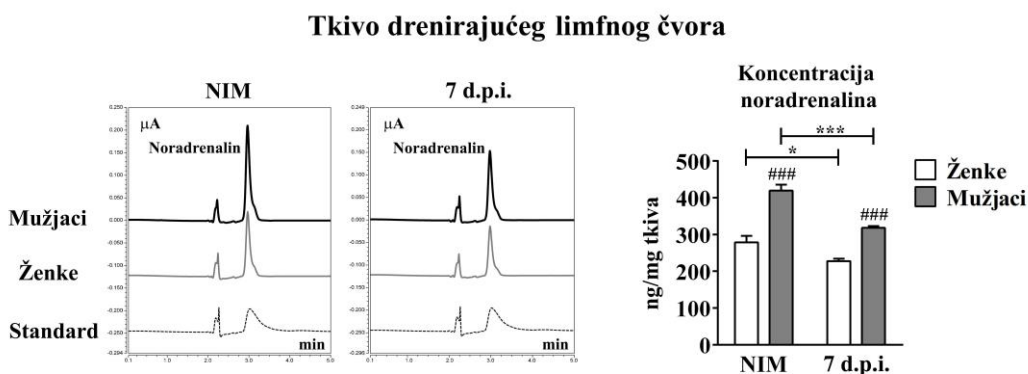
## 4.2. Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na (auto)imunski odgovor u drenirajućim limfnim čvorovima ženki i mužjaka pacova u induktivnoj fazi bolesti

Ispoljavanje znaka autoimunske bolesti kritično zavisi od intenziteta primarnog autoimuskog odgovora, koji je određen brojem antigen-prezentujućih ćelija koje translociraju autoantigen u sekundarne limfne organe (Ludewig i sar., 2001). Sledstveno, ispitivan je uticaj tretmana propranololom na migraciju antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove i, nakon toga, zastupljenost ovih ćelija i njihov aktivacioni status. U prvom koraku ispitane su moguće promene u koncentracijama noradrenalina u tkivu i/ili ekspresiji  $\beta_2$ -AR na ćelijama drenirajućih limfnih čvorova tokom induktivne faze EAE, kako bi se utvrdilo da li dolazi do disfunkcije noradrenergičkih mehanizama i postavila biohemijska osnova za modulatorno delovanje propranolola na razvoj bolesti.

### 4.2.1. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu i ekspresiji $\beta_2$ -AR na ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova

#### 4.2.1.1. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova

Koncentracija noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova pacova u induktivnoj fazi EAE (7. d.p.i.) bila je kod pacova oba pola manja (p < 0,05 kod ženki; p < 0,001 kod mužjaka) u odnosu na koncentraciju u limfnim čvorovima zdravih neimunizovanih životinja (Slika 3). U grupama zdravih neimunizovanih pacova, kao i životinja kojima je indukovana bolest, viša (p < 0,001) koncentracija noradrenalina je izmerena u limfnim čvorovima mužjaka u odnosu na ženke (Slika 3).

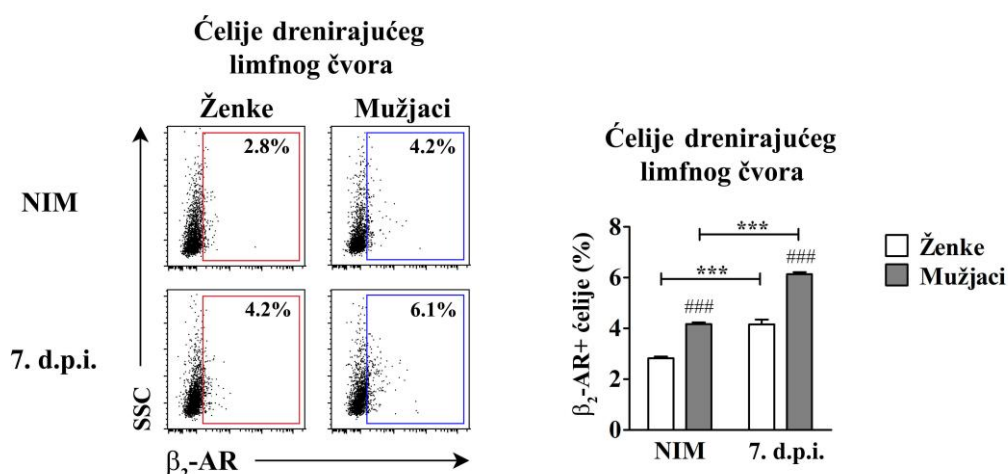


**Slika 3. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Hromatogrami predstavljaju reprezentativne uzorke tkiva drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz kontrolnih neimunizovanih životinja (NIM), i mužjaka i ženki DA pacova kojima je indukovana EAE (7. d.p.i.), kao i standard koji sadrži 8  $\mu$ g/ml noradrenalina. Histogram prikazuje

koncentraciju noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \* p ≤ 0,05, \*\*\* p ≤ 0,001; ### p ≤ 0,001 mužjaci u poređenju sa ženka ista grupe.

#### 4.2.1.2. Promene u ekspresiji $\beta_2$ -AR na membrani mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova

U sledećem koraku, ispitano je prisustvo  $\beta_2$ -AR na membrani mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova, kako bi se utvrdila njihova sposobnost da odgovore na delovanje noradrenalina, kao i na eksperimentalni tretman propranololom. Pokazano je da ove ćelije eksprimiraju  $\beta_2$ -AR, i da je njihova procentualna zastupljenost veća (p < 0,001) kod EAE životinja oba pola, u poređenju sa zdravim neimunizovanim pacovima odgovarajućeg pola (Slika 4). Procenat ćelija koje poseduju  $\beta_2$ -AR u populaciji mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova bio je veći (p < 0,001) kod mužjaka nego kod ženki i kontrolnih i EAE životinja (Slika 4).



**Slika 4. Promene u ekspresiji  $\beta_2$ -AR na membrani mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja  $\beta_2$ -AR+ ćelija u okviru mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova kontrolnih neimunizovanih (NIM) i DA pacova kojima je indukovana EAE (7. d.p.i.). Histogram predstavlja procentualnu zastupljenost ćelija koje poseduju  $\beta_2$ -AR među mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\* p ≤ 0,001; ### p ≤ 0,001 mužjaci u poređenju sa ženka ista grupe.

#### 4.2.2. Uticaj tretmana propranololom na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija koje učestvuju u patogenezi EAE u drenirajućim limfnim čvorovima ženki i mužjaka pacova

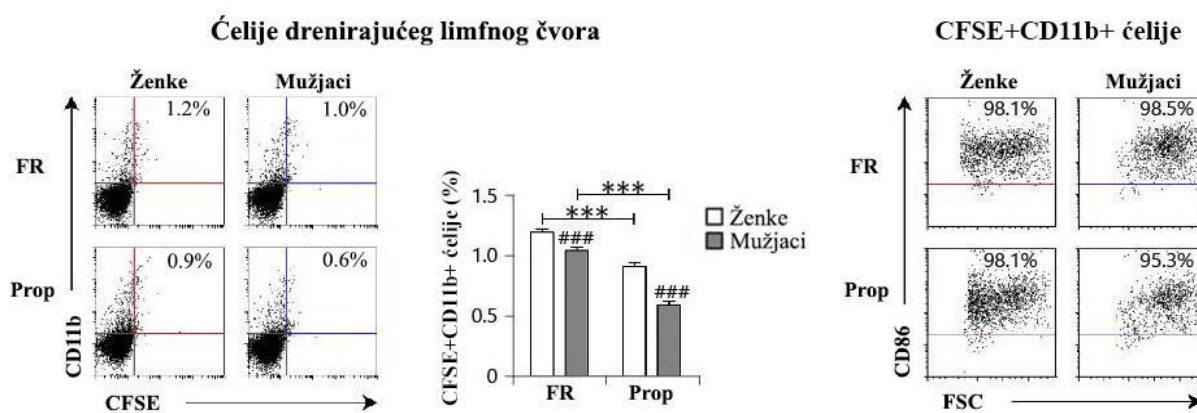
S obzirom na podatke koji su ukazivali da tretman propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze utiče na razvoj EAE, kao i da tokom razvoja bolesti dolazi do promena u koncentraciji noradrenalina u tkivu i ekspresiji  $\beta_2$ -AR na mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova, ispitano je uticaj tretmana propranololom kod mužjaka i ženki pacova na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova koje učestvuju u patogenezi EAE, izolovanih 7. d.p.i.

##### 4.2.2.1. Tretman propranololom smanjuje migraciju aktiviranih antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove kod pacova oba pola, ali je efikasniji kod mužjaka

Imajući u vidu da aktivacija i polarizacija konvencionalnih efektorskih T-limfocita zavise od prisustva i aktivacionog statusa antigen-prezentujućih ćelija (Martín-Fontecha i sar., 2003;

Allenspach i sar., 2008) u drenirajućim limfnim čvorovima, kao i da noradrenalin utiče na migraciju imunskih ćelija (Saint-Mezard i sar., 2003; Seiffert i Granstein, 2006; Scheiermann i sar., 2012), ispitani su efekti tretmana propranololom na migraciju i aktivaciju antigen-prezentujućih ćelija. U tu svrhu je korišćen test migracije mijeloidnih CD11b+ ćelija, obeleženih fluorescentnom bojom CFSE, kojima se pripisuje sposobnost prezentacije antigena.

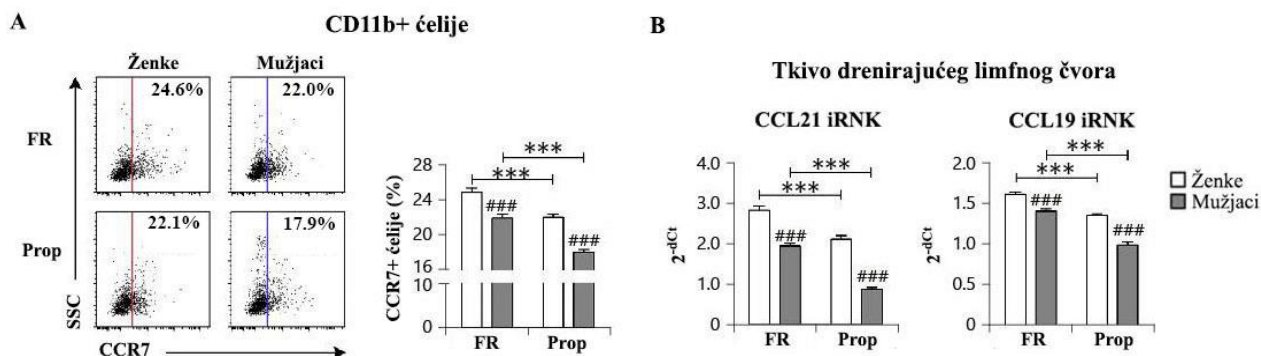
Pokazano je da tretman propranololom smanjuje ( $p < 0,001$ ) relativnu brojnost CFSE+CD11b+ ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima EAE pacova oba pola, u odnosu na kontrolne EAE životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 5). Ovaj efekat tretmana bio je izraženiji kod mužjaka (Slika 5). Osim toga, zastupljenost CFSE+CD11b+ ćelija bila je manja ( $p < 0,001$ ) u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka pacova u odnosu na ženke, bez obzira na to da li je kod životinja primenjivan propranolol ili fiziološki rastvor (Slika 5). Analizom ekspresije aktivacionog markera CD86 (Yun i Clark, 1998) na CFSE+CD11b+ ćelijama drenirajućeg limfnog čvora, pokazano je da su u svim grupama životinja gotovo sve CFSE+CD11b+ ćelije aktivirane tj. da ekspimiraju CD86, što dodatno ide u prilog prethodno iznetim nalazima (Slika 5).



**Slika 5. Uticaj tretmana propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike antigen-prezentujućih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili (levo) prikazuju strategiju izdvajanja CFSE+CD11b+ ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih 7. d.p.i. EAE iz DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost CFSE+CD11b+ antigen-prezentujućih ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili (desno) prikazuju strategiju izdvajanja CD86+ ćelija u okviru CFSE+CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost CFSE+CD11b+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 7.53$ ;  $p \leq 0.05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

S obzirom na to da ključnu ulogu u migraciji aktiviranih antigen-prezentujućih ćelija ima interakcija hemokinskog receptora CCR7 na njihovoj membrani sa hemokinima CCL19 i CCL21 (Gunn i sar., 1999; Randolph, 2001), ispitana je ekspresija gena za ove hemokine u tkivu drenirajućih limfnih čvorova. Tretman propranololom je smanjio ( $p < 0,001$ ) učestalost ćelija koje ispoljavaju CCR7 u subpopulaciji CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE pacova oba pola, u odnosu na kontrolne EAE životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom, a efekat tretmana je bio izraženiji kod mužjaka (Slika 6A). Zastupljenost CCR7+ ćelija u okviru ove subpopulacije bila je manja ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka pacova u odnosu na ženke, i kod kontrolnih

EAE životinja, i kod onih tretiranih propranololom (Slika 6A). Analizom ekspresije iRNK koje kodiraju hemokine CCL19 i CCL21 u tkivu drenirajućih limfnih čvorova primećeni su slični trendovi. Ekspresija ovih gena bila je smanjena ( $p < 0,001$ ) kod životinja oba pola tretiranih propranololom (Slika 6B). Ovi efekti propranolola (posebno onaj na ekspresiju CCL21) bili su izraženiji kod mužjaka, koji su pokazivali manji ( $p < 0,001$ ) nivo ekspresije iRNK za hemokine CCL19 i CCL21, nezavisno od toga da li su bili podvrgnuti tretmanu propranololom ili ne (Slika 6B).

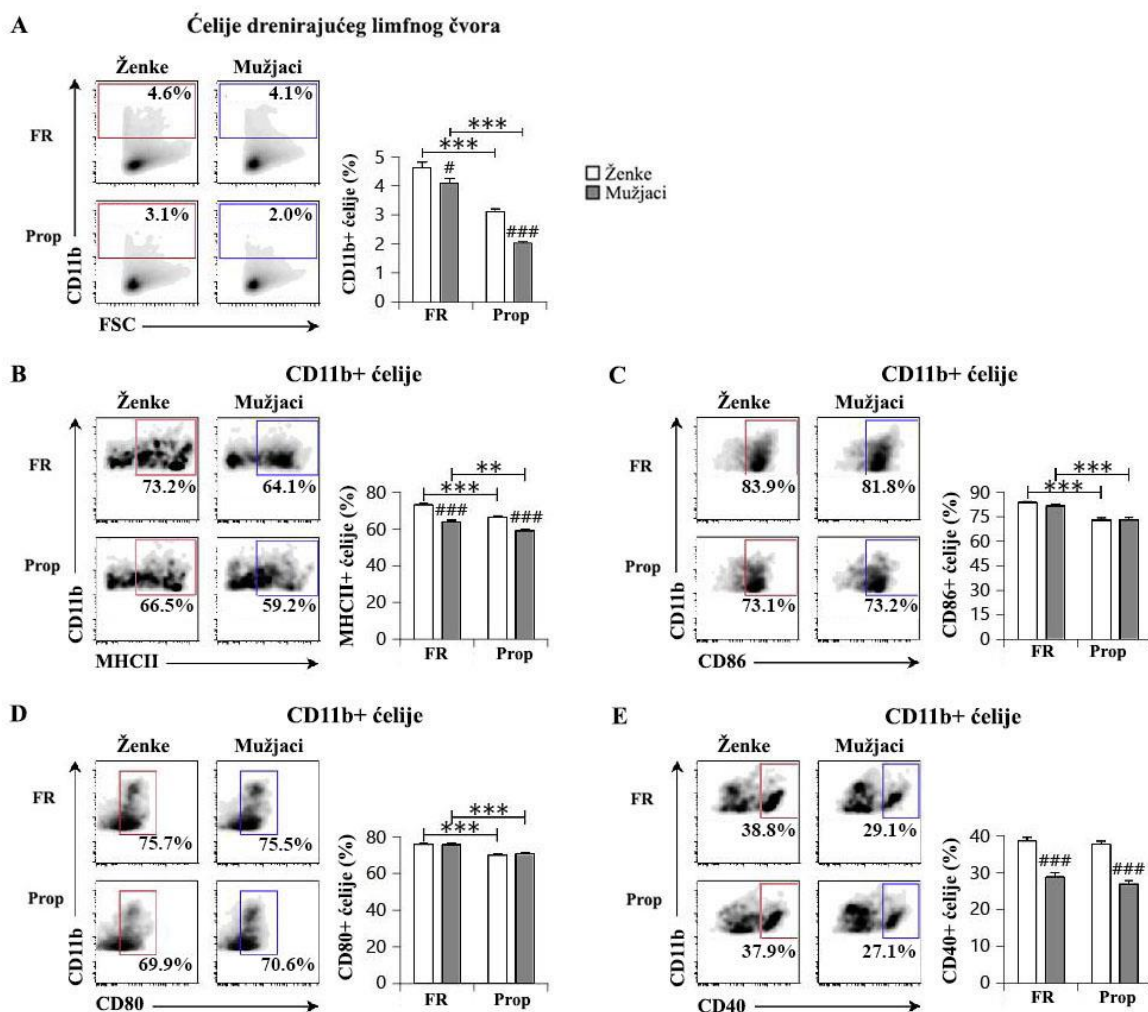


**Slika 6. Uticaj tretmana propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE na migraciju antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** (A) Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja CCR7+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih 7. d.p.i. EAE iz DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost CCR7+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova. (B) Histogramima je prikazana analiza ekspresije iRNK koja kodira hemokine (levo) CCL21 i (desno) CCL19 u tkivu drenirajućih limfnih čvorova (određena RT-qPCR i prikazana kao  $2^{-\Delta Ct}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost CCR7+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 6.60$ ;  $p \leq 0.05$ ) i ekspresiju CCL21 ( $F_{(1,20)} = 4.46$ ;  $p \leq 0.05$ ) i CCL19 ( $F_{(1,20)} = 6.28$ ;  $p \leq 0.05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženka ista grupe.

Imajući u vidu prethodno navedene nalaze, procentualna zastupljenost CD11b+ ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima EAE životinja oba pola tretiranih propranololom bila je očekivano smanjena ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne EAE životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 7A). Ovaj efekat je bio izraženiji kod pacova muškog pola (Slika 7A). Zastupljenost CD11b+ ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka bila je manja u odnosu na ženke, u grupi životinja koje su primale fiziološki rastvor ( $p < 0,05$ ) kao i propranolol ( $p < 0,001$ ) (Slika 7A). Daljim ispitivanjem populacije CD11b+ ćelija, analizom ekspresije površinskih markera MHCII, CD80, CD86 i CD40 (Yun i Clark, 1998; Bretscher, 1999), pokazano je da tretman propranololom smanjuje aktivaciju antigen-prezentujućih ćelija. Naime, uočeno je smanjenje učestalosti ćelija koje ekspimiraju MHCII ( $p < 0,001$  kod ženki;  $p < 0,01$  kod mužjaka), kao i CD80 i CD86 kostimulatorne molekule ( $p < 0,001$ ) među CD11b+ ćelijama kod životinja oba pola tretiranih propranololom (Slika 7B-D). Procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju molekul MHCII bila je manja ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka, dok za CD80 i CD86 nisu zabeležene statistički značajne polne razlike, bez obzira na to da li su EAE životinje tretirane propranololom ili fiziološkim rastvorom (Slika 7B-D). Tretman propranololom nije ostvario statistički značajan efekat na promenu procenta ćelija koje ekspimiraju marker aktivacije CD40 među CD11b+ ćelijama, a



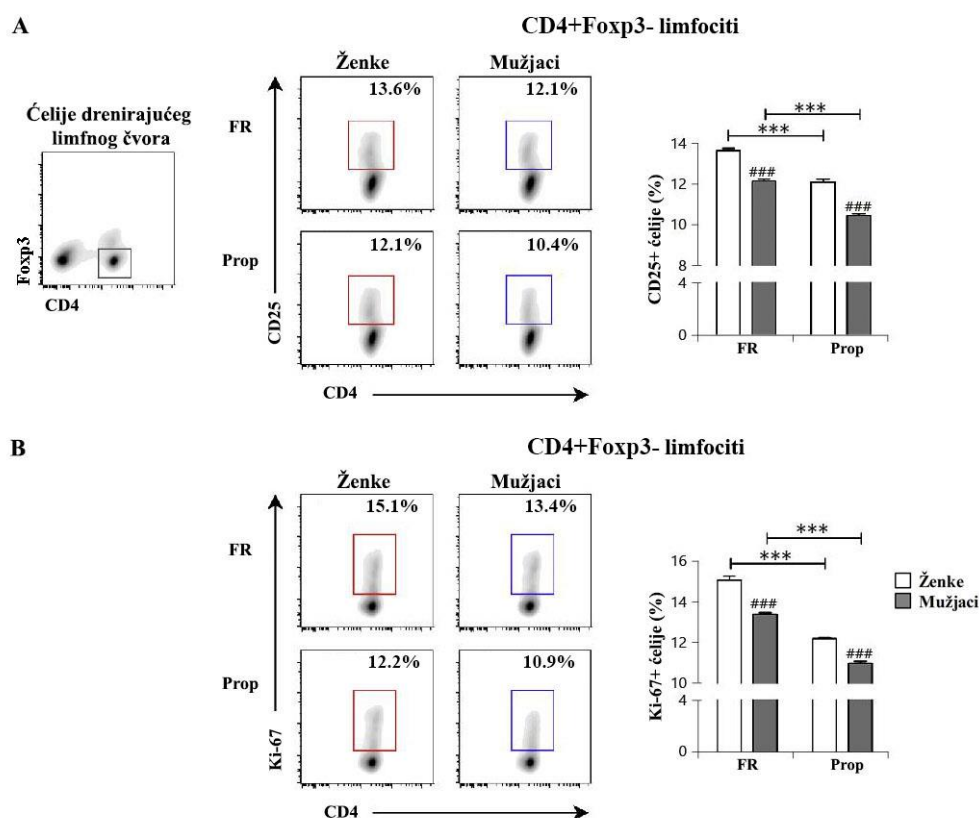
kod mužjaka pacova je učestalost ovih ćelija bila manja ( $p < 0,001$ ) nego kod ženki, nezavisno od tretmana (Slika 7E).



**Slika 7. Uticaj tretmana propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE na ekspresiju aktivacionih markera antigen-predstavjućih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** (A) Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski gustinski profili prikazuju strategiju izdvajanja CD11b+ ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih 7. d.p.i. EAE iz ženki i mužjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost CD11b+ ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski gustinski profili prikazuju strategiju izdvajanja (B) MHCII+, (C) CD86+, (D) CD80+ i (E) CD40+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost (B) MHCII+, (C) CD86+, (D) CD80+ i (E) CD40+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost CD11b+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 4,48$ ;  $p \leq 0,05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.2.2.2. Tretman propranololom menja fenotipske i funkcijske karakteristike CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova

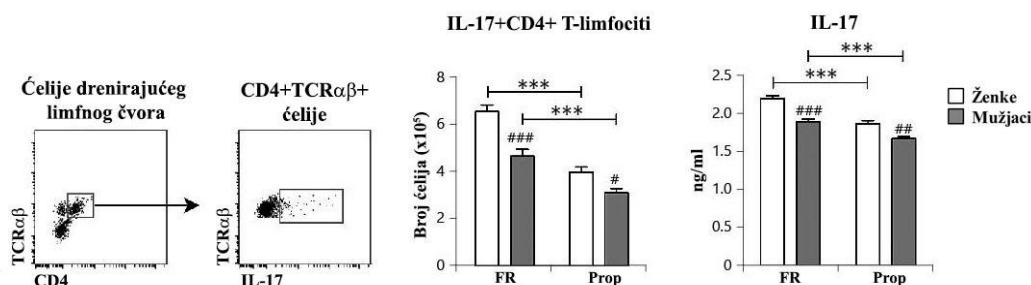
Aktivacija konvencionalnih (CD4+Foxp3-) T-limfocita (Alderson i sar., 2008; Wolf i sar., 2016) drenirajućih limfnih čvorova praćena je analizom ekspresije CD25 molekula (Caruso i sar., 1997), a njihova proliferacija na osnovu ekspresije markera Ki-67 (Scholzen i Gerdes, 2000; Soares i sar., 2010). Pokazano je da je procentualna zastupljenost aktiviranih CD25+ ćelija ( $p < 0,001$ ), kao i proliferišućih Ki-67+ ćelija ( $p < 0,001$ ), u subpopulaciji konvencionalnih CD4+Foxp3- T-limfocita bila smanjena kod EAE životinja tretiranih propranololom, u odnosu na kontrolne EAE životinje odgovarajućeg pola, tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 8). Osim toga, zastupljenost aktiviranih/proliferišućih ćelija u ovoj subpopulaciji bila je manja ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke, nezavisno od toga da li su životinje dobijale tretman propranololom ili ne (Slika 8).



**Slika 8. Uticaj tretmana propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE na aktivaciju i proliferaciju konvencionalnih T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** (A) Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski gustinski profil (levo) prikazuje strategiju izdvajanja CD4+Foxp3- ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski gustinski profili i histogrami prikazuju učestalost (A) aktiviranih CD25+ ćelija i (B) proliferišućih Ki-67+ ćelija u okviru CD4+Foxp3- T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova EAE ženki i mužjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$ , mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Imajući u vidu da se Th17 limfociti smatraju pokretačima bolesti u standardnim modelima EAE zasnovanim na korišćenju kompletnog Freundovog adjuvansa (Damsker i sar., 2010;

Kurschus, 2015), određivan je i broj ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima. Tretman propranololom je doveo do smanjenja ( $p < 0,001$ ) broja Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima kod EAE pacova oba pola, u odnosu na kontrolne životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 9). Broj ovih ćelija je bio manji kod mužjaka nego kod ženki kontrolnih EAE životinja ( $p < 0,001$ ) kao i onih tretiranih propranololom ( $p < 0,05$ ) (Slika 9). Koncentracija IL-17 je merena u supernatantima nakon restimulacije ćelija drenirajućih limfnih čvorova *in vitro*. Koncentracija IL-17 je bila manja ( $p < 0,001$ ) u supernatantima kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova i ženki i mužjaka tretiranih propranololom (Slika 9). U supernatantima kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka, izolovanih iz kontrolnih EAE životinja ( $p < 0,001$ ) i onih tretiranih propranololom ( $p < 0,01$ ), koncentracija IL-17 je bila manja u poređenju sa supernatantima kultura ćelija izolovanih iz životinja ženskog pola (Slika 9).



**Slika 9. Uticaj tretmana propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE na Th17 limfocite drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja Th17 limfocita: levi tačkasti profil pokazuje strategiju izdvajanja CD4+TCRαβ+ ćelija drenirajućeg limfnog čvora, a desni tačkasti profil prikazuje izdvajanje IL-17+ ćelija u okviru ove subpopulacije. Na histogramima je prikazan (levo) broj Th17 ćelija koji je izračunat iz učestalosti IL-17+CD4+TCRαβ+ ćelija u okviru svih ćelija drenirajućih limfnih čvorova i (desno) koncentracija IL-17 u supernatantima kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova restimulisanih PMA/jonomicinom *in vitro*. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ , mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

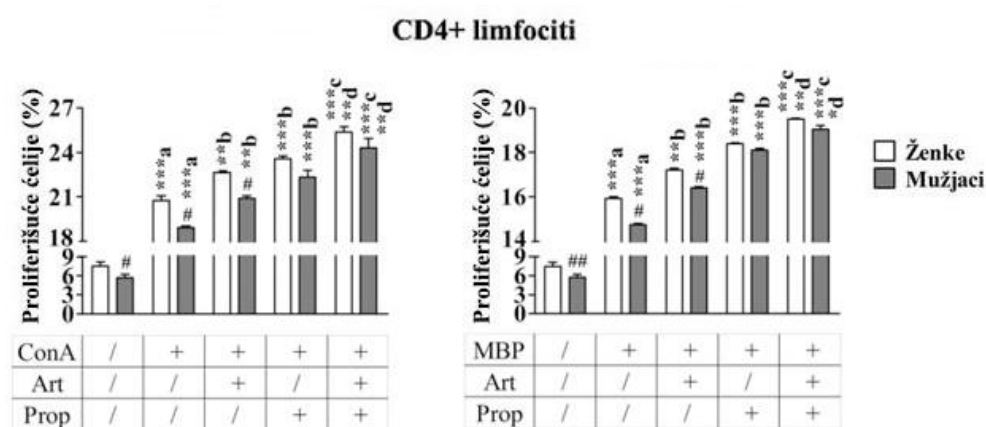
### 4.3. *In vitro* efekti propranolola na proliferaciju i diferencijaciju CD4+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova

Cilj naredne faze istraživanja bio je da se detaljnije ispituju mehanizmi kojima tretman propranololom utiče na aktivaciju/proliferaciju i diferencijaciju konvencionalnih CD4+ T-limfocita, kao i mogući značaj polnih razlika u modulatornom delovanju noradrenalina posredstvom  $\beta_2$ -AR. Da bi se ovaj cilj ispunio, ispitani su proliferativni kapacitet i diferencijacija CD4+ limfocita u potencijalno patogene Th17 limfocite u kulturi mononuklearnih ćelija, izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova mužjaka i ženki pacova 7. d.p.i. EAE, i stimuliranih mitogenom (ConA kulture) ili baznim proteinom mijelina (MBP kulture), u prisustvu ili odsustvu noradrenalina (arterenola) i/ili propranolola.

#### 4.3.1. Uticaj propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja

Poznato je da noradrenalin, prevashodno posredstvom  $\beta_2$ -AR utiče na proliferaciju i diferencijaciju ćelija urođene i stečene imunosti (Kohm i Sanders, 2001; Marino i Cosentino, 2013). Procenat ćelija koje proliferišu (nalaze se u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa) u populaciji CD4+ limfocita povećao se ( $p < 0,001$ ) u ConA i MBP stimuliranim kulturama ćelija pacova oba pola, u odnosu na ćelije kultivisane bez stimulatora (kontrolne kulture) (Grafik 1). Procenat proliferišućih

ćelija bio je manji ( $p < 0,05$ ) u subpopulaciji CD4+ limfocita mužjaka u odnosu na limfocite ženki, nezavisno od prisustva stimulatora (Grafik 1). Dodatkom arterenola u ConA i MBP stimulisane kulture, povećao se procenat ćelija u deobi u subpopulaciji CD4+ limfocita pacova oba pola (Grafik 1). Pri tome se zadržala manja ( $p < 0,05$ ) zastupljenost proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita mužjaka, kao i u kulturama gajenim u odsustvu arterenola (Grafik 1). Prisustvo propranolola u ConA ili MBP stimulisanim kulturama ćelija životinja oba pola, povećalo ( $p < 0,001$ ) je učestalost proliferišućih CD4+ limfocita (Grafik 1). Bez obzira na tip stimulacije, efekat propranolola je bio izraženiji na ćelije mužjaka, što je dovelo do gubitka statistički značajnih polnih razlika u zastupljenosti proliferišućih CD4+ limfocita koje su uočene u kulturama stimulisanim u odsustvu propranolola (Grafik 1). Kada su propranolol i arterenol zajedno dodati u ConA ili MBP stimulisane kulture, procentualna zastupljenost ćelija koje proliferišu u subpopulaciji CD4+ limfocita bila je veća nego u prisustvu arterenola ( $p < 0,001$ ) ili propranolola ( $p < 0,05$ ) pojedinačno, nezavisno od korišćenog stimulatora (Grafik 1). Statistički značajne polne razlike u zastupljenosti proliferišućih CD4+ limfocita nisu uočene ni u ConA stimulisanim kulturama, niti u MBP stimulisanim kulturama kojima su dodati propranolol i arterenol (Grafik 1).



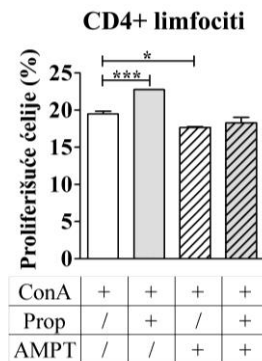
**Grafik 1. Efekti noradrenalina i propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja.**

Histogrami prikazuju učestalost proliferišućih ćelija (ćelije u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, određeno 7-AAD bojenjem) u okviru CD4+ limfocita iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulatora (kontrola) ili nakon stimulacije sa (levo) ConA ili (desno) MBP u odsustvu ili u prisustvu  $10^{-6}$  M arterenola (Art) i/ili  $10^{-5}$  M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na učestalost proliferišućih CD4+ limfocita u kulturama ćelija stimulisanim sa ConA ( $F_{(4,50)} = 2,60$ ;  $p \leq 0,05$ ) i MBP ( $F_{(4,50)} = 2,65$ ;  $p \leq 0,05$ ). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  tretman u poređenju sa kontrolama istog pola; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe; a, u poređenju sa kontrolama; b, u poređenju sa ConA/MBP; c, u poređenju sa ConA/MBP+Art; d, u poređenju sa ConA/MBP+Prop.

#### 4.3.1.1. Ćelije limfnih čvorova sintetišu noradrenalin koji autokrino/parakrino deluje na proliferaciju limfocita

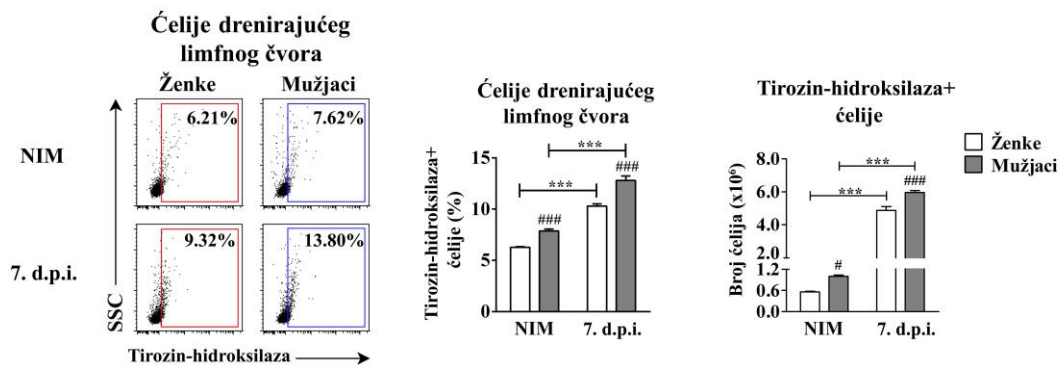
Imajući u vidu da su i propranolol i arterenol povećali proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija, razmatrana je mogućnost nespecifičnog dejstva propranolola (Grobeck i sar., 1976). U tu svrhu, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode, u ConA stimulisane kulture ćelija drenirajućih limfnih čvorova dodavan je AMPT, inhibitor tirozin-hidroksilaze, ključnog

enzima u sintezi kateholamina (Flatmark i Stevens, 1999), pa sledstveno i njihove sinteze (Ankenman i Salvatore, 2007), u prisustvu ili odsustvu propranolola. AMPT je smanjio ( $p < 0,05$ ) zastupljenost ćelija koje proliferišu u subpopulaciji CD4+ limfocita u ConA stimulisanim kulturama (Grafik 2). Propranolol, koji je stimulisao ( $p < 0,001$ ) proliferaciju CD4+ limfocita u odsustvu AMPT, nije pokazao ovakav efekat ukoliko su CD4+ limfociti prethodno izloženi dejstvu ovog inhibitora biosinteze kateholamina (Grafik 2). Stoga, pokazano je da je efekat propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita bio posredovan receptorom. Dodatno, činjenica da je u ConA stimulisanim kulturama sâm propranolol imao efekat na proliferaciju CD4+ limfocita sugerisala je da ćelije drenirajućih limfnih čvorova sintetišu noradrenalin. Ova mogućnost je potvrđena ispitivanjem ekspresije tirozin-hidroksilaze i sadržaja noradrenalina u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova.



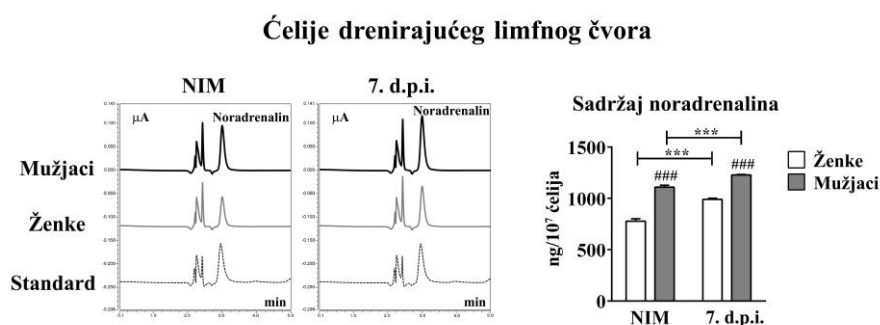
**Grafik 2. Efekti propranolola i AMPT na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućeg limfnog čvora EAE životinja.** Histogram prikazuje učestalost proliferišućih ćelija (ćelije u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, određeno 7-AAD bojenjem) u okviru CD4+ limfocita iz ConA stimulisanih kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i., u prisustvu ili odsustvu AMPT ( $10^{-5}$  M) i/ili propranolola (Prop,  $10^{-5}$  M). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Pokazano je da ćelije drenirajućih limfnih čvorova ekspimiraju tirozin-hidroksilazu (Slika 10), i sadrže noradrenalin (Slika 11). Pored toga, nađeno je da se relativan i apsolutan broj ćelija koje ekspimiraju tirozin-hidroksilazu povećava ( $p < 0,001$ ) kod EAE životinja oba pola, kada se uporede sa kontrolnim neimunizovanim životinjama (Slika 10). Takođe, vrednosti ovih parametara bile su veće ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka pacova u obe eksperimentalne grupe u odnosu na ženke (Slika 10).



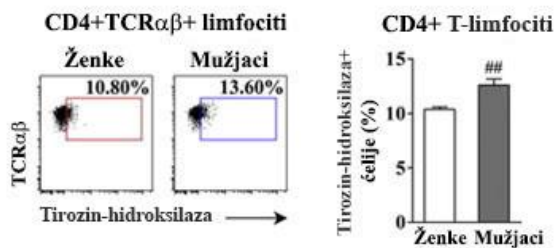
**Slika 10. Zastupljenost i broj ćelija koje ekspimiraju tirozin-hidroksilazu u drenirajućim limfnim čvorovima ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja tirozin-hidroksilaza+ ćelija u okviru ćelija drenirajućeg limfnog čvora kontrolnih neimunizovanih životinja (NIM) i DA pacova kojima je indukovano EAE (7. d.p.i.). Histogrami predstavljaju (levo) procentualnu zastupljenost i (desno) broj tirozin-hidroksilaza+ ćelija u okviru ćelija drenirajućih limfnih čvorova. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata bolesti i pola na procentualnu zastupljenost tirozin-hidroksilaza+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 11,30; p \leq 0,01$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

U skladu sa promenama u ekspresiji tirozin-hidroksilaze, nađeno je povećanje ( $p < 0,001$ ) sadržaja noradrenalina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova EAE pacova oba pola u poređenju sa kontrolnim neimunizovanim životinjama odgovarajućeg pola (Slika 11). Sadržaj noradrenalina bio je veći ( $p < 0,001$ ) u ćelijama mužjaka, i kod EAE i kod kontrolnih neimunizovanih životinja, u poređenju sa ćelijama izolovanim iz limfnih čvorova ženki (Slika 11).



**Slika 11. Promene u sadržaju noradrenalina u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Hromatogrami predstavljaju reprezentativne uzorke ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz mužjaka i ženki kontrolnih neimunizovanih životinja (NIM) i DA pacova kojima je indukovano EAE (7. d.p.i.), kao i standard koji sadrži 4  $\mu\text{g/ml}$  noradrenalina. Histogram prikazuje sadržaj noradrenalina u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata bolesti i pola na sadržaj noradrenalina ( $F_{(1,20)} = 7,62; p \leq 0,05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

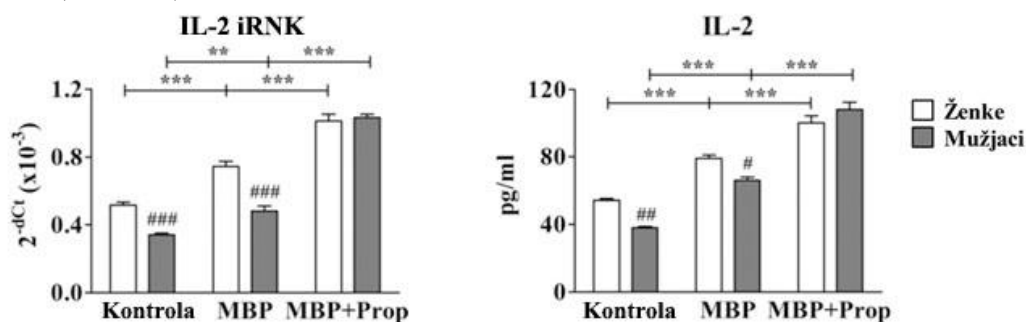
U svetlu prethodnih rezultata, postavilo se pitanje da li sami CD4+ T-limfociti mogu da sintetišu noradrenalin, pa je ispitana ekspresija tirozin-hidroksilaze u ovim ćelijama izolovanim 7. d.p.i. EAE iz drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova. Potvrđeno je da CD4+ T-limfociti sadrže tirozin-hidroksilazu, tj. da poseduju sposobnost sinteze noradrenalina, kao i da je učestalost ćelija koje ekspimiraju ovaj enzim u subpopulaciji CD4+ T-limfocita veća ( $p < 0,01$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke EAE pacova (Slika 12).



**Slika 12. Ekspresija tirozin-hidroksilaze u CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja tirozin-hidroksilaza+ ćelija u okviru CD4+TCRαβ+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz DA pacova 7. d.p.i. EAE. Histogram predstavlja procentualnu zastupljenost ćelija koje ekspimiraju enzim tirozin-hidroksilazu u okviru CD4+ T-limfocita. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). ## p ≤ 0,01

#### 4.3.1.2. Propranolol povećava sintezu/sekreciju IL-2 u kulturama ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola, ali je efikasniji kod mužjaka

Imajući u vidu podatke koji ukazuju da noradrenalin utiče na produkciju IL-2 indukovanu mitogenom (Peng i sar., 2004), pa posledično i na ekspanziju CD4+ T-limfocita (Ganusov i sar., 2007; Liao i sar., 2013), ispitana je ekspresija iRNK za IL-2 u MBP stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova u prisustvu ili odsustvu propranolola, kao i koncentracija IL-2 proteina u supernatantima ovih kultura. U odnosu na kontrolne kulture, u MBP stimulisanim kulturama ćelija ženki (p < 0,001) i mužjaka (p < 0,01) došlo je do povećanja sinteze iRNK za IL-2 (Grafik 3). U ćelijama mužjaka izmerena je manja (p < 0,001) ekspresija ove iRNK u odnosu na ćelije ženki, nezavisno od prisustva stimulatora (Grafik 3). Propranolol je povećao (p < 0,001) ekspresiju iRNK koja kodira IL-2 u MBP stimulisanim kulturama ćelija životinja oba pola, ali je ovaj efekat bio izraženiji u kulturama ćelija mužjaka, što je dovelo do gubitka statistički značajnih polnih razlika u ekspresiji ove iRNK (Grafik 3). U skladu sa ovim nalazima, koncentracija IL-2 u supernatantima MBP stimulisanih kultura ćelija ženki i mužjaka pacova bila je veća (p < 0,001) u odnosu na onu u ćelijama kultivisanim bez neuroantigena (Grafik 3). Takođe, nezavisno od toga da li su ćelije bile stimulisane antigenom ili ne, koncentracija IL-2 je bila manja (p < 0,05) u supernatantima kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka (Grafik 3). Dodavanjem propranolola u MBP stimulisane kulture ćelija životinja oba pola došlo je do povećanja (p < 0,001) koncentracije IL-2 u odgovarajućim supernatantima. Efekti propranolola bili su izraženiji u kulturama ćelija mužjaka, što je za posledicu imalo gubitak statistički značajnog polnog dimorfizma primećenog u odsustvu propranolola (Grafik 3).

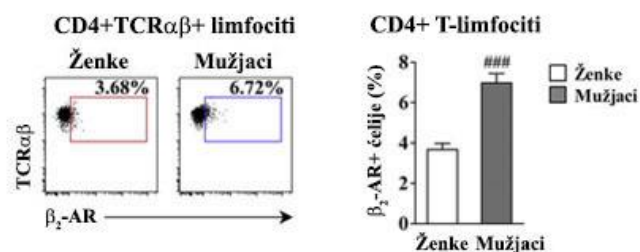


**Grafik 3. Ekspresija iRNK za IL-2 i koncentracija IL-2 u supernatantima MBP stimulisanih kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE.** Histogrami prikazuju (levo) relativnu ekspresiju iRNK za IL-2 (određena RT-qPCR i prikazana kao 2<sup>-dCt</sup> u odnosu na β-aktin) u ćelijama i (desno) koncentraciju IL-2 u supernatantima kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova DA pacova u odsustvu stimulatora (Kontrola) ili stimulisanih sa MBP u odsustvu ili prisustvu 10<sup>-5</sup> M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNK za IL-2 u ćelijama (F<sub>(2,30)</sub> = 14,19; p ≤ 0,001) i koncentraciju IL-2 u supernatantima (F<sub>(2,30)</sub> = 10,15; p ≤ 0,001) ćelijskih kultura. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001, # p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01, ### p ≤ 0,001 mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Dobijeni nalazi dodatno su podržali hipotezu o polno dimorfnom delovanju propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita koje je specifično posredovano β-AR.

#### 4.3.1.3. Veća procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita koji ekspresiraju $\beta_2$ -AR u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka pacova u poređenju sa ženka

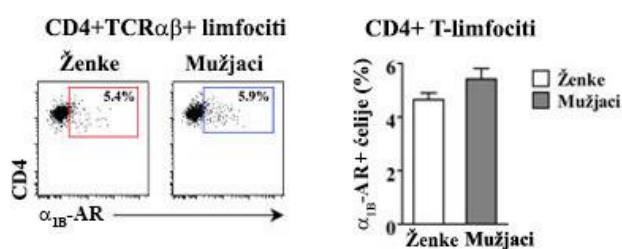
Budući da je pokazano da su efekti propranolola bili posredovani  $\beta$ -AR, a da je  $\beta_2$ -AR ključni tip AR uključen u modulaciju funkcija CD4+ T-limfocita (Kohm i Sanders, 2001), analizirana je njegova ekspresija na membrani ovih ćelija. Pokazano je da CD4+ T-limfociti drenirajućih limfnih čvorova, izolovani 7. d.p.i. iz EAE životinja oba pola, ekspresiraju  $\beta_2$ -AR (Slika 13). Procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju  $\beta_2$ -AR u okviru CD4+ T-limfocita bila je veća ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka u poređenju sa ženka pacova (Slika 13).



**Slika 13. Ekspresija  $\beta_2$ -AR na membrani CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja  $\beta_2$ -AR+ ćelija u okviru CD4+TCR $\alpha\beta$  limfocita drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz DA pacova 7. d.p.i. EAE. Histogram predstavlja procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju  $\beta_2$ -AR u okviru CD4+ T-limfocita. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). ###  $p \leq 0,001$

#### 4.3.1.4. Blokada $\alpha_1$ -AR suprimira proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija izolovanih 7. d.p.i. EAE iz drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola

Budući da su i arterenol i propranolol povećavali proliferaciju CD4+ limfocita, tako da je ona u prisustvu noradrenalina i antagonista  $\beta$ -AR propranolola bila veća nego u prisustvu svakog od njih pojedinačno, logično se nametnuo zaključak da arterenol na proliferaciju CD4+ limfocita deluje posredstvom i nekog drugog tipa receptora. Budući da stimulacija  $\alpha_{1B}$ -AR podstiče proliferaciju ćelija (Gonzalez-Cabrera i sar., 2004), ispitivano je da li CD4+ T-limfociti na svojoj membrani ispoljavaju  $\alpha_{1B}$ -AR. Mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora izolovane su 7. d.p.i. EAE i na populaciji CD4+ T-limfocita kod EAE životinja oba pola pokazana je membranska ekspresija  $\alpha_{1B}$ -AR, ali nisu primećene statistički značajne polne razlike u zastupljenosti ćelija koje ekspresiraju ovaj receptor u populaciji CD4+ T-limfocita (Slika 14).

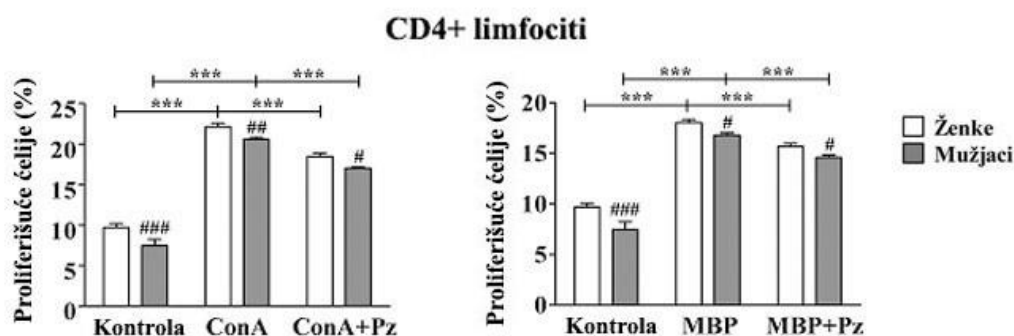


**Slika 14. Membranska ekspresija  $\alpha_{1B}$ -AR na CD4+ T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja  $\alpha_{1B}$ -AR+ ćelija u okviru CD4+TCR $\alpha\beta$  limfocita drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz DA pacova 7. d.p.i. Histogram predstavlja procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju  $\alpha_{1B}$ -AR u okviru CD4+ T-limfocita. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ).

Da bi se utvrdio značaj ekspresije  $\alpha_{1B}$ -AR za modulaciju proliferacije CD4+ T-limfocita, testiran je efekat prazosina, antagonista  $\alpha_1$ -AR, na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturi



mononuklearnih ćelija izolovanih 7. d.p.i. iz drenirajućih limfnih čvorova životinja oba pola. Prazosin je smanjio ( $p < 0,001$ ) učestalost proliferišućih ćelija među CD4+ limfocitima u ConA i MBP stimulisanim kulturama ćelija životinja oba pola (Grafik 4). Proliferacija CD4+ limfocita bila je manja ( $p < 0,05$ ) u kulturama ćelija mužjaka u odnosu na ćelije ženki, i u prisustvu i u odsustvu prazosina, bez obzira na to da li su ćelije stimulisane mitogenom ili neuroantigenom (Grafik 4).



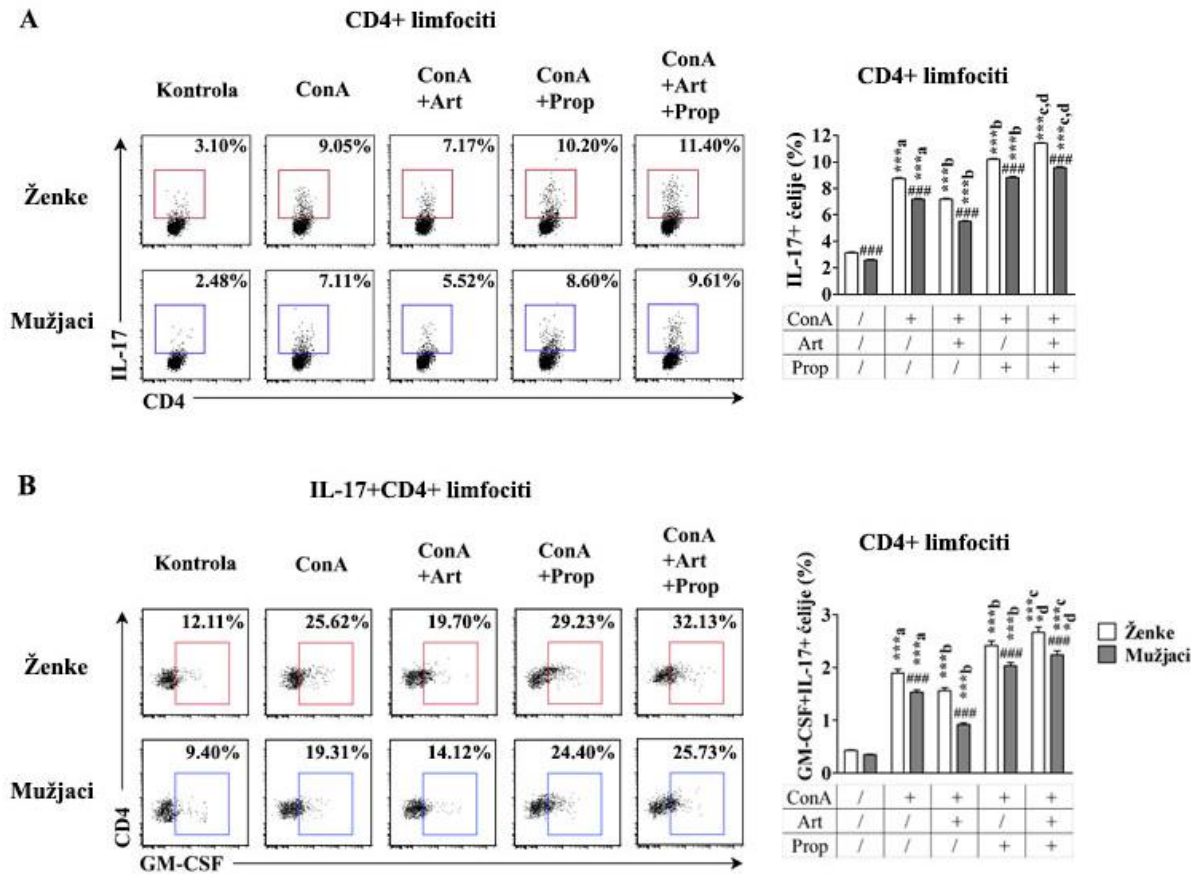
**Grafik 4. Uticaj prazosina na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Histogrami prikazuju učestalost proliferišućih ćelija (ćelije u S+G2/M fazi ćelijskog ciklusa, određeno 7-AAD bojenjem) u okviru CD4+ limfocita iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulatora (Kontrola) ili nakon stimulacije sa (levo) ConA ili (desno) MBP u odsustvu ili u prisustvu  $10^{-5}$  M prazosina (Pz). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Dobijeni rezultati ukazuju da noradrenalin, posredstvom  $\beta$ -AR, deluje inhibitory na proliferaciju CD4+ limfocita, ali da se posredstvom  $\alpha_1$ -AR ostvaruje stimulatorni efekat.

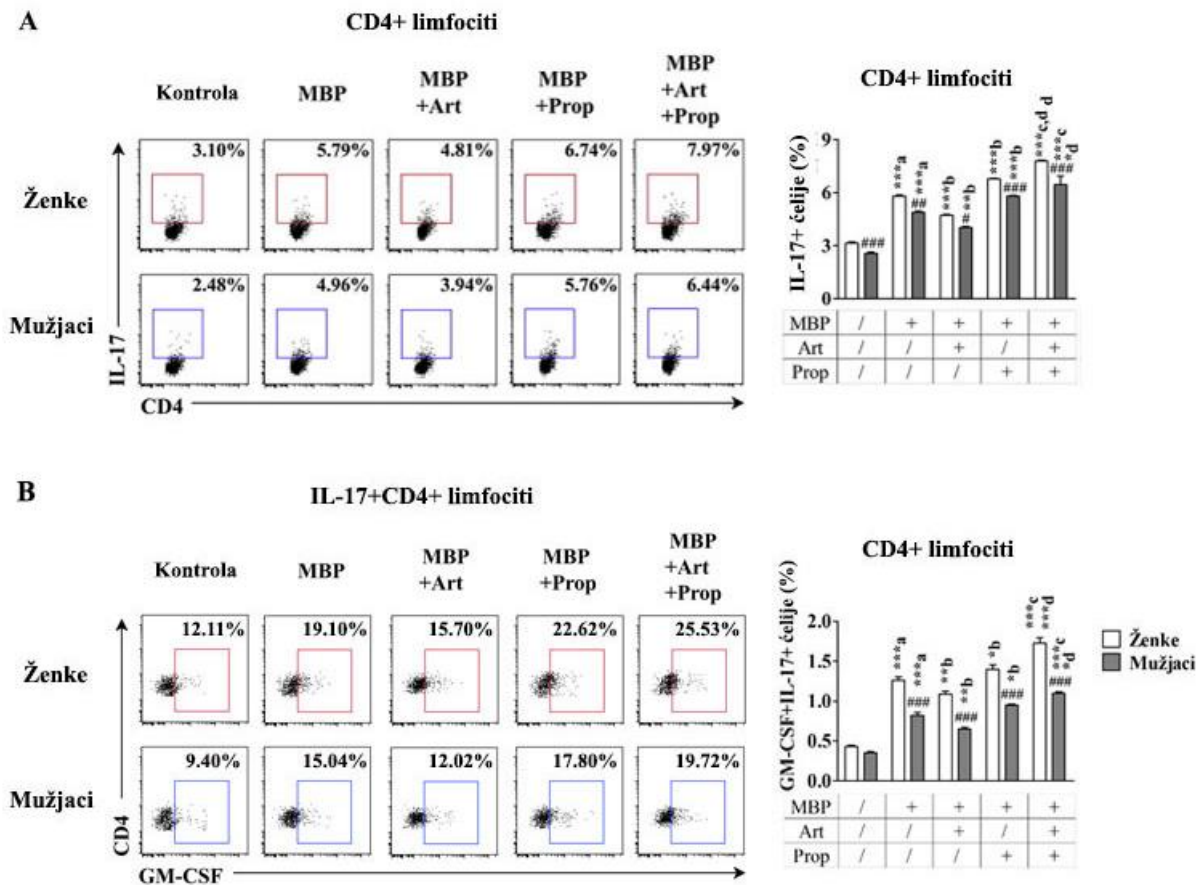
#### 4.3.2. Efekti propranolola na diferencijaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja

U narednom stadijumu istraživanja, ispitani su i efekti propranolola na diferencijaciju CD4+ limfocita u Th17 limfocite, posebno u one potencijalno najpatogenije koji proizvode GM-CSF (El-Behi i sar., 2011) u ćelijskoj kulturi.

Procentualna zastupljenost IL-17+ i IL-17+GM-CSF+ ćelija se povećala ( $p < 0,001$ ) u subpopulaciji CD4+ limfocita u ConA i MBP stimulisanim kulturama ćelija životinja oba pola, u odnosu na odgovarajuće nestimulisane kontrolne ćelijske kulture (Slike 15 i 16). Dodatkom arterenola, smanjila se procentualna zastupljenost ćelija oba ispitivana fenotipa u subpopulaciji CD4+ limfocita u ConA ( $p < 0,001$ ) i MBP ( $p < 0,01$ ) stimulisanim kulturama ćelija ženki i mužjaka EAE pacova (Slike 15 i 16). Dodavanje propranolola u ConA i MBP stimulisane kulture ćelija imalo je suprotan efekat, odnosno dovelo je do povećanja frekvencije IL-17+ ( $p < 0,001$ ) i IL-17+GM-CSF+ ( $p < 0,05$ ) ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita životinja oba pola (Slike 15 i 16). Kada su propranolol i arterenol dodati zajedno u ConA ili MBP stimulisane kulture, procentualna zastupljenost IL-17+ i IL-17+GM-CSF+ ćelija u okviru CD4+ limfocita bila je veća u odnosu na vrednosti izmerene nakon stimulacije ćelija koje su pretretirane ili arterenolom ( $p < 0,001$ ) ili propranololom ( $p < 0,05$ ) (Slike 15 i 16). Nezavisno od korišćenog stimulatora i/ili farmakološkog tretmana, zastupljenost IL-17+ ( $p < 0,05$ ), kao i IL-17+GM-CSF+ ( $p < 0,001$ ) ćelija među CD4+ limfocitima bila je manja u kulturama ćelija mužjaka u poređenju sa kulturama ćelija ženki (Slike 15 i 16).

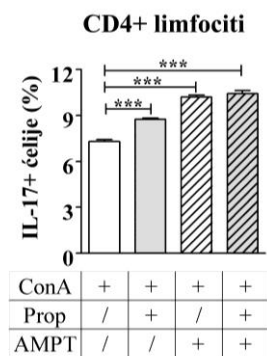


**Slika 15. Efekti noradrenalina i propranolola na diferencijaciju CD4+ limfocita u ConA stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja, a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) IL-17+ ćelija i (B) GMCSF+IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulatora (kontrola) ili nakon stimulacije sa ConA u odsustvu ili u prisustvu  $10^{-6}$  M arterenola (Art) i/ili  $10^{-5}$  M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na učestalost IL-17+ ćelija ( $F_{(4,50)} = 24,94$ ;  $p \leq 0,001$ ) i GMCSF+IL-17+ ćelija ( $F_{(4,50)} = 5,17$ ;  $p \leq 0,01$ ) u ConA stimulisanim kulturama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  tretman u poređenju sa kontrolama; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe; a, u poređenju sa kontrolom; b, u poređenju sa ConA; c, u poređenju sa ConA+Art; d, u poređenju sa ConA+Prop.



**Slika 16. Efekti noradrenalina i propranolola na diferencijaciju CD4+ limfocita u MBP stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja, a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) IL-17+ ćelija i (B) GMCSF+IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulatora (kontrola) ili nakon stimulacije sa MBP u odsustvu ili u prisustvu  $10^{-6}$  M arterenola (Art) i/ili  $10^{-5}$  M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na učestalost IL-17+ ćelija ( $F_{(4,50)} = 2,59$ ;  $p \leq 0,05$ ) i GMCSF+IL-17+ ćelija ( $F_{(4,50)} = 14,87$ ;  $p \leq 0,001$ ) u MBP stimulisanim kulturama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  tretman u poređenju sa kontrolama; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe; a, u poređenju sa kontrolom; b, u poređenju sa MBP; c, u poređenju sa MBP+Art; d, u poređenju sa MBP+Prop.

I u ovom delu studije provereno je da li propranolol pokazuje dejstvo na procenat CD4+IL-17+ limfocita posredstvom  $\beta$ -AR, kao što je opisano u odeljku 4.3.1.1. Pokazano je da sâm AMPT (inhibitor tirozin-hidroksilaze i biosinteze kateholamina) povećava ( $p < 0,001$ ) učestalost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita u ConA stimulisanim kulturama ćelija (Grafik 5). U odsustvu AMPT, tretman propranololom *in vitro* povećao je ( $p < 0,001$ ) procentualnu zastupljenost Th17 ćelija u populaciji CD4+ limfocita u ConA stimulisanim kulturama ćelija, ali je ovakav efekat izostao u kulturama kojima je prethodno dodat AMPT (Grafik 5).

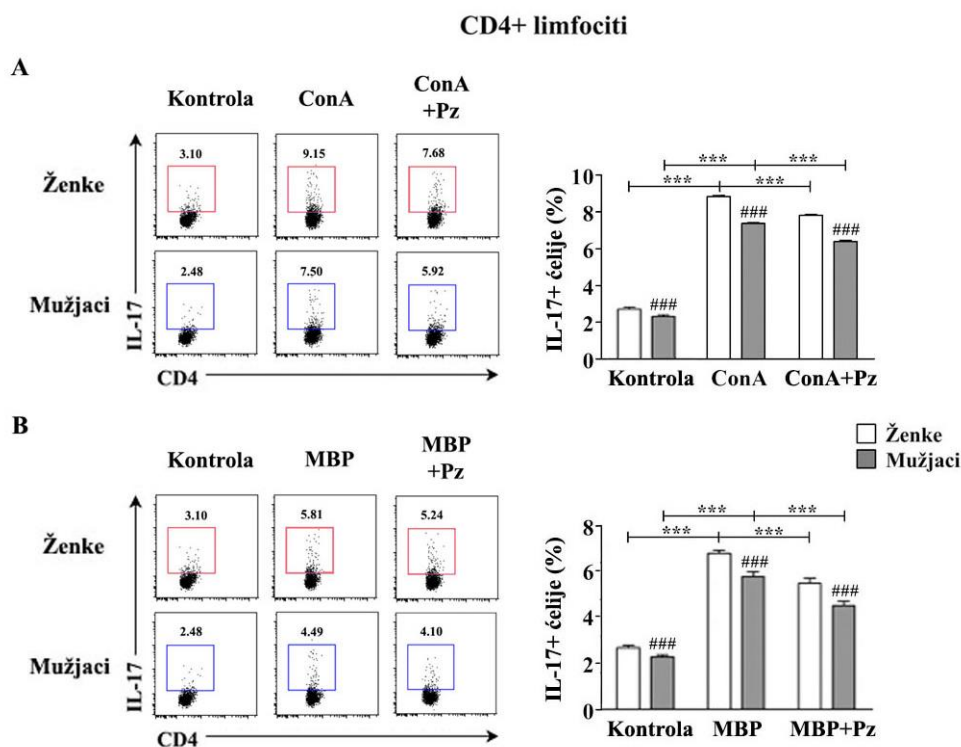


**Grafik 5. Efekti propranolola i AMPT na diferencijaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućeg limfnog čvora EAE pacova.** Histogram prikazuje učestalost IL-17+ ćelija u okviru CD4+ limfocita iz ConA stimuliranih kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u prisustvu ili odsustvu  $10^{-5}$  M AMPT i/ili  $10^{-5}$  M propranolola (Prop). Podaci su predstavljani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$

Ovim ispitivanjem je potvrđeno da se uticaj propranolola na zastupljenost Th17 limfocita u kulturi ostvaruje njegovim delovanjem na ćelije posredstvom  $\beta$ -AR. Na osnovu ovakvog nalaza, i činjenice da je zastupljenost IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima u kulturama ćelija tretiranih kombinacijom arterenola i propranolola bila veća u odnosu na kulture gajene u prisustvu samo arterenola ili samo propranolola, pretpostavljeno je da arterenol, u prisustvu propranolola, pokazuje stimulatorni efekat na zastupljenost Th17 limfocita posredstvom  $\alpha$ -AR.

#### 4.3.2.1. Blokada $\alpha_1$ -AR smanjuje zastupljenost IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola

Radi potvrde ove hipoteze, ispitano je delovanje blokade  $\alpha_1$ -AR prazosinom na zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru CD4+ limfocita u ConA i MBP stimuliranim kulturama ćelija koje su izolovane iz drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova 7. d.p.i. EAE. Prazosin je smanjio ( $p < 0,001$ ) zastupljenost Th17 limfocita u kulturama ćelija životinja oba pola, nezavisno od korišćenog stimulatora (Slika 17). Pri tome, manja ( $p < 0,001$ ) zastupljenost Th17 limfocita nađena je u ConA i MBP stimuliranim kulturama ćelija mužjaka, u odnosu na kulture ćelija ženki, bez obzira na to da li su ćelije stimulirane u prisustvu ili odsustvu prazosina (Slika 17).



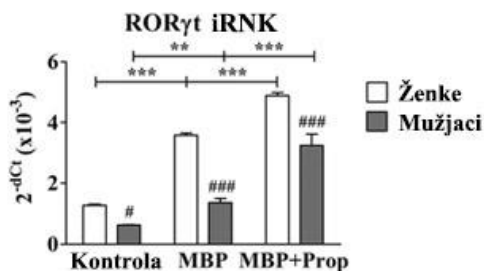
**Slika 17. Efekat prazosina na diferencijaciju CD4+ limfocita u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja, a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulatora (Kontrola) ili nakon stimulacije sa (A) ConA ili (B) MBP u odsustvu ili u prisustvu  $10^{-5}$  M prazosina (Pz). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na učestalost IL-17+ ćelija ( $F_{(2,30)} = 9,50; p \leq 0,001$ ) u MBP stimulisanim kulturama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Dobijeni rezultati pokazali su da arterenol (noradrenalin) ispoljava efekte suprotnog smera na zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-17 u subpopulaciji CD4+ limfocita delujući posredstvom  $\beta$ -AR (smanjenje zastupljenosti) i  $\alpha_1$ -AR (povećanje zastupljenosti). Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da efekti blokade  $\alpha_1$ -AR *in vitro* na proliferaciju CD4+ limfocita (odeljak 4.3.1.4.) i zastupljenost Th17 limfocita nisu pokazali polne specifičnosti, sva dalja istraživanja bila su fokusirana na imunomodulatorne efekte noradrenalina posredovane  $\beta$ -AR.

#### 4.3.2.2. Propranolol povećava ekspresiju gena za ROR $\gamma$ t u kulturama ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova kod kojih je indukovana EAE

Radi ostvarivanja uvida u mehanizam dejstva noradrenalina, posredstvom  $\beta$ -AR, na zastupljenost Th17 ćelija u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE pacova, u MBP stimulisanim kulturama ovih ćelija izolovanih 7. d.p.i. ispitana je ekspresija gena koji kodira ROR $\gamma$ t (engl. *retinoid-associated orphan receptor  $\gamma$ t*), ključni transkripcioni faktor za diferencijaciju Th17 ćelija, ekspresiju receptora za IL-23 (kritičan za ekspanziju Th17 limfocita) i sekreciju efektorskih citokina ovih ćelija (Ciofani i sar., 2012). Stimulacija ćelija neuroantigenom je povećala količinu iRNK za ROR $\gamma$ t u ćelijama ženki ( $p < 0,001$ ) i mužjaka ( $p < 0,01$ ) izolovanim iz MBP stimulisanih kultura u odnosu na kontrolne kulture ovih ćelija životinja odgovarajućeg pola (Grafik 6). Dodavanjem propranolola u MBP stimulisane kulture, ekspresija iRNK za ROR $\gamma$ t dodatno se

povećala ( $p < 0,001$ ) u kulturama ćelija životinja oba pola (Grafik 6). Vrednost ovog parametra je bila manja u ćelijama mužjaka u odnosu na ćelije ženki, nezavisno od prisustva stimulatora, odnosno propranolola ( $p < 0,05$  u kontrolnim kulturama;  $p < 0,001$  u MBP stimulisanim kulturama) (Grafik 6).



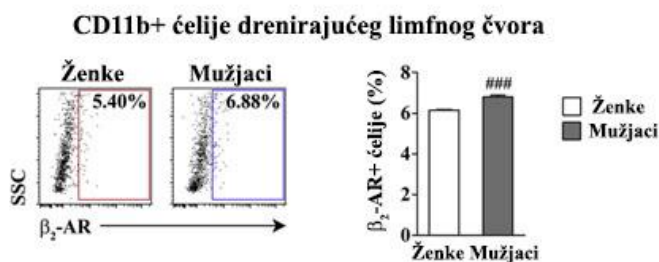
**Grafik 6. Ekspresija iRNA za RORγt u MBP stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Histogram prikazuje relativnu ekspresiju iRNA za RORγt (određena RT-qPCR i prikazana kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na β-aktin) u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova iz kultura ćelija ženki i mužjaka DA pacova (7. d.p.i. EAE), u odsustvu stimulacije (Kontrola) ili stimulisanih sa MBP u odsustvu ili prisustvu  $10^{-5}$  M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNA za RORγt ( $F_{(2,30)} = 11,24$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.3.2.3. Propranolol deluje na CD4+ limfocite u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova pacova kod kojih je indukovano EAE i indirektno, modulišući aktivnost CD11b+ ćelija

##### 4.3.2.3.1. CD11b+ ćelije drenirajućih limfnih čvorova pacova oba pola kod kojih je indukovano EAE ekspimiraju β<sub>2</sub>-AR i imaju sposobnost sinteze noradrenalina

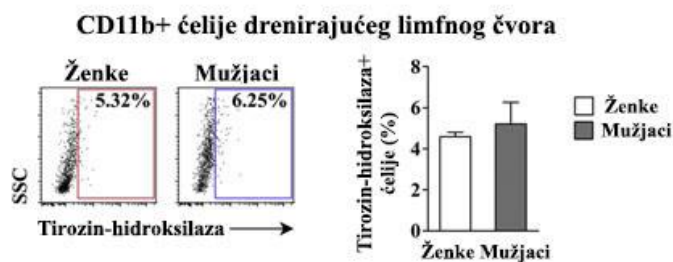
Osim direktno, propranolol bi mogao uticati na diferencijaciju CD4+ T-limfocita i posredno, delovanjem na antigen-prezentujuće ćelije, budući da citokini koje ove ćelije proizvode imaju ključnu ulogu u diferencijaciji CD4+ T-limfocita u Th17 limfocite (Ghoreschi i sar., 2010; McGeachy i sar., 2009).

U skladu sa nekim prethodnim nalazima (Dimitrijević i sar., 2009) pokazano je da CD11b+ antigen-prezentujuće ćelije ženki i mužjaka EAE pacova ekspimiraju β<sub>2</sub>-AR, pri čemu je zastupljenost ćelija koje ispoljavaju ovaj tip receptora bila veća ( $p < 0,001$ ) u populaciji CD11b+ ćelija mužjaka nego ženki (Slika 18).



**Slika 18. Ekspresija β<sub>2</sub>-AR na CD11b+ ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja β<sub>2</sub>-AR+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju β<sub>2</sub>-AR među CD11b+ ćelijama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). ###  $p \leq 0,001$

Da bi odgovorili na pitanje da li noradrenalin na ove ćelije deluje i autokrino, ispitana je ekspresija tirozin-hidroksilaze u ovim ćelijama. Pokazano je da CD11b ćelije sadrže tirozin-hidroksilazu, odnosno poseduju sposobnost biosinteze kateholamina, kod EAE životinja oba pola (Slika 19). Međutim, treba istaći da statistički značajne polne razlike u zastupljenosti ćelija koje pokazuju ekspresiju ovog enzima nisu primećene (Slika 19).



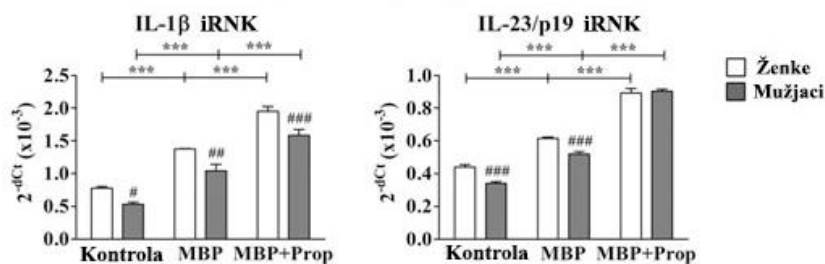
**Slika 19. Ekspresija tirozin-hidroksilaze u CD11b+ ćelijama drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja tirozin-hidroksilaza+ ćelija u okviru CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE. Histogram prikazuje zastupljenost ćelija koje ispoljavaju tirozin-hidroksilazu među CD11b+ ćelijama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6).

4.3.2.3.2. Propranolol povećava ekspresiju gena za citokine od ključnog značaja za diferencijaciju Th17 limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova, ali je ovaj efekat više izražen kod mužjaka

U sledećem koraku, u kulturama ćelija izolovanih 7. d.p.i. EAE iz drenirajućih limfnih čvorova ispitan je uticaj propranolola na ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-23/p19, citokine odgovorne za usmeravanje i održavanje Th17 fenotipa (McGeachy i Cua, 2008).

U poređenju sa kontrolnim ćelijama kultivisanim u odsustvu stimulatora, u MBP stimulisanim kulturama je izmereno povećanje (p < 0,001) količine iRNK za IL-1 $\beta$  u ćelijama životinja oba pola (Grafik 7). Dodatkom propranolola u MBP stimulisane kulture, došlo je do daljeg porasta (p < 0,001) ekspresije gena za IL-1 $\beta$  u ćelijama ženki i mužjaka pacova (Grafik 7). Ekspresija ovog gena bila je manja (p < 0,05) u ćelijama mužjaka u odnosu na ćelije ženki, nezavisno od prisustva stimulatora i/ili propranolola (Grafik 7).

Nivo ekspresije iRNK za IL-23/p19 bio je povećan (p < 0,001) nakon stimulacije neuroantigenom (Grafik 7). Osim toga, uočeno je da je nivo ekspresije ovog citokina bio niži (p < 0,001) u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova mužjaka, bez obzira da li su uzete iz kontrolnih ili MBP stimulisanih kultura (Grafik 7). U MBP stimulisanim kulturama, propranolol je povećao (p < 0,001) ekspresiju iRNK za IL-23/p19 u ćelijama životinja oba pola, u odnosu na nivo ekspresije u MBP stimulisanim kulturama bez propranolola, ali je efekat bio izraženiji u kulturama ćelija mužjaka (Grafik 7). Posledično, ekspresija iRNK za ovaj citokin se nije statistički značajno razlikovala u ćelijama ženki i mužjaka pacova iz MBP stimulisanih kultura kojima je dodat propranolol (Grafik 7).



**Grafik 7. Ekspresija iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 u MBP stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka EAE pacova.** Histogrami prikazuju relativnu ekspresiju iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-23/p19 (određene RT-qPCR i prikazane kao 2<sup>-dCt</sup> u odnosu na  $\beta$ -aktin) u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka DA pacova izolovanih 7. d.p.i. EAE, u odsustvu stimulacije (Kontrola) ili stimulisanih MBP u odsustvu ili prisustvu 10<sup>-5</sup> M propranolola (Prop). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNK za IL-23/p19 ( $F_{(2,30)} = 7,67; p \leq 0,01$ ). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\* p  $\leq$  0,001; # p  $\leq$  0,05; ## p  $\leq$  0,01; ### p  $\leq$  0,001 mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Dobijeni rezultati su potvrdili da noradrenalin može delovati na diferencijaciju Th17 limfocita i posredno, utičući na polarizacioni kapacitet CD11b<sup>+</sup> ćelija.

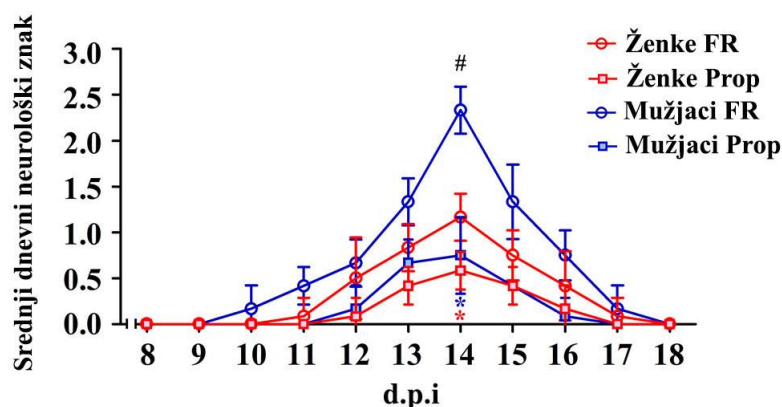
#### **4.4. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na težinu bolesti kod ženki i mužjaka pacova**

Postojeći podaci ukazuju da: (1) je lokalni imunski/inflamatorni odgovor u kičmenoj moždini od ključnog značaja za težinu bolesti (Kawakami i sar., 2004; Nacka-Aleksić i sar., 2015), (2) polne razlike u morfološkim i funkcijskim karakteristikama mikroglije (Han i sar., 2021) mogu doprineti polnim razlikama u neurološkim manifestacijama EAE (Nacka-Aleksić i sar., 2015; Stojić-Vukanić i sar., 2018b), (3) ćelije mikroglije, koje su ključne za oblikovanje imunskog/inflamatornog odgovora u kičmenoj moždini (Brennan i sar., 2022; Sinner i sar., 2023) eksprimiraju funkcionalne  $\beta$ -AR (Tanaka i sar., 2002; Hertz i sar., 2010) i 4) polne razlike postoje i u centralnoj kontroli aktivnosti SNS (Hinojosa-Laborde i sar., 1999). Sledstveno, cilj drugog segmenta studije bio je utvrditi da li razlike u delovanju noradrenalina na aktivnost mikroglije i razvoj neuroinflamacije kod ženki i mužjaka pacova doprinose polnim razlikama u težini neuroloških manifestacija EAE. U tom cilju su pacovi od pojave neuroloških znaka EAE tretirani propranololom.

##### **4.4.1. Tretman propranololom je bio efikasniji u ublažavanju bolesti kod mužjaka nego kod ženki pacova**

Pacovi koji su primali propranolol od 10. d.p.i. EAE, kao i kontrolne životinje, koje su primale fiziološki rastvor, razvili su akutno monofazni oblik EAE, sa vrhuncem bolesti 14. d.p.i. (Grafik 8). Tretman propranololom je ublažio težinu EAE kod pacova oba pola, sudeći prema kraćem (p < 0,05 kod ženki; p < 0,001 kod mužjaka) trajanju bolesti, smanjenom (p < 0,05 kod ženki; p < 0,001 kod mužjaka) maksimalnom neurološkom znaku i smanjenom (p < 0,01 kod ženki; p < 0,001 kod mužjaka) indeksu težine bolesti kod EAE životinja oba pola tretiranih propranololom, u odnosu na kontrolne EAE životinje istog pola tretirane fiziološkim rastvorom (Tabela 4, Grafik 8). Svi efekti tretmana propranololom bili su izraženiji kod mužjaka u odnosu na ženke. Posledično, statistički značajne polne razlike koje su se ogledale u dužem (p < 0,05) trajanju bolesti, većem (p < 0,001) maksimalnom neurološkom znaku i većem (p < 0,01) indeksu težine bolesti kod kontrolnih EAE mužjaka u odnosu na kontrolne EAE ženke, nisu primećene kod pacova tretiranih propranololom (Tabela 4, Grafik 8).





**Grafik 8. Tretman ženki i mužjaka pacova propranololom tokom efektorske faze EAE smanjuje težinu bolesti.** Linijski dijagram predstavlja srednji dnevni neurološki znak EAE ženki i mužjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) od 10. d.p.i. EAE do potpunog oporavka. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$  tretman u poređenju sa kontrolama istog pola; #  $p \leq 0,05$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

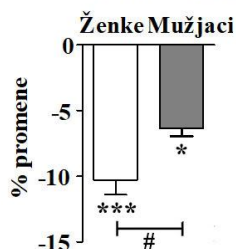
**Tabela 4. Uticaj tretmana propranololom tokom efektorske faze EAE na trajanje bolesti, maksimalni neurološki znak i indeks težine bolesti**

		Trajanje bolesti <sup>a</sup> (dani)	Srednji maksimalni neurološki znak <sup>b</sup>	Indeks težine bolesti <sup>c</sup>
<b>FR</b>	<b>Ženke</b>	4,6 $\pm$ 0,39	1,2 $\pm$ 0,19	0,8 $\pm$ 0,05
	<b>Mužjaci</b>	6,5 $\pm$ 0,49 #	2,3 $\pm$ 0,19 ###	1,1 $\pm$ 0,04 ##
<b>Prop</b>	<b>Ženke</b>	3,3 $\pm$ 0,49 *	0,5 $\pm$ 0,05 *	0,5 $\pm$ 0,01 **
	<b>Mužjaci</b>	3,4 $\pm$ 0,58 ***	0,7 $\pm$ 0,24 ***	0,6 $\pm$ 0,10 ***

<sup>a</sup> Broj dana od pojave prvih neuroloških znaka do potpunog oporavka; <sup>b</sup> suma maksimalnih neuroloških znaka obolelih pacova/broj obolelih pacova; <sup>c</sup> suma neuroloških skorova pacova/broj dana sa neurološkim znacima EAE. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  tretman (Propranolol) u poređenju sa kontrolama (Fiziološki Rastvor) istog pola; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Pokazano je i da 10. d.p.i. EAE postoji značajan gubitak ( $p < 0,001$  kod ženki;  $p < 0,05$  kod mužjaka) telesne mase kod životinja oba pola u odnosu na dan indukcije EAE („nulti“ dan), što je u skladu sa pojavom prvih neuroloških znaka bolesti (Bittner i sar., 2014) (Grafik 9). Ženke su pokazivale značajniji ( $p < 0,05$ ) procentualni gubitak telesne mase 10. d.p.i. EAE od mužjaka (Grafik 9).

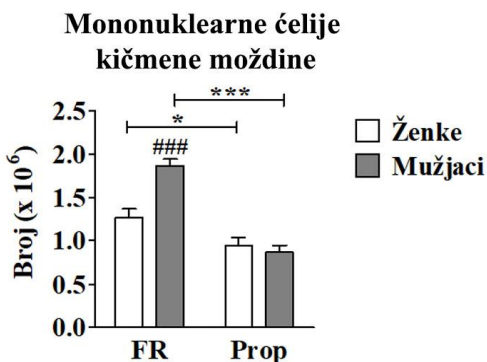
### Gubitak telesne mase



**Grafik 9. Ženke i mužjaci EAE pacova 10. d.p.i. pokazuju značajan gubitak telesne mase.** Histogram prikazuje procenat promene telesne mase pacova 10. d.p.i. EAE u odnosu na masu izmerenu na dan indukcije bolesti (nulti dan). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost + SEM (n = 12). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  10. d.p.i. u poređenju sa nultim danom; #  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4.2. *Tretman propranololom efikasnije smanjuje veličinu mononuklearnog infiltrata u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova*

Težina neurološkog deficita u EAE je proporcionalna stepenu infiltracije kičmene moždine limfocitima i drugim imunskim ćelijama (Constantinescu i sar., 2011). Stoga, ispitan je efekat tretmana propranololom na broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine pacova oba pola žrtvovanih 14. d.p.i. U skladu sa blažom neurološkom slikom, manji ( $p < 0,05$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mužjaka) broj mononuklearnih ćelija izolovan je iz kičmene moždine EAE pacova oba pola tretiranih propranololom, u odnosu na kontrolne životinje istog pola tretirane fiziološkim rastvorom (Grafik 10). Efekat tretmana propranololom bio je izraženiji kod mužjaka, s obzirom na to da se broj mononuklearnih ćelija izolovan iz kičmene moždine EAE ženki i mužjaka tretiranih propranololom nije statistički značajno razlikovao, dok je kod kontrolnih EAE pacova tretiranih fiziološkim rastvorom broj ovih ćelija bio veći ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke (Grafik 10).



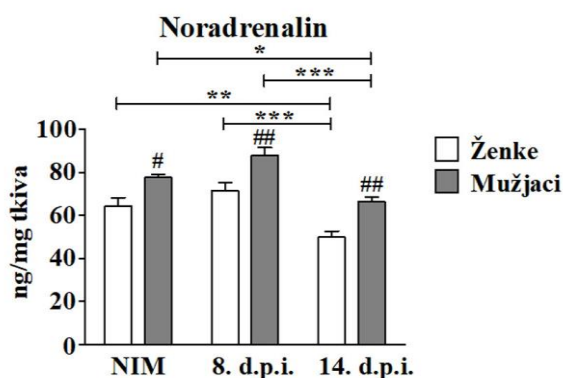
**Grafik 10. Tretman ženki i mužjaka pacova propranololom tokom efektorske faze EAE smanjuje broj mononuklearnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu.** Histogram prikazuje broj mononuklearnih ćelija izdvojenih 14. d.p.i. EAE iz kičmene moždine ženki i mužjaka DA pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR). Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na broj ćelija ( $F_{(1,20)} = 14,58$ ;  $p \leq 0,01$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.5. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu i ekspresiji $\beta_2$ -AR na CD11b+ ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka EAE pacova

Kako bi se utvrdilo da li se polne razlike u aktivnosti SNS (Hinojosa-Laborde i sar., 1999) mogu povezati sa polnim razlikama u težini neurološke slike EAE, i sledstveno, onim u efikasnosti antagonista  $\beta$ -AR u kontroli razvoja bolesti, ispitana je koncentracija noradrenalina u tkivu kičmene moždine i ekspresija  $\beta$ -AR na površini CD11b+ ćelija (većinski mikroglia) zdravih životinja i EAE pacova.

##### 4.5.1. Koncentracija noradrenalina u tkivu kičmene moždine

Kod mužjaka pacova, pokazana je veća koncentracija noradrenalina u kičmenoj moždini u odnosu na ženke, kod neimunizovanih kontrolnih životinja ( $p < 0,05$ ), u induktivnoj fazi EAE, 8. d.p.i. ( $p < 0,01$ ), i na vrhuncu bolesti, 14. d.p.i. ( $p < 0,01$ ) (Grafik 11). Kod životinja oba pola, koncentracija noradrenalina u tkivu kičmene moždine u induktivnoj fazi EAE nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na zdrave neimunizovane kontrole, ali se na vrhuncu bolesti smanjila u odnosu na kontrolne neimunizovane životinje ( $p < 0,01$  kod ženki;  $p < 0,05$  kod mužjaka) i životinja u induktivnoj fazi bolesti ( $p < 0,001$ ) (Grafik 11).

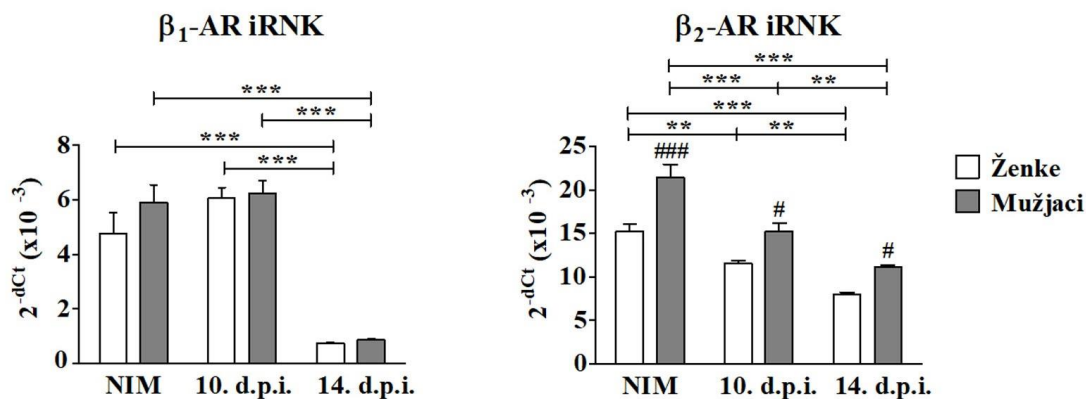


**Grafik 11. Promene u koncentraciji noradrenalina u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka EAE pacova.** Histogram prikazuje koncentraciju noradrenalina u tkivu kičmene moždine DA pacova u induktivnoj fazi EAE (8. d.p.i.), na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.), kao i kontrolnih neimunizovanih (NIM) pacova. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

##### 4.5.2. Ekspresija $\beta_2$ -AR na membrani CD11b+ ćelija kičmene moždine

S obzirom na to da ćelije mikroglije ne ekspimiraju  $\beta_3$ -AR, već samo  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR (Tanaka i sar., 2002; Sugama i sar., 2019), ispitana je ekspresija iRNK za ove receptore u CD11b+ ćelijama kičmene moždine EAE pacova (10. i 14. d.p.i.) i kontrolnih neimunizovanih životinja. U ovoj grupi eksperimenata, ekspresija receptora je ispitana 10. d.p.i. EAE jer je ova vremenska tačka, kada se pojavljuju najraniji pokazatelji bolesti, određena za početak tretmana propranololom. Statistički značajne polne razlike u ekspresiji iRNK za  $\beta_1$ -AR u CD11b+ ćelijama kičmene moždine nisu uočene kod neimunizovanih kontrolnih, niti kod EAE životinja (Grafik 12). U odnosu na neimunizovane životinje, ekspresija gena za  $\beta_1$ -AR nije se statistički značajno promenila u odnosu na 10. d.p.i. EAE, dok je na vrhuncu bolesti ona bila značajno smanjena ( $p < 0,05$ ) kod pacova oba pola (Grafik 12). Takođe, CD11b+ ćelije izolovane 14. d.p.i. iz kičmene moždine i mužjaka i ženki pokazivale su manju ( $p < 0,001$ ) ekspresiju ovog receptora u odnosu na ćelije izolovane 10. d.p.i. iz životinja odgovarajućeg pola (Grafik 12).

Pokazano je da mužjaci imaju veću ekspresiju iRNK za  $\beta_2$ -AR u CD11b+ ćelijama kičmene moždine kako u grupi zdravih neimunizovanih ( $p < 0,001$ ), tako i u grupama EAE životinja ( $p < 0,05$ ) (Grafik 12). Kod životinja oba pola primećeno je progresivno smanjenje ekspresije iRNK za  $\beta_2$ -AR u ovim ćelijama tokom razvoja bolesti (Grafik 12). Tako je, u odnosu na neimunizovane kontrolne životinje odgovarajućeg pola, ona bila manja i 10 d.p.i ( $p < 0,01$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mužjaka) i 14. d.p.i. ( $p < 0,001$ ) EAE (Grafik 12). Ekspresija gena za  $\beta_2$ -AR u CD11b+ ćelijama izolovanim iz kičmene moždine 14. d.p.i. bila je niža ( $p < 0,01$ ) u odnosu na ekspresiju u ćelijama izolovanim 10. d.p.i. kod ženki i kod mužjaka pacova (Grafik 12).



**Grafik 12. Ekspresija iRNK za  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR u CD11b+ ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka EAE pacova.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK za  $\beta_1$ -AR (levo) i  $\beta_2$ -AR (desno) u CD11b+ ćelijama kičmene moždine DA pacova 10. d.p.i. EAE, kada se pojavljuju prvi pokazatelji bolesti, na vrhuncu bolesti (14. d.p.i.), kao i kontrolnih neimunizovanih (NIM) pacova. Ekspresija iRNK je određena pomoću RT-qPCR i prikazana kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

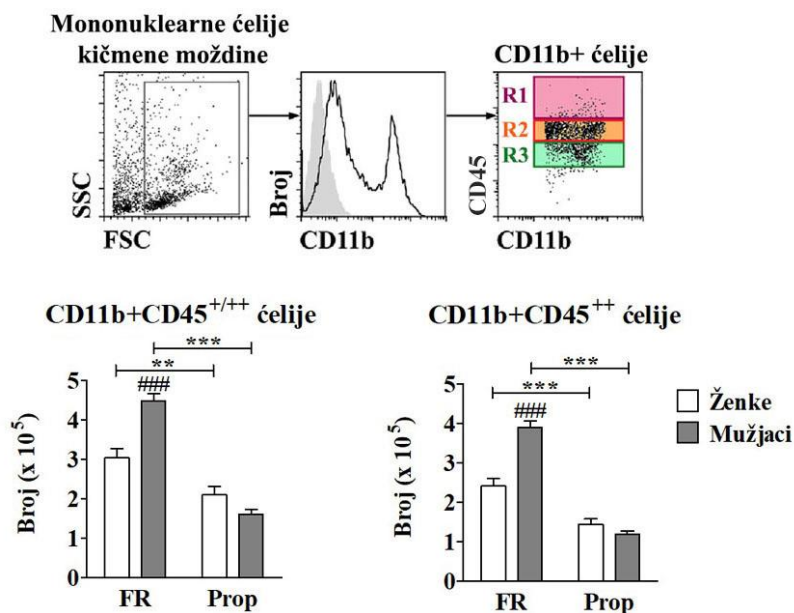
#### 4.6. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike ćelija mikroglije u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova na vrhuncu bolesti

Imajući u vidu značaj mikrosredine ciljnog organa za određivanje težine EAE (Kawakami i sar., 2004), pri čemu se mikrogliji pripisuje presudan značaj u kontroli autoimunske neuroinflamacije u multiploj sklerozi i EAE (Shin i sar., 2012; Thompson i Tsirka, 2017), ispitani su i efekti tretmana propranololom na aktivacioni status mikroglije kičmene moždine, kao i fenotipski i funkcijski profil ovih ćelija.

##### 4.6.1. Tretman propranololom efikasnije smanjuje broj ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti

S obzirom na to da je broj aktiviranih ćelija mikroglije u korelaciji sa težinom neurološke slike EAE (Benusa i Lafrenaye, 2020), ispitano je uticaj tretmana propranololom na broj ovih ćelija u kičmenoj moždini pacova oba pola. Ćelije mikroglije su identifikovane na osnovu površinske ekspresije molekula CD11b, konstitutivnog markera mijeloidnih ćelija (Graber i sar., 2010), i molekula CD45, čiji nizak ili umeren nivo ekspresije razdvaja populacije neaktivne ( $CD45^+$ ) i aktivirane ( $CD45^{++}$ ) mikroglije od ćelija monocitnog porekla, sa najvišom ekspresijom CD45 ( $CD45^{+++}$ ) (Almolda i sar., 2009). Na osnovu nivoa ekspresije CD45 molekula na membrani CD11b+ ćelija kičmene moždine neimunizovanih kontrolnih životinja postavljena je granica za razdvajanje ćelija mikroglije od  $CD45^{+++}$  makrofaga i dendritskih ćelija, koje su kod ovih životinja slabo zastupljene (Almolda i sar., 2009; Djikić i sar., 2014).

Na vrhuncu EAE, veći ( $p < 0,001$ ) ukupan broj ćelija mikroglije ( $CD11b+CD45^{+/+}$ ), kao i veći ( $p < 0,001$ ) broj ćelija aktivirane mikroglije ( $CD11b+CD45^{++}$ ) izolovan je iz kičmene moždine kontrolnih mužjaka pacova tretiranih fiziološkim rastvorom, u odnosu na kontrolne ženke (Slika 20). Tretman propranololom je smanjio ukupan broj ćelija mikroglije i kod EAE ženki ( $p < 0,01$ ) i kod mužjaka ( $p < 0,001$ ) pacova i broj ćelija aktivirane mikroglije ( $p < 0,001$ ) u kičmenoj moždini životinja oba pola (Slika 20). Efekat je bio izraženiji kod EAE mužjaka, pa kod pacova tretiranih propranololom nije zabeležena statistički značajna polna razlika ni u broju ukupnih ćelija mikroglije, ni u broju aktiviranih ćelija mikroglije u kičmenoj moždini (Slika 20).



**Slika 20. Tretman propranololom u efektorskoj fazi EAE efikasnije smanjuje broj ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.**

Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski profili prikazuju strategiju izdvajanja (levi) mononuklearnih ćelija kičmene moždine, (srednji)  $CD11b+$  ćelija među njima i (desni)  $CD45+$  ćelija u okviru populacije  $CD11b+$  ćelija kičmene moždine.  $CD45+$  ćelije podeljene su u tri regiona (R1-3) prema nivou ekspresije  $CD45$ . R1 obuhvata  $CD45^{+++}$  ćelije monocitnog porekla, a granica ovog regiona je postavljena na osnovu nivoa ekspresije  $CD45$  u  $CD11b+$  ćelijama kičmene moždine neimunizovanih kontrolnih pacova. R2 ( $CD45^{++}$ ) i R3 ( $CD45^{+}$ ) obuhvataju mikrogliju, pri čemu se u okviru R2 nalaze ćelije aktivirane mikroglije. Na histogramima je prikazan (levo) broj ćelija mikroglije i (desno) broj ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ukupan broj ćelija mikroglije ( $F_{(1,20)} = 23,76; p \leq 0,001$ ) i broj aktivirane mikroglije ( $F_{(1,20)} = 32,24; p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

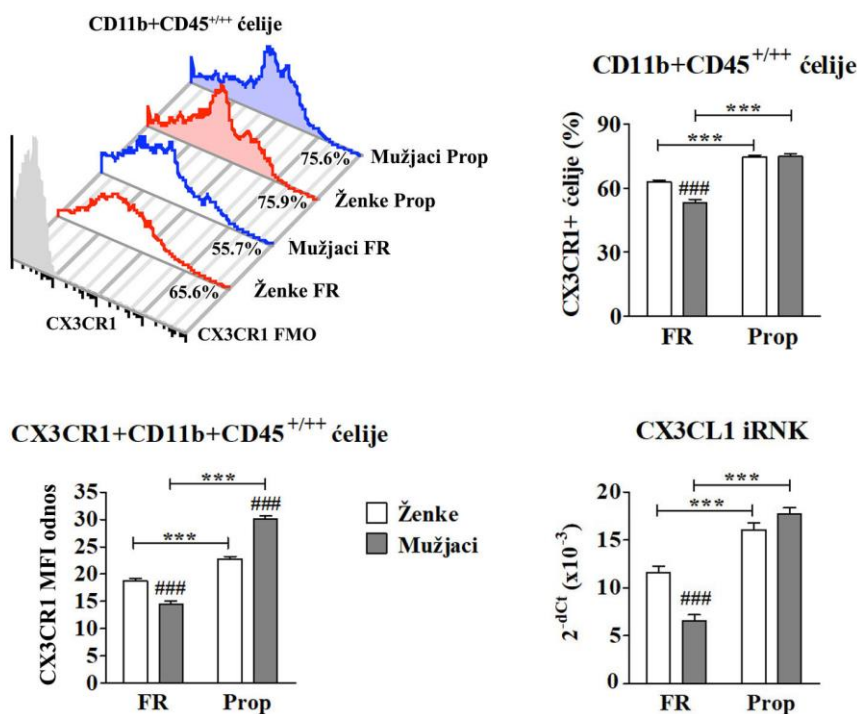
#### 4.6.1.1. Tretman propranololom efikasnije stimuliše aktivnost CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalne osovine u ćelijama mikroglije mužjaka nego ženki pacova

Hemokin CX3C ligand 1 (engl. *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*; CX3CL1), poznat i kao fraktalkin, vezuje se za CX3C hemokinski receptor 1 (engl. *CX3C motif chemokine receptor 1*; CX3CR1) koji je eksprimiran isključivo na mikrogliji, a signalizacija koju pokreće aktivacija ovog receptora ima ključnu ulogu u suzbijanju neuroinflamacije (Wolf i sar., 2013; Lastres-Becker i sar.,

2014). Stoga je praćen efekat tretmana propranololom na zastupljenost ćelija mikroglije koje na membrani poseduju CX3CR1 u kičmenoj moždini pacova oba pola na vrhuncu EAE.

Procentualna zastupljenost ćelija koje na membrani ekspimiraju CX3CR1 u okviru mikroglije kičmene moždine izolovane na vrhuncu EAE, kao i gustina ovog receptora na membrani ovih ćelija (sudeći prema vrednostima MFI odnosa za CX3CR1, videti poglavlje Materijal i metode), bila je manja ( $p < 0,001$ ) kod kontrolnih EAE mužjaka u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 21). Propranolol je povećao ( $p < 0,001$ ) procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru mikroglije, i MFI odnos za ovaj receptor na njima, kod životinja oba pola (Slika 21). Ovaj efekat je bio izraženiji kod mužjaka u odnosu na ženke (Slika 21). Sledstveno, kod pacova koji su tretirani propranololom nije zabeležena statistički značajna polna razlika u procentualnoj zastupljenosti CX3CR1+ ćelija u okviru mikroglije, dok je gustina membranske ekspresije CX3CR1 ovih ćelija kod tretiranih mužjaka čak bila veća ( $p < 0,001$ ) u odnosu na ženke (Slika 21).

Ispitani su i efekti propranolola na ekspresiju CX3CL1, liganda za CX3CR1, u tkivu kičmene moždine pacova oba pola na vrhuncu bolesti. Tretman propranololom je kod pacova oba pola povećao ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za CX3CL1 u tkivu kičmene moždine (Slika 21). Efekat tretmana propranololom bio je izraženiji kod EAE mužjaka u odnosu na ženke, pa iako su kod kontrolnih EAE životinja tretiranih fiziološkim rastvorom mužjaci pokazivali manju ( $p < 0,001$ ) ekspresiju gena za CX3CL1 u kičmenoj moždini u odnosu na ženke, u mikrogliji EAE pacova tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u vrednostima ovog parametra (Slika 21).



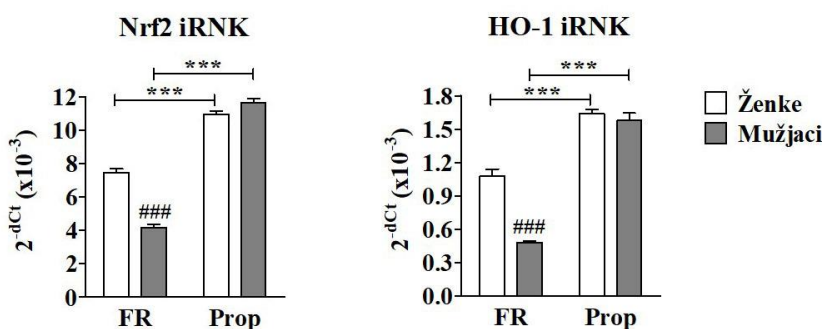
**Slika 21. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije povećava ekspresiju CX3CR1 na ćelijama mikroglije mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** Protočno-citofluorimetrijski histogrami prikazuju strategiju izdvajanja CX3CR1+ ćelija (uz pomoć FMO kontrole) u okviru CD11b+CD45<sup>+/+</sup> ćelija mikroglije kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Histogrami prikazuju (gore

desno) procentualnu zastupljenost CX3CR1+ ćelija u okviru mikroglije kičmene moždine, (dole levo) gustinu CX3CR1 na membrani ćelija mikroglije (CX3CR1 MFI odnos, dobijen prema objašnjenju u poglavlju Materijal i metode), i (dole desno) ekspresiju iRNK za CX3CL1 (određenu RT-qPCR i prikazanu kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin) u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka kontrolnih i pacova tretiranih propranololom u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost CX3CR1+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 20,00$ ;  $p \leq 0,001$ ), CX3CR1 MFI odnos ( $F_{(1,20)} = 140,63$ ;  $p \leq 0,001$ ) i ekspresiju CX3CL1 iRNK ( $F_{(1,20)} = 24,35$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

Poznato je da prenos signala posredstvom CX3CR1 receptora reguliše ekspresiju transkripcionog faktora Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), koji (1) pokreće ekspresiju enzima hem-oksigenaze 1 (engl. *heme oxigenase 1*; HO-1), i na taj način smanjuje aktivaciju mikroglije i produkciju proinflamatornih citokina (Lastres-Becker i sar., 2014; Cuadrado i Rojo, 2008), (2) može uticati i na efikasnost fagocitoze, regulacijom ekspresije TAM (engl. *Tyros3, Axl, and Mertk*) receptora, koji su ključni u kontroli ovog procesa (Ji i sar., 2015; Castro-Sánchez i sar., 2019). Imajući ovo u vidu, ispitana je ekspresija Nrf2 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine pacova, koje većinski predstavljaju CD45<sup>+/+</sup> mikrogliju, što se vidi na Slici 20.

U skladu sa efektima na CX3CL1/CX3CR1 hemokinsku osovinu, tretman propranololom je povećao ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za Nrf2 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine kod EAE pacova oba pola, u odnosu na odgovarajuće kontrolne EAE životinje tretirane fiziološkim rastvorom (Grafik 13). Ovaj efekat je bio izraženiji kod mužjaka, pa u ćelijama pacova tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike, dok su kod kontrolnih EAE životinja CD11b+ ćelije mužjaka pokazivale značajno manju ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za Nrf2 u odnosu na ove ćelije ženki (Grafik 13).

Slični nalazi su dobijeni ispitivanjem ekspresije iRNK za HO-1. Ona je bila manja ( $p < 0,001$ ) u CD11b+ ćelijama kičmene moždine kontrolnih EAE mužjaka u poređenju sa ovim ćelijama izolovanim iz kontrolnih EAE ženki (Grafik 13). Propranolol je u CD11b+ ćelijama pacova oba pola povećao ( $p < 0,001$ ) ekspresiju gena za HO-1, s tim da je ovaj efekat bio izraženiji kod mužjaka, pa u ćelijama životinja tretiranih propranololom nisu nađene statistički značajne polne razlike u ekspresiji ovog enzima (Grafik 13).



**Grafik 13. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije povećava ekspresiju iRNK za Nrf2 i HO-1 u CD11b+ ćelijama mikroglije mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK (određenu RT-qPCR i prikazanu kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin) za (levo) Nrf2 i (desno) HO-1 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNK za Nrf2 ( $F_{(1,20)}$

= 96,06;  $p \leq 0,001$ ) i HO-1 ( $F_{(1,20)} = 28,46$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.6.1.2. Tretman propranololom polno-specifično utiče na aktivnost Stat3/Socs3 signalne osovine u ćelijama mikroglije

Postoje podaci da stimulacija  $\beta$ -AR može i drugim mehanizmima, nezavisno od onih koji podrazumevaju aktivaciju CX3CL1/CX3CR1 osovine, da aktivira makrofage/mikrogliju i podstakne produkciju proinflamatornih citokina kao što je IL-1 $\beta$  (Tanaka i sar., 2002; Tan i sar., 2007), ali i da utiče na fagocitozu (Rossi i sar., 1998). Sledstveno, postavilo se pitanje da li su efekti tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na fenotip i funkciju mikroglije, barem delimično, posledica delovanja nezavisnog od CX3CL1/CX3CR1 signalne osovine. U svetlu podataka da noradrenalin pojačava ekspresiju/aktivnost prenosioca signala i aktivatora transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*; Stat3), čija uslovna delecija u mijeloidnim ćelijama poništava simptome EAE (Landen i sar., 2007; Lu i sar., 2020), ispitano je delovanje propranolola na ekspresiju iRNK za Stat3 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine pacova oba pola izolovanim 14. d.p.i. EAE.

Tretman propranololom je smanjio ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za Stat3 u CD11b+ ćelijama EAE životinja oba pola u odnosu na odgovarajuće kontrolne EAE životinje tretirane fiziološkim rastvorom (Grafik 14). Efekat propranolola je bio izraženiji kod EAE mužjaka, pa među tretiranim pacovima nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u vrednostima ovog parametra, iako su kod kontrolnih EAE životinja CD11b+ ćelije mužjaka imale veću ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za Stat3 u odnosu na ćelije ženki (Grafik 14).

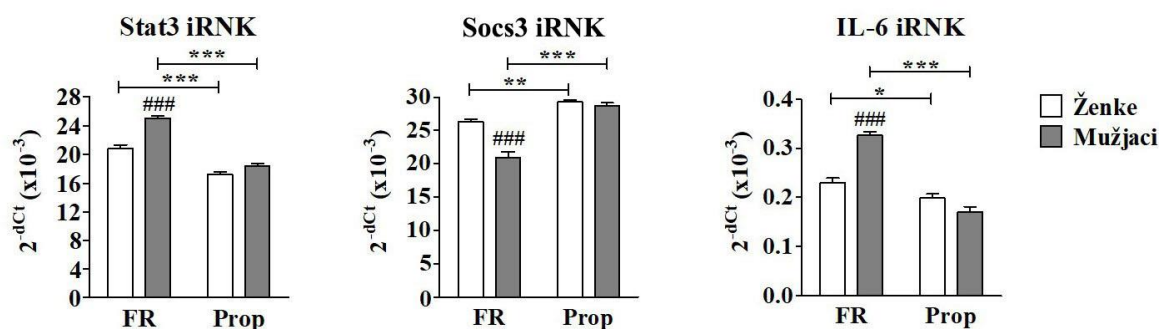
Budući da supresor citokinske signalizacije 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling 3*; Socs3) negativno reguliše aktivaciju Stat3 u mijeloidnim ćelijama (Stark i Darnell, 2012), i da ima značajnu ulogu u regulaciji neuroinflamacije (Qin i sar., 2012), ispitano je i delovanje propranolola na ekspresiju gena za ovaj transkripcioni faktor u CD11b+ ćelijama kičmene moždine pacova.

Ekspresija iRNK za Socs3 je bila manja ( $p < 0,001$ ) u CD11b+ ćelijama kontrolnih EAE mužjaka pacova u poređenju sa EAE ženkama tretiranim fiziološkim rastvorom (Grafik 14). Propranolol je povećao i kod EAE ženki ( $p < 0,01$ ) i kod EAE mužjaka ( $p < 0,001$ ) ekspresiju ovog gena u CD11b+ ćelijama kičmene moždine, i to izraženije kod mužjaka, tako da kod CD11b+ ćelija EAE pacova tretiranih propranololom nisu nađene statistički značajne polne razlike u nivou njegove ekspresije (Grafik 14).

Budući da Socs3 ostvaruje svoj efekat na transkripcionu aktivaciju Stat3 uglavnom posredstvom mehanizma zavisnog od IL-6 (Tanaka i sar., 2014), u sledećem koraku su ispitane promene u ekspresiji gena za IL-6 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine pacova oba pola u odgovoru na tretman propranololom.

Tretman propranololom je smanjio i kod EAE ženki ( $p < 0,05$ ) i kod EAE mužjaka ( $p < 0,001$ ) nivo ekspresije iRNK za IL-6 u CD11b+ ćelijama u odnosu na ćelije odgovarajućih kontrolnih EAE životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (Grafik 14). Ovaj efekat je bio izraženiji kod EAE mužjaka u odnosu na ženke EAE pacova (Grafik 14). Posledično, iako su ćelije kontrolnih EAE mužjaka pokazivale veću ( $p < 0,001$ ) ekspresiju gena za IL-6 u odnosu na ćelije ženki, kod EAE pacova tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike (Grafik 14).





**Grafik 14. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE polno-specifično utiče na aktivnost Stat3/Socs3 signalne osovine u ćelijama mikroglije pacova na vrhuncu bolesti.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK (određenu RT-qPCR i prikazanu kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin) za (levo) Stat3, (sredina) Socs3 i (desno) IL-6 u CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNK za Stat3 ( $F_{(1,20)} = 12,76$ ;  $p \leq 0,01$ ), Socs3 ( $F_{(1,20)} = 19,66$ ;  $p \leq 0,001$ ) i IL-6 ( $F_{(1,20)} = 45,04$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti + SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.6.2. Tretman propranololom efikasnije stimuliše diferencijaciju ćelija mikroglije anti-inflamatornog fenotipa kod mužjaka nego kod ženki pacova

Aktivirana mikroglija pokazuje izuzetnu plastičnost tokom razvoja autoimunosti u CNS koja se manifestuje prelaskom iz stanja klasične aktivacije, karakterističnog po oslobađanju medijatora koji podstiču neuroinflamaciju i usporavaju procese reparacije u kičmenoj moždini, u stanje alternativne aktivacije koje podstiče rezoluciju lokalne inflamacije i reparaciju tkiva, oslobađanjem anti-inflamatornih medijatora i trofičkih faktora (Hu i sar., 2015; Giles i sar., 2018). Stoga je u daljem istraživanju određen efekat tretmana propranololom na fenotip i funkcijske karakteristike ćelija mikroglije kičmene moždine.

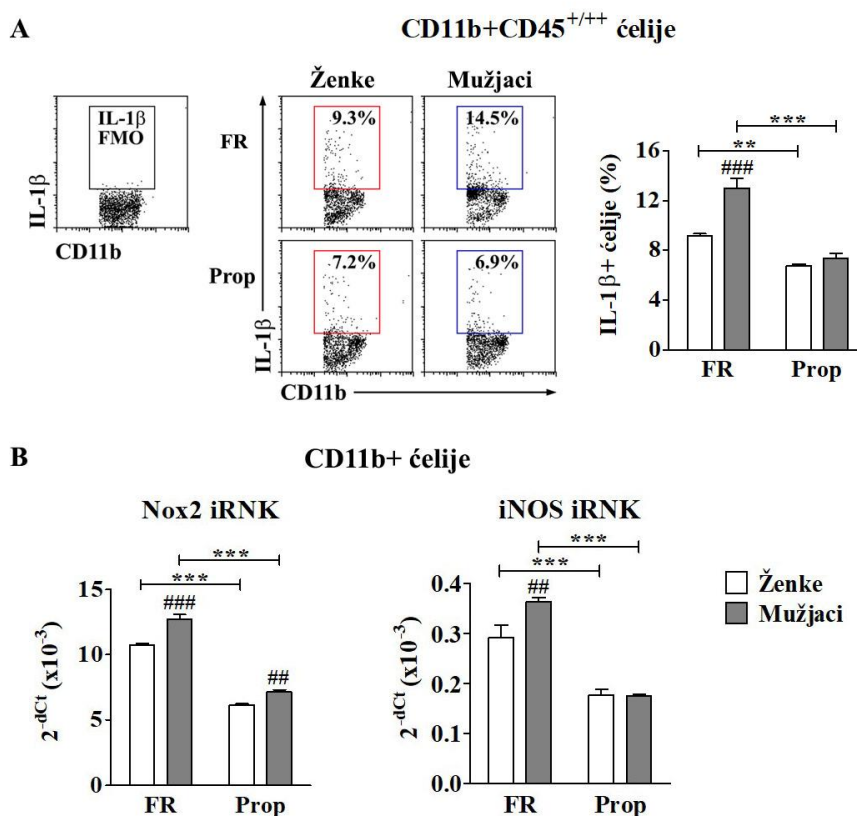
##### 4.6.2.1. Tretman propranololom efikasnije smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego u mikrogliji ženki pacova

Primena propranolola je kod EAE ženki ( $p < 0,01$ ) i kod EAE mužjaka ( $p < 0,001$ ) smanjila procentualnu zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-1 $\beta$ , ključni proinflamatorni citokin u regulaciji neuroinflamacije (Basu i sar., 2004), u okviru CD11b+CD45<sup>+/+</sup> ćelija mikroglije kičmene moždine (Slika 22A). Ovaj efekat je bio izraženiji kod EAE mužjaka, pa se, za razliku od EAE kontrolnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, kod kojih je njihova procentualna zastupljenost bila veća ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke, ona nije statistički značajno razlikovala između ženki i mužjaka tretiranih propranololom (Slika 22A).

Osim toga, tretman propranololom je kod EAE pacova oba pola u izolovanim CD11b+ ćelijama kičmene moždine, koje dominantno čini mikroglija, smanjio ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za NADPH-oksidadazu (Nox2), enzim uključen u stvaranje reaktivnih oblika kiseonika koji doprinose oštećenju tkiva i pogoršavaju kliničku sliku EAE/multiple skleroze (Zeng i sar., 2014; Choi i sar., 2015; Adamczyk i Adamczyk-Sowa, 2016) (Slika 22B). U CD11b+ ćelijama EAE mužjaka pokazana je veća ekspresija gena za Nox2 i kod kontrolnih ( $p < 0,001$ ) i kod pacova tretiranih propranololom ( $p < 0,01$ ), u odnosu na odgovarajuće ćelije EAE ženki (Slika 22B).

U CD11b+ ćelijama kičmene moždine EAE pacova ispitana je i ekspresija iRNK za iNOS, enzim koji učestvuje u sintezi potencijalno citotoksičnog NO iz L-arginina (Vuolteenaho i sar.,

2009), i predstavlja klasičan marker proinflamatorne mikroglije (Mammana i sar., 2018). Tretman propranololom je smanjio ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za iNOS u CD11b+ ćelijama i ženki i mužjaka EAE pacova u odnosu na kontrolne životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 22B). Ovaj efekat propranolola je bio izraženiji kod EAE mužjaka nego kod ženki, na šta ukazuje činjenica da se ekspresija ovog enzima, koja je bila veća ( $p < 0,01$ ) u ćelijama kontrolnih mužjaka u odnosu na kontrolne ženke, nije statistički značajno razlikovala između ženki i mužjaka tretiranih propranololom (Slika 22B).



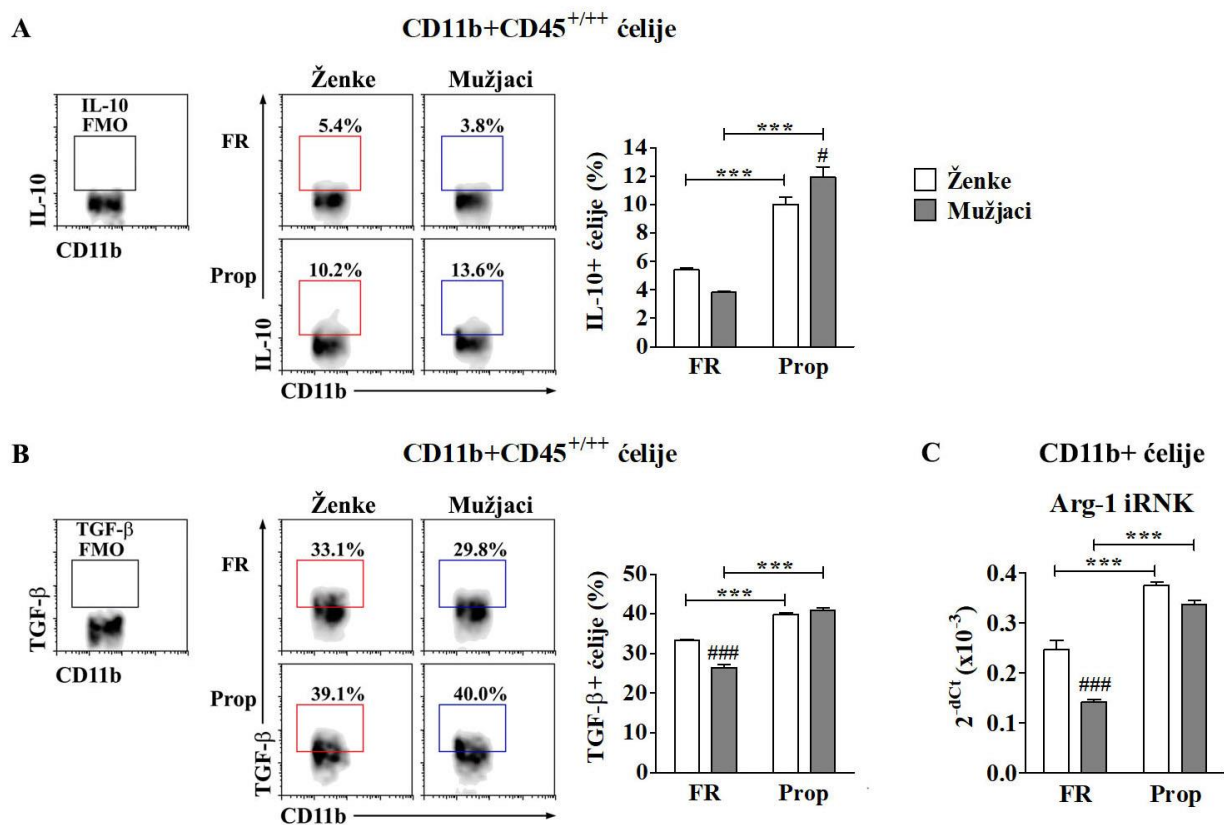
**Slika 22. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** (A) Reprerentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili prikazuju strategiju izdvajanja IL-1β ćelija (uz pomoć FMO kontrole) u okviru CD11b+CD45<sup>+/+</sup> ćelija mikroglije kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost IL-1β+ ćelija u okviru mikroglije. (B) Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK (određenu RT-qPCR i prikazanu kao 2<sup>-dCt</sup> u odnosu na β-aktin) za (levo) Nox2 i (desno) iNOS u CD11b+ ćelijama kičmene moždine. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost IL-1β+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 12,36; p \leq 0,01$ ), i ekspresiju iRNK za Nox2 ( $F_{(1,20)} = 6,11; p \leq 0,05$ ) i iNOS ( $F_{(1,20)} = 5,99; p \leq 0,05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ##  $p \leq 0,01$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.6.2.2. Tretman propranololom efikasnije povećava ekspresiju anti-inflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego ženki pacova

U sledećem koraku, ispitana je sinteza anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF-β, od presudnog značaja u ograničavanju neuroinflamacije (Ramírez i sar., 2005; Saud i sar., 2005; Lobo-

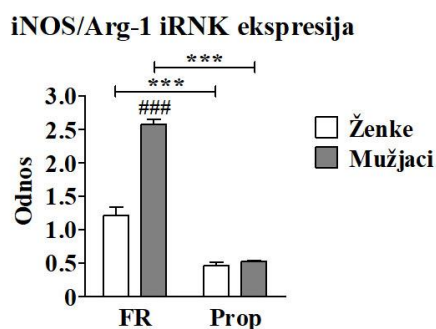
Silva i sar., 2016), u CD11b+CD45<sup>+/+</sup> ćelijama mikroglije izolovanim na vrhuncu EAE iz kičmene moždine pacova tretiranih propranololom i kontrolnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom. Tretman propranololom je povećao ( $p < 0,001$ ) procentualnu zastupljenost ćelija koje sintetišu IL-10, kao i onih koje sintetišu TGF- $\beta$ , u okviru mikroglije kod EAE životinja oba pola (Slika 23A,B). Ovi efekti su bili izraženiji kod EAE mužjaka u odnosu na ženke. Stoga je kod EAE pacova koji su tretirani propranololom procentualna zastupljenost ćelija koje sadrže IL-10 bila veća ( $p < 0,05$ ) u mikrogliji mužjaka u odnosu na ženke (Slika 23A). U kontekstu polnog dimorfizma važno je naglasiti da kod kontrolnih EAE životinja nije zabeležena statistički značajna polna razlika u procentualnoj zastupljenosti ovih ćelija u okviru mikroglije (Slika 23A). Nasuprot ovome, procentualna zastupljenost ćelija koje proizvode TGF- $\beta$  u okviru mikroglije EAE kontrolnih životinja bila je manja ( $p < 0,001$ ) kod mužjaka u odnosu na ženke, dok kod pacova koji su tretirani propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u procentualnoj zastupljenosti TGF- $\beta$ + ćelija u okviru mikroglije (Slika 23B).

U CD11b+ ćelijama kičmene moždine merena je i ekspresija iRNK za Arg1, enzim koji za supstrat koristi L-arginin i koji, kroz kompeticiju sa iNOS, može inhibirati sintezu NO (Hesse i sar., 2001; Quirié i sar., 2013), a smatra se tipičnim markerom anti-inflamatorne mikroglije (Shin i sar., 2012; Thompson i Tsirka, 2017). Tretman propranololom je kod EAE pacova oba pola povećao ( $p < 0,001$ ) ekspresiju iRNK za Arg1 u CD11b+ ćelijama kičmene moždine (Slika 23C). Efekat tretmana propranololom bio je izraženiji kod mužjaka u odnosu na ženke, pa iako su kod kontrolnih EAE životinja, tretiranih fiziološkim rastvorom, CD11b+ ćelije mužjaka pokazivale manju ekspresiju gena za Arg1 u odnosu na ćelije ženki, kod ćelija EAE pacova tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike (Slika 23C).



**Slika 23. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije povećava ekspresiju anti-inflamatornih citokina/enzima u mikrogliji mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski gustinski profili predstavljaju strategiju izdvajanja (uz pomoć FMO kontrola), a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) IL-10<sup>+</sup> ćelija i (B) TGF-β<sup>+</sup> ćelija u okviru CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+/++</sup> ćelija mikroglije kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. (C) Histogram pokazuje ekspresiju iRNK za Arg1 (određenu RT-qPCR i prikazanu kao 2<sup>-dCt</sup> u odnosu na β-aktin) u CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost IL-10<sup>+</sup> ćelija ( $F_{(1,20)} = 14,23; p \leq 0,01$ ) i TGF-β<sup>+</sup> ćelija ( $F_{(1,20)} = 39,57; p \leq 0,001$ ), kao i ekspresiju iRNK za Arg1 ( $F_{(1,20)} = 8,98; p \leq 0,01$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\* p ≤ 0,001; # p ≤ 0,05, ### p ≤ 0,001 mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

U skladu sa činjenicom da su iNOS i Arg1 u kompeticiji za isti supstrat, odnos ekspresije iNOS/Arg1 široko je prihvaćen kao indikator inflamatornog statusa mikroglije (Corraliza i sar., 1995). Kao što je očekivano iz prethodnih nalaza, primena propranolola je smanjila ( $p < 0,001$ ) količnik ekspresije iNOS/Arg1 iRNK u CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine EAE pacova oba pola, u odnosu na ćelije odgovarajućih kontrolnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (Grafik 15). Efekat je bio izraženiji kod mužjaka, pa kod EAE pacova tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u ovom parametru, iako su kod EAE kontrolnih životinja CD11b<sup>+</sup> ćelije mužjaka imale značajno veći ( $p < 0,001$ ) količnik ekspresije iNOS/Arg1 iRNK u odnosu na ćelije ženki (Grafik 15).



**Grafik 15. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije smanjuje količnik ekspresije iNOS/Arg1 u CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** Histogram prikazuje odnos ekspresije iRNK za iNOS i Arg1 u CD11b<sup>+</sup> ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na odnos ekspresije iNOS/Arg1 iRNK ( $F_{(1,20)} = 80,62; p \leq 0,001$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n = 6). \*\*\* p ≤ 0,001; ### p ≤ 0,001 mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

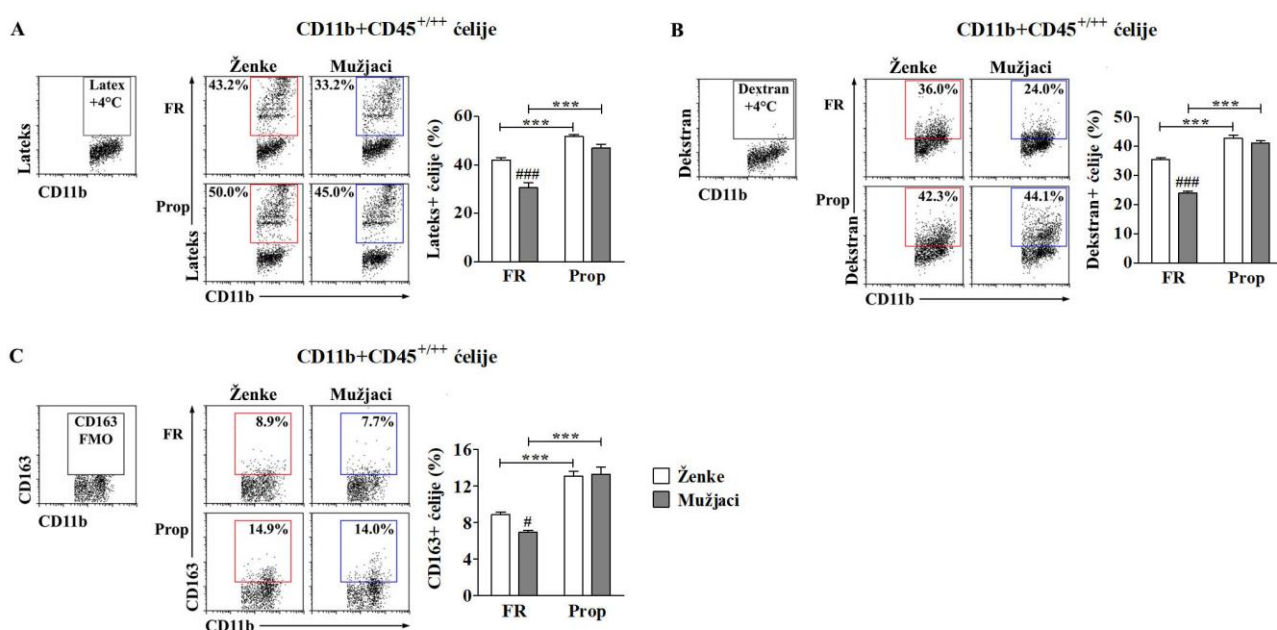
#### 4.6.2.3. Tretman propranololom snažnije podstiče sposobnost mikroglije za fagocitozu i endocitozu kod mužjaka nego kod ženki pacova

Imajući u vidu prethodne nalaze koji ukazuju da propranolol podstiče anti-inflamatorni/protektivni aktivacioni status mikroglije, kao i podatke da je ekspresija Arg1 povezana sa uklanjanjem mrtvih/umirućih ćelija fagocitozom, te rezolucijom inflamacije (Cai i sar., 2019), ispitano je da li se ovaj efekat ogleda i u sposobnosti mikroglije kičmene moždine da fagocituje fluorescentne čestice lateksa i vrši endocitozu dekstrana posredstvom manoznog receptora.

Mikroglija (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+/++</sup> ćelije) kontrolnih mužjaka na vrhuncu EAE bila je manje efikasna ( $p < 0,001$ ) u fagocitozi čestica lateksa i endocitozi dekstrana u odnosu na odgovarajuće

ćelije izolovane iz ženki (Slika 24A,B). Tretman propranololom je kod EAE životinja oba pola povećao ( $p < 0,001$ ) zastupljenost ćelija koje sadrže čestice lateksa ili dekstran u okviru mikroglije u odnosu na kontrolne pacove istog pola tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 24A,B). Ovaj efekat propranolola je bio izraženiji kod EAE mužjaka, pa kod EAE životinja tretiranih propranololom nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u ispitivanim parametrima koje su primećene u EAE kontrolnoj grupi (Slika 24A,B).

Ekspresija CD163 molekula na ćelijama mikroglije povezuje se sa fagocitozom apoptotičnih/nekrotičnih ćelija (Zhang i sar., 2011), i smatra se jednim od markera anti-inflamatornih ćelija (Mammanna i sar., 2018). U skladu sa prethodno iznetim nalazima, pokazana je manja ( $p < 0,05$ ) procentualna zastupljenost ćelija koje eksprimiraju CD163 u okviru CD11b+CD45<sup>+/+</sup> mikroglije EAE kontrolnih mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na ženke (Slika 24C). Osim toga, propranolol je značajno povećao ( $p < 0,001$ ) zastupljenost CD163+ mikroglije kod EAE pacova oba pola (Slika 24C). Efekat propranolola je bio izraženiji kod mužjaka, budući da kod tretiranih EAE životinja, za razliku od kontrolnih EAE pacova, nisu zabeležene statistički značajne polne razlike u procentualnoj zastupljenosti CD163+ ćelija (Slika 24C).



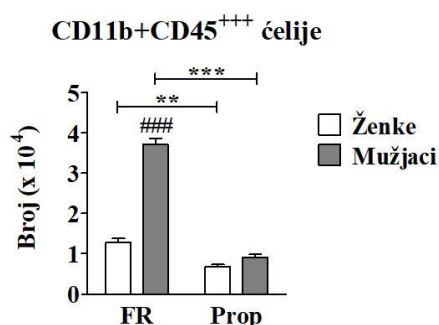
**Slika 24. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE snažnije podstiče sposobnost mikroglije za fagocitozu i endocitozu kod mužjaka nego kod ženki pacova na vrhuncu bolesti.**

Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja (uz pomoć odgovarajućih kontrola), a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) Lateks+ ćelija i (B) Dekstran+ ćelija i (C) CD163+ ćelija u okviru CD11b+CD45<sup>+/+</sup> ćelija mikroglije kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost Lateks+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 5,30$ ;  $p \leq 0,05$ ), Dekstran+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 41,43$ ;  $p \leq 0,001$ ) i CD163+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 4,64$ ;  $p \leq 0,05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.6.3. *Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine mijeloidnim ćelijama kod mušjaka nego kod ženki pacova*

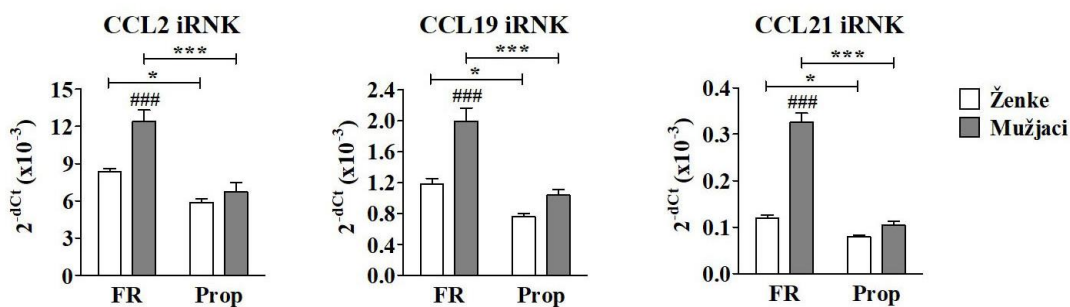
Kako je tretman propranololom doveo do funkcijskih promena u ćelijama mikroglije, koje su uključene u regulaciju infiltracije kičmene moždine mijeloidnim ćelijama iz cirkulacije (Mildner i sar., 2009; Zhang i sar., 2013), čija je akumulacija u CNS neophodna za pojavu neuroloških znaka EAE (Sosa i sar., 2013), ispitano je da li propranolol ostvaruje polno-specifične efekte na broj ćelija monocitnog porekla (inflamatornih monocita/makrofaga) poreklom iz krvi u kičmenoj moždini na vrhuncu EAE.

Propranolol je smanjio broj CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija u kičmenoj moždini i ženki ( $p < 0,01$ ) i mušjaka ( $p < 0,001$ ) EAE pacova, ali je ovaj efekat je bio izraženiji kod EAE mušjaka (Grafik 16). Posledično, iako je kod kontrolnih EAE mušjaka, tretiranih fiziološkim rastvorom, nađen veći ( $p < 0,001$ ) broj CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija u odnosu na ženke, nisu uočene statistički značajne polne razlike u broju ovih ćelija u kičmenoj moždini EAE pacova tretiranih propranololom (Grafik 16).



**Grafik 16. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije smanjuje broj ćelija monocitnog porekla u kičmenoj moždini mušjaka nego ženki pacova.** Histogram prikazuje broj CD11b+CD45<sup>+++</sup> mijeloidnih ćelija u kičmenoj moždini ženki i mušjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na broj CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija ( $F_{(1,20)} = 103,47$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mušjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

U sledećem koraku je ispitana ekspresija gena koji kodiraju hemokine CCL2, CCL19 i CCL21, odgovorne za regrutovanje monocita u ciljna tkiva (Shi i Pamer, 2011; Yu i sar., 2012). Ekspresija iRNK za CCL2, CCL19 i CCL21 u tkivu kičmene moždine bila je veća ( $p < 0,001$ ) kod kontrolnih EAE mušjaka pacova u odnosu na kontrolne EAE ženke (Grafik 17). Tretman propranololom je smanjio nivo ekspresije sva tri ispitivana gena i kod EAE ženki ( $p < 0,05$ ) i kod EAE mušjaka ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne životinje odgovarajućeg pola tretirane fiziološkim rastvorom (Grafik 17). Efekat propranolola je bio izraženiji kod EAE mušjaka, pa u kičmenoj moždini tretiranih pacova nisu uočene statistički značajne polne razlike u ekspresiji gena za CCL2, CCL19 i CCL21 koje su bile prisutne kod EAE kontrolnih pacova (Grafik 17).



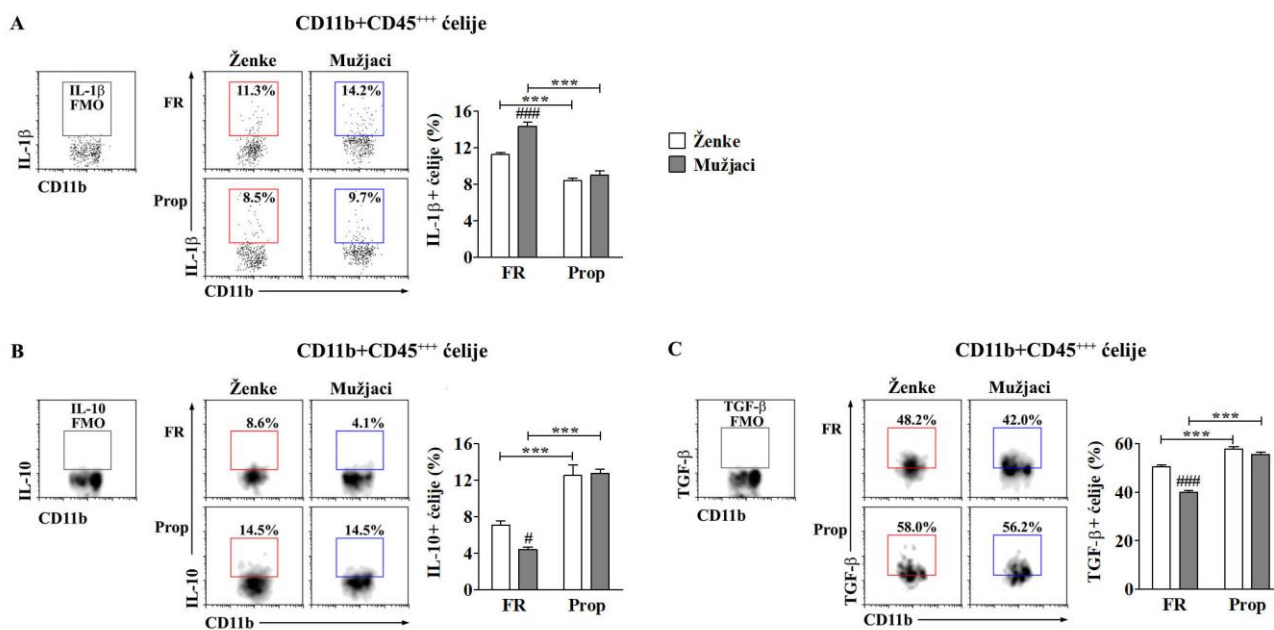
**Grafik 17. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije smanjuje ekspresiju hemokina u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova.** Histogrami prikazuju ekspresiju iRNK (određenu RT-qPCR i prikazanu kao  $2^{-dCt}$  u odnosu na  $\beta$ -aktin) za (levo) CCL2, (sredina) CCL19 i (desno) CCL21 u tkivu kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na ekspresiju iRNK za CCL2 ( $F_{(1,20)} = 6,33$ ;  $p \leq 0,05$ ), CCL19 ( $F_{(1,20)} = 6,55$ ;  $p \leq 0,05$ ) i CCL21 ( $F_{(1,20)} = 68,57$ ;  $p \leq 0,001$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.6.4. Tretman propranololom efikasnije podstiče razvoj anti-inflamatornog citokinskog profila mijeloidnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu kod mužjaka nego kod ženki pacova

Kako funkcijski fenotip mijeloidnih ćelija koje infiltriraju CNS zavisi od uticaja koji deluju iz mikrokruženja, uključujući stimulse od mikroglije (Stout i sar., 2005; Rawji i sar., 2016), ispitan je i uticaj propranolola na citokinski profil ćelija monocitnog porekla koje iz krvi ulaze u kičmenu moždinu.

Na vrhuncu EAE, zastupljenost ćelija koje proizvode proinflamatorni citokin IL-1 $\beta$  u okviru CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija kičmene moždine bila je veća ( $p < 0,001$ ) kod kontrolnih mužjaka u poređenju sa kontrolnim ženkama, tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 25A). Propranolol je smanjio ( $p < 0,001$ ) udeo IL-1 $\beta$ + ćelija u CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelijskoj populaciji kičmene moždine EAE pacova oba pola, i to izraženije kod mužjaka (Slika 25A). Sledstveno, kod EAE životinja tretiranih propranololom nisu primećene statistički značajne polne razlike u ispitivanom parametru koje su postojale kod kontrolnih EAE pacova (Slika 25A).

Propranolol je povećao ( $p < 0,001$ ) udeo ćelija koje proizvode anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- $\beta$  u okviru CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija kičmene moždine (Slika 25B,C). Ovaj efekat je, takođe, bio izraženiji kod EAE mužjaka u odnosu na ženke. Posledično, dok je kod kontrolnih EAE mužjaka procentualna zastupljenost IL-10+ ( $p < 0,05$ ) i TGF- $\beta$ + ( $p < 0,001$ ) ćelija u subpopulaciji CD11b+CD45<sup>+++</sup> ćelija kičmene moždine bila manja u poređenju sa EAE ženkama tretiranim fiziološkim rastvorom, statistički značajne polne razlike u procentualnoj zastupljenosti ovih ćelijama koje sintetišu ove citokine nisu uočene kod EAE pacova tretiranih propranololom (Slika 25B,C).



**Slika 25. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE efikasnije podstiče razvoj anti-inflamatornog citokinskog profila mijeloidnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu kod mužjaka nego ženki pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski profili predstavljaju strategiju izdvajanja (uz pomoć FMO kontrola), a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) IL-1 $\beta$ + ćelija, (B) IL-10+ ćelija i (C) TGF- $\beta$ + ćelija u okviru CD11b+CD45<sup>+++</sup> mijeloidnih ćelija kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na zastupljenost IL-1 $\beta$ + ćelija ( $F_{(1,20)} = 13,05; p \leq 0,01$ ), IL-10+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 4,72; p \leq 0,05$ ) i TGF- $\beta$ + ćelija ( $F_{(1,20)} = 26,94; p \leq 0,001$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.7. Uticaj tretmana propranololom u efektorskoj fazi EAE na fenotipske i funkcijske karakteristike T-limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu ženki i mužjaka pacova na vrhuncu bolesti

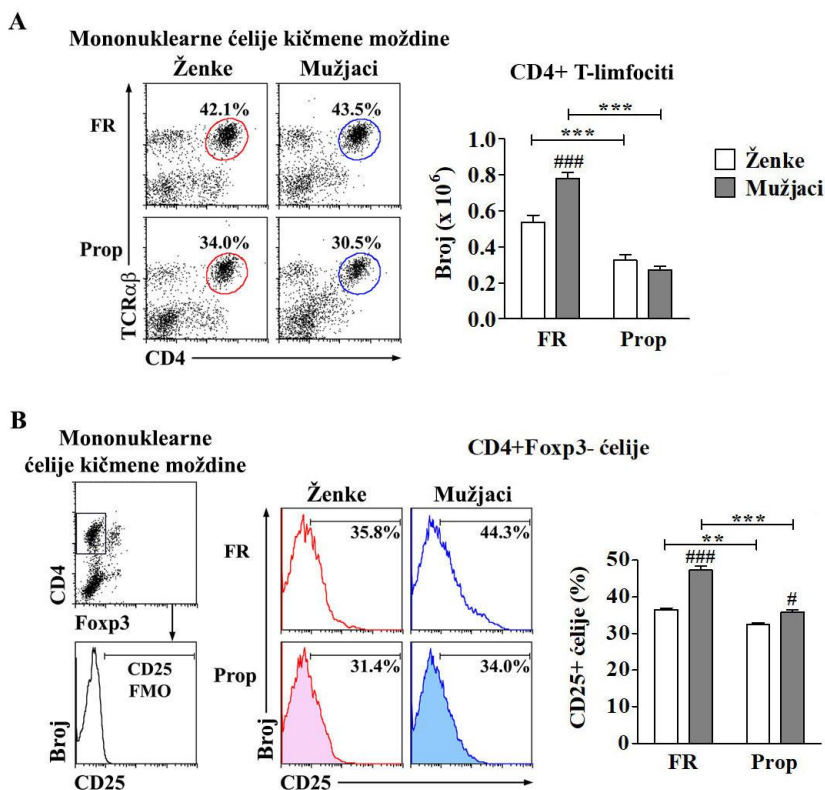
##### 4.7.1. Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine CD4+ T-limfocitima, i reaktivaciju ovih ćelija, kod mužjaka nego kod ženki pacova

Dalja istraživanja su osmišljena u svetlu činjenica da hemokin CCL2 doprinosi infiltraciji kičmene moždine ne samo inflamatornim monocitima iz cirkulacije (Jiang i sar., 2016), već i T-limfocitima (Kooij i sar., 2014; Kara i sar., 2015). Tretman propranololom je smanjio ( $p < 0,001$ ) ukupan broj CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini pacova oba pola na vrhuncu EAE. Efekat tretmana propranololom je bio izraženiji kod EAE mužjaka (Slika 26A), budući da je kod kontrolnih EAE mužjaka pacova uočen značajno veći ( $p < 0,001$ ) broj CD4+ T-limfocita u kičmenoj moždini u odnosu na kontrolne ženke, tretirane fiziološkim rastvorom, a nisu uočene statistički značajne polne razlike u broju ovih ćelija kod EAE životinja tretiranih propranololom (Slika 26A).

Imajući u vidu da promene u fenotipu mikroglije mogu uticati na aktivaciju/funkcije T-limfocita u CNS (Schetters i sar., 2018), ispitivan je udeo reaktiviranih CD4+ T-limfocita u CNS. Reaktivacija CD4+ T-limfocita procenjena je analizom ekspresije CD25 molekula (Caruso i sar., 1997). Tretman propranololom je smanjio procentualnu zastupljenost aktiviranih CD25+ ćelija u okviru konvencionalnih (CD4+Foxp3-) T-limfocita i kod ženki ( $p < 0,01$ ) i kod mužjaka ( $p < 0,001$ )



EAE pacova (Slika 26B). Ovaj efekat propranolola je bio izraženiji kod EAE mužjaka pacova, ali je zastupljenost CD25+ ćelija u okviru CD4+Foxp3- limfocita kičmene moždine ostala veća ( $p < 0,05$ ) kod mužjaka tretiranih propranololom u odnosu na ženke podvrgnute ovom tretmanu, kao i kod ( $p < 0,001$ ) kontrolnih životinja, tretiranih fiziološkim rastvorom (Slika 26B).

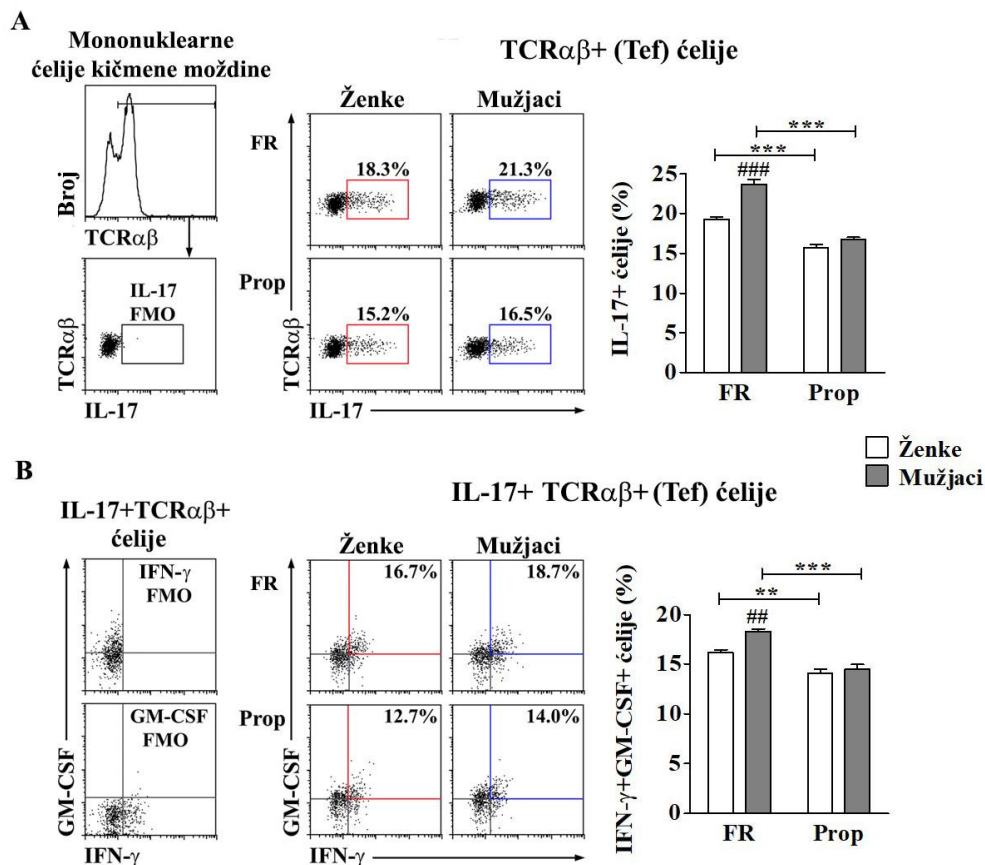


**Slika 26. Tretman propranololom tokom efektorske faze EAE kod mužjaka efikasnije nego kod ženki smanjuje infiltraciju kičmene moždine CD4+ T-limfocitima i njihovu reaktivaciju.** (A) Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski tačkasti profili predstavljaju strategiju izdvajanja CD4+ T-limfocita, a histogram pokazuje njihov broj u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. (B) Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski profili prikazuju strategiju izdvajanja (levo) CD4+Foxp3- ćelija i (desno) CD25+ ćelija u okviru ove populacije konvencionalnih limfocita. Histogram pokazuje procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija u okviru CD4+Foxp3- ćelija kičmene moždine. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na broj CD4+ T-limfocita ( $F_{(1,20)} = 22,65; p \leq 0,001$ ) i procentualnu zastupljenost CD25+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 26,04; p \leq 0,001$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

#### 4.7.2. Tretman propranololom efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine izuzetno patogenim T-limfocitima kod mužjaka nego kod ženki pacova

Kako je tretman propranololom izazvao smanjenje zastupljenosti mijeloidnih ćelija koje sintetišu IL-1 $\beta$ , presudan faktor u diferencijaciji i ekspanziji patogenih Th17 limfocita (Mufazalov i sar., 2017; Ghoreschi i sar., 2010), ali i diferencijaciji najpatogenijih T-limfocita koje istovremeno proizvode IL-17, IFN- $\gamma$  i GM-CSF (Lukens i sar., 2012; Kurschus, 2015), ispitan je i efekat tretmana propranololom na citokinski profil T-limfocita izolovanih 14. d.p.i. EAE iz kičmene moždine pacova oba pola.

Primena propranolola je smanjila ( $p < 0,001$ ) procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru T-limfocita (najverovatnije efektorski T-limfociti; Tef) kičmene moždine, kao i izrazito patogenih IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija među njima ( $p < 0,01$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mužjaka) kod EAE pacova oba pola (Slika 27). Kod kontrolnih EAE mužjaka, tretiranih fiziološkim rastvorom, uočena je veća zastupljenost i IL-17+ T-limfocita ( $p < 0,001$ ), kao i IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija ( $p < 0,01$ ) u okviru ove ćelijske populacije (Slika 27). Kako je efekat propranolola bio izraženiji kod EAE mužjaka pacova, EAE životinje tretirane propranololom nisu pokazale statistički značajne polne razlike u ispitivanim parametrima (Slika 27).



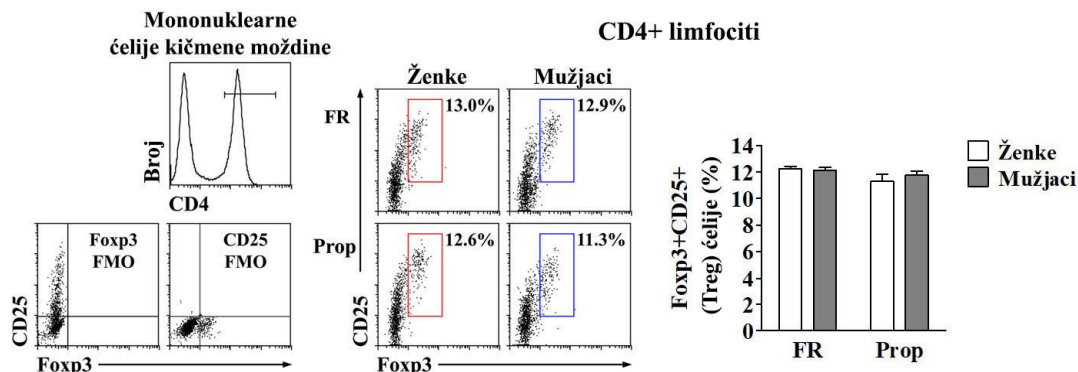
**Slika 27. Tretman propranololom u efektorskoj fazi EAE efikasnije smanjuje infiltraciju kičmene moždine izuzetno patogenim T-limfocitima kod mužjaka nego kod ženki pacova.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski profili predstavljaju strategiju izdvajanja (uz pomoć FMO kontrola), a odgovarajući histogrami pokazuju procentualnu zastupljenost (A) IL-17+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + ćelija i (B) IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija u okviru IL-17+TCR $\alpha\beta$ + ćelija kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajnu interakciju efekata tretmana i pola na procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 14,67$ ;  $p \leq 0,01$ ) i IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ ćelija ( $F_{(1,20)} = 5,10$ ;  $p \leq 0,05$ ). Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM ( $n = 6$ ). \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ##  $p \leq 0,01$ , ###  $p \leq 0,001$  mužjaci u poređenju sa ženka ista grupe.

#### 4.7.3. Tretman propranololom u većoj meri utiče na odnos IL-17+ efektorskih i Treg ćelija u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova

Imajući u vidu značaj odnosa efektorskih IL-17+ i Foxp3+CD25+ Treg limfocita u razvoju autoimunske inflamacije (Lee, 2018), ispitan je uticaj tretmana propranololom na procentualnu

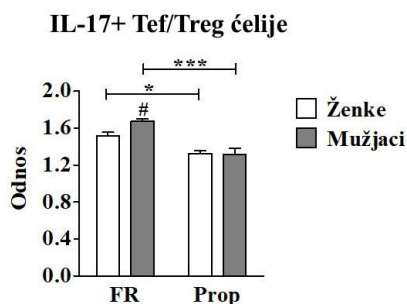
zastupljenost Foxp3+CD25+ Treg ćelija u okviru CD4+ limfocita, kao i na odnos IL-17+ Tef/Treg ćelija, u kičmenoj moždini pacova izolovanoj 14. d.p.i. EAE.

Propranolol nije imao uticaja na zastupljenost Treg ćelija u okviru CD4+ limfocita kičmene moždine, pa se kod EAE pacova tretiranih propranololom, kao i kod kontrolnih EAE pacova, tretiranih fiziološkim rastvorom, procentualna zastupljenost ovih ćelija nije statistički značajno razlikovala između ženki i mužjaka (Slika 28).



**Slika 28. Tretman propranololom u efektorskoj fazi EAE ne utiče na procentualnu zastupljenost Treg ćelija među CD4+ limfocitima kičmene moždine pacova na vrhuncu bolesti.** Reprezentativni protočno-citofluorimetrijski profili predstavljaju strategiju izdvajanja (uz pomoć FMO kontrola) Foxp3+CD25+ (Treg) ćelija u okviru CD4+ limfocita kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost Treg ćelija u okviru CD4+ limfocita kičmene moždine. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6).

Na osnovu dobijenih rezultata izračunat je odnos IL-17+ Tef/Treg ćelija, koji je kod kontrolnih EAE mužjaka bio veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na EAE ženke tretirane fiziološkim rastvorom (Grafik 18). Tretman propranololom je smanjio ( $p < 0,05$  kod ženki;  $p < 0,001$  kod mužjaka) količnik IL-17+ Tef/Treg ćelija kod EAE životinja oba pola, ali izraženije kod mužjaka (Grafik 18). Sledstveno, kod EAE pacova koji su primali propranolol nisu nađene statistički značajne polne razlike u vrednostima ovog parametra (Grafik 18).



**Grafik 18. Tretman propranololom u efektorskoj fazi EAE u većoj meri utiče na odnos IL-17+ efektorskih i Treg ćelija u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova na vrhuncu bolesti.** Histogram prikazuje odnos IL17+ Tef i Treg ćelija kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom (Prop) ili fiziološkim rastvorom (FR) u efektorskoj fazi EAE. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM (n = 6). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; #  $p \leq 0,05$  mužjaci u poređenju sa ženkama iste grupe.

## 5. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija obezbeđuje nove eksperimentalne dokaze koji idu u prilog hipotezi da noradrenalin, delujući posredstvom  $\beta$ - i  $\alpha_1$ -AR, učestvuje u patogenezi EAE izazvanog aktivnom imunizacijom homogenatom singene kičmene moždine kod mladih odraslih pacova soja DA i jasno ukazuju da bi ovaj neurotransmitter/hormon samo svojim delovanjem posredstvom  $\beta$ -AR mogao da učestvuje u polno-specifičnom razvoju ove eksperimentalno-indukovane bolesti. Budući da je tretman životinja propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE smanjio incidencu i odložio pojavu znaka bolesti i ženki i mužjaka, što se nije moglo pripisati njegovom delovanju na nivou drenirajućih limfnih čvorova (a na osnovu podataka dobijenih analizom funkcijskih/fenotipskih karakteristika antigen-prezentujućih ćelija i CD4+ T-limfocita), a da je ovaj tretman i u peri-induktivnoj/induktivnoj i efektorskoj fazi bolesti efikasnije ublažio težinu neurološkog deficita kod mužjaka pacova u poređenju sa ženka pacova, može se zaključiti da je za polno-specifično delovanje propranolola, najvećim delom, odgovorno njegovo delovanje na nivou kičmene moždine, ciljnog organa u ovom modelu bolesti (čemu u prilog idu i podaci dobijeni analizom kako rezidentnih mijeloidnih tako i ćelija koje dolaze s periferije i naseljavaju ovaj organ).

### 5.1. Uticaj tretmana propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE na primarni (auto)imunski odgovor u drenirajućim limfnim čvorovima i razvoj bolesti kod ženki i mužjaka pacova soja DA

Tretman propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE smanjio je broj Th17 limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu, i, u skladu sa ovakvim efektom, redukovao je incidencu i odložio pojavu neuroloških znaka bolesti kod ženki i mužjaka pacova, u poređenju sa kontrolama odgovarajućeg pola, koje su primale fiziološki rastvor. U prilog ovom nalazu mogli bi da govore podaci da periferna simpatektomija primenom 6-hidroksidopamina, dva dana pre indukcije EAE kod miševa, dovodi do kasnije pojave prvih znaka bolesti (Bhowmick i sar., 2009). Sa druge strane, pokazano je da tretman propranololom od dana indukcije EAE do 7 d.p.i. nije imao značajnog uticaja na vreme pojave znaka neurološkog deficita kod pacova soja *Lewis* (Chelmicka-Schorr i sar., 1989). Nekonzistentnost raspoloživih podataka najverovatnije ukazuje da ishod primene propranolola na razvoj EAE zavisi od doze, načina njegove aplikacije, početka tretmana u odnosu na trenutak indukcije EAE i dužine trajanja tretmana, i/ili protokola imunizacije i vrste, odnosno soja životinja (Brosnan et al., 1985; Chelmicka-Schorr et al., 1989; Dimitrijević et al., 2007; Araujo i sar., 2019; Pilipović et al., 2020).

Rezultati dobijeni u ovde prikazanim istraživanjima pokazali su i da je 7. d.p.i. EAE došlo do smanjenja koncentracije noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova. U prilog ovom nalazu idu podaci koji ukazuju da se koncentracija noradrenalina u slezini pacova soja *Lewis* smanjuje u induktivnoj fazi EAE (Leonard i sar., 1990; Mackenzie i sar., 1989). Osim toga, nađeno je da je koncentracija noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova EAE, kao i neimunizovanih kontrolnih, mužjaka pacova bila viša nego u ovom tkivu EAE, odnosno neimunizovanih kontrolnih, ženki pacova. U prilog ovom nalazu govore podaci o većoj gustini simpatičkih nervnih vlakana, koja su glavni izvor noradrenalina u imunskom sistemu (Elenkov i sar., 2000; Padro i Sanders, 2014), u sekundarnim limfnim organima mužjaka pacova u odnosu na ženke (ThyagaRajan i sar., 2011). Takođe, ispitivanjima prikazanim u ovoj disertaciji je potvrđeno da mononuklearne ćelije drenirajućih limfnih čvorova poseduju  $\beta_2$ -AR (Padro i Sanders, 2014), ali je i prvi put pokazano da je zastupljenost ćelija koje eksprimiraju  $\beta_2$ -AR veća u populaciji mononuklearnih ćelija izolovanih iz mužjaka u poređenju sa odgovarajućim ćelijama izovanim iz ženki pacova. Utvrđeno je i da se u induktivnoj fazi EAE procentualna zastupljenost  $\beta_2$ -AR+ ćelija povećala u drenirajućim limfnim čvorovima pacova oba pola, tako da je zastupljenost ćelija koje eksprimiraju  $\beta_2$ -AR u populaciji mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova ostala veća

nakon indukcije EAE kod mužjaka u poređenju sa ženka. Prethodni nalaz je u skladu sa podacima koji ukazuju da se ekspresija  $\beta$ -AR na ćelijama slezine povećava uporedo sa smanjenjem koncentracije noradrenalina u ovom organu tokom razvoja EAE (Mackenzie i sar., 1989; Leonard i sar., 1990). Ovo se može objasniti ushodnom regulacijom  $\beta$ -AR na membrani imunskih ćelija u odgovoru na smanjenje koncentracije noradrenalina u okruženju (Lorton i Bellinger, 2015). Dobijeni nalazi su išli u prilog hipotezi prema kojoj noradrenalin učestvuje u modulaciji ranih stadijuma razvoja EAE, posredstvom  $\beta$ -AR na imunskim ćelijama, na polno-specifičan način. Shodno ovome, budući da razvoj EAE kritično zavisi od aktivacije i proliferacije autoreaktivnih CD4+ T-limfocita u odgovoru na indukciju EAE (Robinson i sar., 2014), u nastavku istraživanja ispitan je uticaj tretmana propranololom na fenotipske i funkcijske karakteristike mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova.

Kod mužjaka i ženki pacova tretiranih propranololom nađena je smanjena infiltracija kičmene moždine Th17 limfocitima, te manja incidenca i odložena pojava neuroloških znaka bolesti, u poređenju sa kontrolnim životinjama odgovarajućeg pola, što se moglo povezati sa slabijim primarnim CD4+ T-ćelijskim odgovorom na indukciju EAE, sudeći prema smanjenoj aktivaciji/proliferaciji CD4+ T-limfocita i njihovoj polarizaciji ka Th17 limfocitima u drenirajućim limfnim čvorovima tretiranih pacova. U skladu sa tim, kod životinja oba pola, primena propranolola je dovela do smanjenja zastupljenosti CD11b+ antigen-prezentujućih ćelija koje su, nakon preuzimanja fluorescentne boje CFSE, migrirale sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove pacova. U prilog ovoj hipotezi idu i podaci koji pokazuju da je zastupljenost antigen-prezentujućih ćelija u limfnom čvoru kritičan faktor koji određuje da li će primarni CD4+ T-ćelijski autoimunski odgovor dostići prag koji je potreban za neurološku manifestaciju autoimunske bolesti (Ludewig i sar., 2001). U tom kontestu treba istaći da, iako su rezidentne antigen-prezentujuće ćelije važne za inicijalnu aktivaciju i zadržavanje antigen-specifičnih CD4+ T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima, one koje migriraju sa mesta imunizacije, nakon preuzimanja antigena i sazrevanja, neophodne su za efikasnu proliferaciju i diferencijaciju CD4+ T-limfocita (Allenspach i sar., 2008). Sledstveno, smatra se da su intenzitet i kvalitet CD4+ T-ćelijskog odgovora proporcionalni broju migratornih antigen-prezentujućih ćelija koje dospevaju do drenirajućih limfnih čvorova (Allenspach i sar., 2008; Martín-Fontecha i sar., 2003). Smanjena migracija antigen-prezentujućih ćelija kod životinja podvrgnutih tretmanu propranololom bila je u skladu sa podacima da delovanje noradrenalina pre indukcije bolesti stimuliše migraciju dendritskih ćelija u drenirajuće limfne čvorove *in vivo* (Saint-Mezard i sar., 2003). Takođe, pokazano je da akutni stres povećava migraciju dendritskih ćelija u drenirajuće limfne čvorove i, sledstveno, aktivaciju T-limfocita (Viswanathan i sar., 2005), kao i da su ovi efekti, bar delom, posredovani kateholaminima (Dhabhar i Mcewen, 1999).

U skladu sa činjenicom da je migracija dendritskih ćelija povezana sa njihovim sazrevanjem u funkcionalne antigen-prezentujuće ćelije, koje pokazuju povećanu ekspresiju MHC molekula i kostimulatornih molekula CD80/CD86 (Banchereau i Steinman, 1998), gotovo sve CD11b+CFSE+ ćelije u drenirajućim limfnim čvorovima pokazivale su ekspresiju molekula CD86. U saglasnosti sa podacima da se krajnji stadijumi sazrevanja dendritskih ćelija karakterišu ushodnom regulacijom ekspresije CCR7 (Förster i sar., 1999), receptora kritičnog za migraciju antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove (Martín-Fontecha i sar., 2003) i inicijaciju antigen-specifičnog imunskog odgovora (Förster i sar., 1999), nađeno je da se zastupljenost CD11b+ ćelija koje eksprimiraju ovaj receptor u drenirajućim limfnim čvorovima smanjuje nakon tretmana propranololom kod životinja oba pola. Ovaj nalaz je povezan sa smanjenom ekspresijom gena za hemokine CCL19 i CCL21, koji usmeravaju migraciju zrelih antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove (Gunn i sar., 1999; Marsland i sar., 2005; Scandella i sar., 2004), u tkivu

drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova koji su primali propranolol. Efekat propranolola je, nezavisno od pola, bio posebno izražen na ekspresiju gena za CCL21, koji se smatra ključnim hemokinom u usmeravanju zrelih antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove (Gunn i sar., 1999). U prilog ovom nalazu, idu podaci koji ukazuju da agonisti  $\beta_2$ -AR utiču na sposobnost migracije antigen-prezentujućih ćelija povećavajući njihov hemotaktički odgovor na hemokine CCL19 i CCL21 (Seiffert i Granstein, 2006). Pored toga, potrebno je istaći da bi promene u ekspresiji gena za CCL19 i CCL21 mogle uzrokovati i poremećaje u (1) lokalizaciji antigen-prezentujućih ćelija u T-ćelijskoj zoni limfnih čvorova (Gunn i sar., 1999), i/ili (2) imigraciji naivnih T-limfocita (Cyster, 2005) u limfne čvorove, pa i na taj način doprineti manjem intenzitetu primarnog odgovora CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Zastupljenost ukupnih CD11b<sup>+</sup> antigen-prezentujućih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima, kao i zastupljenost aktiviranih/zrelih ćelija u ovoj populaciji (sudeći prema ekspresiji markera aktivacije, MHC II klase, CD80 i CD86), bila je manja kod životinja oba pola tretiranih propranololom. Imajući u vidu da noradrenalin ne utiče na ekspresiju markera aktivacije antigen-prezentujućih ćelija posredstvom  $\beta$ -AR (Nijhuis i sar., 2014; Takenaka i sar., 2016), može se pretpostaviti da su ove promene posledica smanjenog „priliva“ aktiviranih antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije. Tretman propranololom nije uticao na zastupljenost antigen-prezentujućih ćelija koje ispoljavaju molekul CD40 u drenirajućim limfnim čvorovima, što se može objasniti činjenicom da ekspresija ovog markera aktivacije ne korelira sa promenama u ekspresiji kostimulatornih molekula (Vremec i sar., 2011).

Važno je naglasiti da su efekti tretmana propranololom na relativnu zastupljenost CD11b<sup>+</sup> antigen-prezentujućih ćelija (uključujući CFSE<sup>+</sup> migratorne, CCR7<sup>+</sup> subpopulaciju, i ukupne), kao i na ekspresiju gena za hemokine CCL19 i CCL21 u drenirajućim limfnim čvorovima bili izraženiji kod pacova muškog pola. Ovaj nalaz se može povezati sa većom koncentracijom noradrenalina u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka nego ženki pacova u induktivnoj fazi bolesti. U prilog tome govore izuzetno oskudni podaci koji ukazuju da je regulacija migracije leukocita posredstvom  $\beta_2$ -AR polno-specifična (de Coupade i sar., 2004; de Coupade i sar., 2007).

Konzistentno sa prethodno navedenim nalazima (Allenspach i sar., 2008; Martín-Fontecha i sar., 2003), pokazano je smanjenje udela aktiviranih CD25<sup>+</sup> ćelija, kao i proliferišućih Ki-67<sup>+</sup> ćelija, među konvencionalnim efektorskim (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) T-limfocitima drenirajućih limfnih čvorova kod mužjaka i ženki životinja koje su tretirane propranololom. U prilog ovim nalazima, idu podaci koji pokazuju da povećano oslobađanje kateholamina u akutnom stresu, neposredno pre indukcije bolesti, rezultuje povećanom aktivacijom CD4<sup>+</sup> T-limfocita i snažnijim primarnim imunskim odgovorom u drenirajućim limfnim čvorovima (Viswanathan i sar., 2005). U skladu sa ovom studijom, tretman propranololom je doveo do smanjenja ne samo broja aktiviranih i proliferišućih CD4<sup>+</sup> T-limfocita, već i broja Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima pacova oba pola, tako da su nakon kratkotrajne restimulacije PMA/jonomycinom *in vitro*, izmerene manje koncentracije IL-17 u supernatantima iz kultura ćelija drenirajućih limfnih čvorova tretiranih životinja u odnosu na ćelije kontrolnih životinja. Promene u broju Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima korelirale su sa manjim brojem Th17 limfocita u kičmenoj moždini pacova tretiranih propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE i, posledično, sa manjim ukupnim brojem mononuklearnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu. Ovaj nalaz se može povezati sa činjenicom da IL-17 ima važnu ulogu u privlačenju dodatnih T-limfocita i mijeloidnih ćelija u CNS tokom razvoja EAE (Kurschus, 2015).

Konačno, tretman propranololom tokom peri-induktivne/induktivne faze EAE doveo je do smanjenja maksimalnog neurološkog skora kod pacova oba pola. Ovi rezultati su u skladu sa ranije dobijenim nalazima koji su pokazali da tretman propranololom započet tri dana pre indukcije EAE

ublažava težinu neurološkog deficita i histološke slike EAE kod pacova soja DA (Dimitrijević i sar., 2007).

Potrebno je istaći da, iako je delovanje propranolola na migraciju i aktivacioni status antigen-prezentujućih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima bilo izraženije kod mužjaka nego kod ženki pacova, polne razlike u delovanju propranolola na ispitivane parametre CD4+ T-ćelijskog odgovora nisu uočene. Ovaj nalaz je sugerisao da je propranolol mogao direktno da moduliše funkcije mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova. U prilog ovoj pretpostavci idu podaci koji ukazuju da se simpatička modulacija imunskih funkcija odvija indirektno, kroz delovanje na funkcije stromalnih ćelija limfoidnih organa (Lorton i Bellinger, 2015) i direktno, kroz delovanje na imunske ćelije, prevashodno posredstvom  $\beta_2$ -AR eksprimiranih na njihovoj membrani (Padro i Sanders, 2014). Drugim rečima, polno-specifični (pre svega u kvantitativnom smislu) efekti tretmana propranololom na ekspresiju gena za hemokine CCL19 i CCL21, koji se prevashodno sintetišu u ćelijama strome sekundarnih limfnih organa (Cyster, 2005), mogli bi biti kompenzovani njegovim direktnim delovanjem na funkcije CD4+ T-limfocita i/ili antigen-prezentujućih ćelija drenirajućih limfnih čvorova.

## **5.2. *In vitro* efekti propranolola na proliferaciju i diferencijaciju CD4+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova ženki i mužjaka pacova soja DA izolovanih u induktivnoj fazi EAE**

Imajući u vidu prethodne rezultate, ispitani su efekti propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita, i njihovu diferencijaciju u potencijalno patogene Th17 limfocite, u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova izolovanih 7 d.p.i. EAE, u prisustvu ili odsustvu noradrenalina (arterenola) i/ili propranolola.

Pokazano je da propranolol, i u prisustvu i u odsustvu arterenola, u kulturi ćelija limfnih čvorova, utiče na proliferaciju CD4+ T-limfocita i diferencijaciju CD4+ T-limfocita u Th17 limfocite. Ispitivanjem efekata propranolola na proliferaciju i diferencijaciju CD4+ T-limfocita u Th17 limfocite u kulturi ćelija limfnih čvorova u prisustvu AMPT, blokatora biosinteze kateholamina, utvrđeno je da propranolol u odsustvu sinteze kateholamina ne utiče značajno na proliferaciju CD4+ T-limfocita i njihovu diferencijaciju u Th17 limfocite. Ovi nalazi su pokazali: (1) da ćelije limfnih čvorova sintetišu kateholamine i (2) da su efekti propranolola bili specifični, posredovani  $\beta$ -AR. U prilog sintezi kateholamina u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova govore nalazi kojima se dokumentuje njihova sinteza u ćelijama drugih tkiva (Capellino i sar., 2012; Huang i sar., 2005; Huang i sar., 1996; Tamura i sar., 2016). U tom kontekstu treba naglasiti da je nađeno da se lokalna sinteza kateholamina u [„(nor)adrenalinskim“] ćelijama smatra važnom u situacijama kada se oslobađanje noradrenalina iz simpatičkih vlakana smanjuje (npr. posle simpatektomije, u nekim autoimunskim bolestima), budući da se ona upravo u tim situacijama povećava (Capellino i sar., 2012), što je potvrđeno i istraživanjima prikazanim u ovoj tezi.

Stimulativan efekat propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita u odgovoru na stimulaciju neuroantigenom/mitogenom u saglasnosti je sa nalazima da agonisti  $\beta$ -AR inhibiraju proliferaciju ovih ćelija zdravih glodara, kao i miševa sa artritismom koji je indukovano kolagenom (Chelmicka-Schorr i sar., 1989; Elenkov i sar., 2000; Liu i sar., 2018). Stimulativan efekat propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita bio je izraženiji u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka nego ženki pacova, uprkos manjoj zastupljenosti aktiviranih CD11b+ antigen-prezentujućih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka nego ženki u induktivnoj fazi EAE (nalaz u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim ispitivanjima sprovedenim na pacovima soja DA; Nacka-Aleksić i sar., 2015). Naime, CD4+ limfociti mužjaka pokazivali su manji proliferativni odgovor u odnosu na ćelije ženki u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova simulisanim neuroantigenom/mitogenom, dok ova razlika nije uočena u prisustvu propranolola. Činjenica da su stimulativni efekti propranolola bili slični u MBP simulisanim kulturama (gde proliferacija zavisi

od prisustva antigen-prezentujućih ćelija) i u ConA stimulisanim kulturama, gde nije neophodno prisustvo antigen-prezentujućih ćelija, sugerisala je da propranolol može da deluje direktno na CD4+ T-limfocite i moduliše njihov proliferativni odgovor. Ovu pretpostavku podržavaju podaci da noradrenalin, posredstvom  $\beta_2$ -AR, smanjuje sintezu IL-2 u kulturama splenocita aktiviranih mitogenom (Peng i sar., 2004; Ramer-Quinn i sar., 2000), pa samim tim i ekspanziju CD4+ limfocita (Ganusov i sar., 2007; Liao i sar., 2013). Budući da su CD4+ T-limfociti glavni proizvođači ovog citokina (Liao i sar., 2013), stimulativan efekat propranolola na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova povezan je sa povećanom ekspresijom gena za IL-2 u kultivisanim ćelijama, i koncentracijom njegovog proteinskog produkta u supernatantima kultura. Izraženije povećanje proliferativnog odgovora CD4+ limfocita mužjaka nego ženki u kulturama ćelija stimulisanih u prisustvu propranolola, može biti objašnjeno većom zastupljenošću ćelija koje sintetišu kateholamine (ćelije koje sadrže tirozin-hidroksilazu) i ekspimiraju  $\beta_2$ -AR u subpopulaciji CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova mužjaka pacova, u odnosu na ovu subpopulaciju ćelija ženki pacova. Takođe, ovi nalazi mogu objasniti manju proliferaciju CD4+ limfocita mužjaka nego ženki u kulturama ćelija stimulisanih neuroantigenom/mitogenom, što je u skladu sa podacima koji ukazuju da CD4+ T-limfociti ženki miševa imaju snažniji proliferativni odgovor na stimulaciju anti-CD3/CD28 antitelima od ćelija mužjaka (De León-Nava i sar., 2009).

Činjenica da su, nezavisno od tipa stimulacije, i propranolol i arterenol povećavali zastupljenost proliferišućih ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita u kulturi, kao i da je u prisustvu propranolola arterenol dodatno stimulisao proliferaciju ovih ćelija, sugerisala je da dejstvo arterenola nije posredovano isključivo  $\beta$ -AR. Ovu pretpostavku podržavaju podaci da noradrenalin, posredstvom  $\alpha$ -AR, podstiče proliferaciju limfocita (Hadden i sar., 1970), kao i da se efekti stimulacije proliferativnog odgovora, u različitim tipovima ćelija, specifično ostvaruju aktivacijom  $\alpha_{1B}$ -AR (Gonzalez-Cabrera i sar., 2004). U ovoj studiji je pokazano da CD4+ T-limfociti drenirajućih limfnih čvorova izolovani u induktivnoj fazi EAE (7 d.p.i.) poseduju  $\alpha_{1B}$ -AR. Pored ovoga, u prisustvu prazosina, antagonista  $\alpha$ -AR, nađena je smanjena učestalost proliferišućih CD4+ limfocita u ConA i MBP stimulisanim kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova, u poređenju sa odgovarajućim kulturama stimulisanim u njegovom odsustvu. Procentualna zastupljenost CD4+ T-limfocita drenirajućih limfnih čvorova koji poseduju  $\alpha_{1B}$ -AR nije se razlikovala među polovima. Ovo bi moglo da objasni činjenicu da se delovanje prazosina na proliferaciju CD4+ limfocita mužjaka i ženki pacova u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova nije statistički značajno razlikovalo. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da na proliferaciju CD4+ limfocita noradrenalin deluje inhibitorno posredstvom  $\beta$ -AR, ali da je njegov stimulatorni efekat na proliferaciju ovih ćelija posredstvom  $\alpha_1$ -AR dominantan. Takođe, rezultati istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji ukazuju na to da je za polno-specifične efekte noradrenalina na proliferaciju CD4+ limfocita u kulturi zaslužno njegovo delovanje posredstvom  $\beta_2$ -AR na ovim ćelijama.

Razultati dobijeni istraživanjima u sklopu ove disertacije su pokazali i da je dodavanje propranolola u MBP i ConA stimulisane kulture mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova povećalo zastupljenost IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima, kao i ekspresiju gena za ROR $\gamma$ t u ćelijama iz ovih kultura. Ovi nalazi su konzistentni sa podacima koji pokazuju da u kulturama CD4+ T-limfocita miševa sa artritismom koji je indukovano kolagenom noradrenalin dovodi do smanjenja zastupljenosti IL-17+ ćelija i smanjene ekspresije ROR $\gamma$ t, a da se ovi efekti mogu inhibirati delovanjem antagonista  $\beta_2$ -AR (ICI-118,551) (Liu i sar., 2018). Osim toga, u istom modelu, pokazano je da prekomerna ekspresija gena za tirozin-hidroksilazu u CD4+ T-limfocitima smanjuje ekspresiju ROR $\gamma$ t i, posledično, frekvenciju Th17 limfocita (Wang i sar., 2016).



Stimulacija neuroantigenom/mitogenom ćelija drenirajućih limfnih čvorova u kulturi u prisustvu propranolola dovela je i do povećanja procentualne zastupljenosti ćelija koje proizvode GM-CSF, citokin koji se smatra ključnim za patogenost Th17 limfocita (Codarri i sar., 2011; El-Behi i sar., 2011), u subpopulaciji CD4+IL-17+ limfocita, u odnosu na kulture stimulirane u odsustvu antagonista  $\beta$ -AR. Ovaj nalaz podržavaju podaci koji ukazuju da ROR $\gamma$ t pokreće proizvodnju GM-CSF u Th17 limfocitima (Codarri i sar., 2011).

Iako bi prethodno diskutovani nalazi mogli da budu rezultat direktnog delovanja propranolola na CD4+ limfocite, razmotrena je i mogućnost posrednog delovanja ovog antagonista  $\beta$ -AR. Naime, prethodno je utvrđeno da aktivacija  $\beta_2$ -AR utiče na polarizacioni kapacitet antigen-prezentujućih ćelija, sugerirajući da bi i tim putem noradrenalin mogao da smanji diferencijaciju Th17 limfocita (Hetier i sar., 1991; Engler i sar., 2005; Roewe i sar., 2017). Precizno, pokazano je da antagonisti  $\beta$ -AR povećavaju (Hetier i sar., 1991), dok agonisti ovih receptora smanjuju (Engler i sar., 2005) produkciju IL-1 $\beta$  u makrofagima stimuliranim lipopolisaharidom (LPS). Pokazano je i da noradrenalin, delujući posredstvom  $\beta$ -AR, inhibira produkciju IL-23 u mešanoj populaciji LPS-stimuliranih humanih dendritskih ćelija (Goyarts i sar., 2008), a da pretretman adrenalinom smanjuje kapacitet dendritskih ćelija kostne srži da proizvode IL-23 nakon LPS stimulacije (Nijhuis i sar., 2014). Prethodno diskutovani nalazi sugeriraju da povećanje zastupljenosti IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita u MBP stimuliranim kulturama kojima je dodat propranolol može (u odnosu na kulture ćelija stimulirane neuroantigenom u odsustvu propranolola), barem delom, biti posledica povećane ekspresije gena za IL-1 $\beta$  i IL-23, citokina koje sintetišu antigen-prezentujuće ćelije, a koji pokreću/održavaju diferencijaciju Th17 limfocita (Chung i sar., 2009; McGeachy i Cua, 2008; Aggarwal i sar., 2003). U prilog ovoj mogućnosti govori i povećanje procentualne zastupljenosti GM-CSF+ ćelija među Th17 limfocitima u MBP/ConA stimuliranim kulturama ćelija u prisustvu propranolola, budući da je IL-1 $\beta$ , u sinergiji sa IL-23, ključan faktor u pokretanju sinteze GM-CSF u autoreaktivnim CD4+ T-limfocitima u EAE (Lukens i sar., 2012). Mogućnost indirektnog delovanja propranolola na CD4+ limfocite, posredstvom njegovih efekata na antigen-prezentujuće ćelije, podržava i nalaz da CD11b+ ćelije drenirajućih limfnih čvorova ekspresiraju  $\beta_2$ -AR, ali i pokazuju sposobnost sinteze kateholamina, sudeći prema ekspresiji tirozin-hidroksilaze. Treba napomenuti da i ispitivanja drugih istraživača pokazuju da dendritske ćelije (Nijhuis i sar., 2014; Panina-Bordignon i sar., 1997) i makrofagi (Izeboud i sar., 1999) ekspresiraju  $\beta_2$ -AR, kao i da selektivna blokada ovog tipa AR u LPS-stimuliranim makrofagima povećava produkciju IL-1 $\beta$ , sprečavajući autokrino/parakrino delovanje kateholamina koje ove ćelije sintetišu (Engler i sar., 2005).

Statistički značajne polne razlike u ekspresiji iRNK za IL-1 $\beta$  i IL-23 u ćelijama gajenim u MBP stimuliranim kulturama u odsustvu propranolola (veća ekspresija oba gena u ćelijama ženki), u njegovom prisustvu su umanjene (IL-1 $\beta$ ) ili u potpunosti ukinute (IL-23). Ovi podaci, u kontekstu već iznete činjenice o manjoj zastupljenosti aktiviranih antigen-prezentujućih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima mužjaka u odnosu na ženke pacova u induktivnoj fazi EAE (Nacka-Aleksić i sar., 2015), jasno ukazuju na izraženiji efekat propranolola na ekspresiju gena za osnovne citokine uključene u inicijaciju/održavanje diferencijacije Th17 limfocita kod mužjaka pacova, koji se može povezati sa većom procentualnom zastupljenošću  $\beta_2$ -AR+ ćelija u populaciji CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka.

Imajući u vidu (1) veću procentualnu zastupljenost ćelija koje ekspresiraju  $\beta_2$ -AR i sintetišu kateholamine u subpopulaciji CD4+ T-limfocita i  $\beta_2$ -AR+ ćelija u populaciji CD11b+ ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka pacova u odnosu na ženke, kao i (2) izraženije stimulatívne efekte propranolola na ekspresiju gena za ROR $\gamma$ t, odnosno IL-1 $\beta$  i IL-23, u kultiviranim ćelijama mužjaka nego ženki, postavilo se pitanje zbog čega su ovakvi efekti propranolola na zastupljenost

CD4+IL-17+ limfocita u kulturama ćelija ženki i mužjaka EAE pacova bili podjednako izraženi. Ovo se može objasniti činjenicom da je diferencijacija Th17 limfocita izuzetno kompleksno regulisana čitavim nizom transkripcionih faktora, uključujući pozitivne i negativne regulatore ovog procesa (Khan i Ahmed, 2015). Važno je istaći transkripcioni faktor PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), koji se smatra ključnim negativnim regulatorom diferencijacije Th17 limfocita (Klotz i sar., 2009), za kojeg je pokazano da selektivno inhibira diferencijaciju T-limfocita slezine mužjaka miševa u Th17 limfocite (Park i sar., 2016). U kontekstu rezultata prikazanih u ovoj studiji, značajno je da noradrenalin smanjuje ekspresiju ovog transkripcionog faktora posredstvom  $\beta$ -AR (Lindgren i sar., 2004; Zhou i sar., 2020). Konačno, imajući u vidu ulogu IL-2 u inhibiciji diferencijacije Th17 limfocita (Laurence i sar., 2007), moguće je da je izraženije povećanje koncentracije ovog citokina u supernatantima MBP stimuliranih kultura ćelija mužjaka, u odnosu na ćelije ženki, pod uticajem propranolola antagonizovalo stimulatívne efekte blokade  $\beta$ -AR na ekspresiju gena za ROR $\gamma$ t, IL-1 $\beta$  i IL-23, te doprinelo očuvanju polnih razlika u frekvenciji IL-17+ ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita uočenim u MBP stimuliranim kulturama bez propranolola.

Činjenica da je, nezavisno od tipa stimulacije, arterenol smanjivao procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ limfocita drenirajućih limfnih čvorova u kulturi, a da je propranolol povećavao njihovu procentualnu zastupljenost, ukazala je da bi efekat arterenola i na diferencijaciju Th17 limfocita mogao biti zavisán ne samo od  $\beta$ -AR već i  $\alpha$ -AR. Dodavanje prazosina u ConA ili MBP stimulirane kulture ćelija smanjilo je procentualnu zastupljenost IL-17+ ćelija među CD4+ limfocitima, a efekat je bio, grubo rečeno, podjednako izražen u kulturama ćelija ženki i mužjaka pacova. Rezultati ukazuju da inhibitorni efekat koji noradrenalin ostvaruje na diferencijaciju Th17 limfocita posredstvom  $\beta$ -AR, preovladava nad stimulatívnim delovanjem posredovanim  $\alpha_1$ -AR koje ne pokazuje polne specifičnosti. Budući da efekti prazosina nisu pokazali polne specifičnosti na proliferaciju CD4+ limfocita, kao ni na njihovu diferencijaciju u Th17 limfocite, dalja istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila su, kao što je već navedeno u poglavlju Rezultati, fokusirana na imunomodulatorne efekte noradrenalina posredovane  $\beta$ -AR. U prilog tome govori i činjenica da primena prazosina *in vivo* tokom induktivne faze akutnog monofaznog EAE kod pacova soja *Lewis* ne utiče na neurološke manifestacije bolesti (Brosnan i sar., 1985), dok se ublažavanje bolesti nakon primene prazosina tokom efektorske faze EAE povezuje primarno sa njegovim delovanjem na propustljivost krvnih sudova, a ne sa efektima u imunskom sistemu (Goldmuntz et al., 1986).

Sumirano, prethodno diskutovani podaci dobijeni u sklopu ove doktorske disertacije pokazuju da noradrenalin, delujući posredstvom  $\beta$ -AR, (1) stimuliše migraciju zrelih antigen-prezentujućih ćelija sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove, podstíčući ekspresiju gena za ključne homeostatske hemokine CCL19 i CCL21, ali i (2) inhibira proliferaciju CD4+ T-limfocita, suprimirajući ekspresiju IL-2 kao i (3) diferencijaciju CD4+ limfocita u Th17 limfocite, suprimirajući ekspresiju ROR $\gamma$ t u CD4+ ćelijama, kao i IL-1 $\beta$  i IL-23 u antigen-prezentujućim ćelijama, pri čemu su svi efekti propranolola bili izraženiji u kulturama ćelija drenirajućeg limfnog čvora mužjaka u poređenju sa ženkama. Tretman propranololom tokom peri-induktívne/induktívne faze EAE smanjio je broj Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima i odložio pojavu, odnosno smanjio incidencu, bolesti kod životinja oba pola, sugeríšući da direktno inhibitorno delovanje noradrenalina na CD4+ T-limfocite i antigen-prezentujuće ćelije nije dovoljno da kompenzuje njegove stimulatívne efekte na ekspresiju CCL19 i CCL21 i, sledstveno, migraciju i/ili pozicioniranje ovih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima neophodno za optimalni odgovor CD4+ limfocita. Sa stanovišta razvoja bolesti, činjenica da primena propranolola pre pojave znaka neurološkog deficita odlaže pojavu bolesti, ukazuje da bi poremećaji u imunomodulatornom

delovanju noradrenalina posredstvom  $\beta$ -AR mogli biti faktori rizika koji doprinose prelasku autoimunskog odgovora u autoimunska bolest. Pored toga, iako tretman propranololom nije uticao na broj potencijalno patogenih Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima na polno-specifičan način, efekti ovog tretmana na težinu bolesti bili su izraženiji kod pacova muškog pola. Naime, iako su kontrolni mužjaci razvili težu bolest u poređenju sa ženkama, kod EAE životinja koje su tretirane propranololom ovakva polna razlika nije uočena. Ovaj nalaz se može povezati sa podacima koji sugerišu da ciljni organ ima presudnu ulogu u kontroli težine bolesti, kroz polno-specifičnu regulaciju lokalnog autoimunskog odgovora, osetljivosti tkiva na autoimunska oštećenja i efikasnosti mehanizama reparacije (Hill i sar., 2007; Nacka-Aleksić i sar., 2015). Imajući u vidu da propranolol prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (Neil-Dwyer i sar., 1981), moglo se pretpostaviti da tretman propranololom polno-specifično utiče na težinu EAE delovanjem ovog antagonista na nivou kičmene moždine.

### **5.3. Uticaj tretmana propranololom tokom efektorske faze EAE na težinu neurološkog deficita i fenotipske/funkcijske karakteristike imunskih ćelija kičmene moždine ženki i mužjaka pacova soja DA na vrhuncu bolesti**

U narednom segmentu studije je ispitana prethodno formulirana pretpostavka da bi propranolol, svojim delovanjem u kičmenoj moždini, kao ciljnom organu u EAE, mogao da ostvari polno-specifične efekte na težinu bolesti. Dalja ispitivanja su pokazala da tretman propranololom tokom efektorske faze EAE, od 10. d.p.i. (kada se većinski pojavljuju prvi neurološki znaci EAE), dovodi do ublažavanja bolesti kod pacova oba pola. Na ovaj zaključak upućuje kraće trajanje bolesti (neurološkog deficita), manji indeks težine bolesti i maksimalni neurološki deficit. Kod životinja oba pola tretiranih propranololom izolovano je manje mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine u odnosu na kontrolne životinje. U prilog ovim nalazima, pokazano je da deplecija kateholamina u CNS izazvana primenom 6-hidroksidopamina smanjuje težinu EAE kod pacova soja *Lewis* (Karpus i sar., 1988; Konkol i sar., 1990). Nasuprot tome, istraživanja drugih autora su pokazala da primena propranolola tokom efektorske faze EAE kod istog soja pacova dovodi do pogoršanja bolesti (Brosnan i sar., 1985), ili i da ne utiče na njenu težinu (Chelmicka-Schorr i sar., 1989). Kao što je prethodno navedeno, nekonzistentni nalazi mogu se objasniti razlikama u protokolu imunizacije, sojevima eksperimentalnih životinja, kao i onima u dozi i načinu primene propranolola, odnosno trenutku započinjanja i dužini tretmana. Efekti propranolola su bili izraženiji kod mužjaka, imajući u vidu da polne razlike u težini bolesti i infiltraciji kičmene moždine mononuklearnim ćelijama, za razliku od kontrolnih životinja (teža bolest i izraženija infiltracija kod mužjaka nego kod ženki pacova), nisu uočene kod pacova tretiranih propranololom.

Polne razlike u efikasnosti tretmana mogle su se povezati sa većom koncentracijom noradrenalina u kičmenoj moždini mužjaka nego ženki pacova, što je razlika koja je uočena kod neimunizovanih kontrolnih životinja, a održavala se tokom razvoja EAE. U tom pogledu trebalo bi imati u vidu da se LC smatra ključnim jezgrom SNS u okviru CNS (Benarroch, 2018), čiji noradrenalinški neuroni daju projekcije u različite delove CNS, uključujući i kičmenu moždinu pacova (Westlund i sar., 1983). U tom kontekstu, polna razlika u koncentraciji noradrenalina u kičmenoj moždini može se povezati sa činjenicom da je u centralnoj kontroli aktivnosti SNS manja osetljivost na ekscitatorne stimuluse, odnosno veća osetljivost na inhibitorne stimuluse kod jedinki ženskog pola (Hinojosa-Laborde i sar., 1999). Osim toga, utvrđeno je da kod mužjaka miševa LC sadrži veći broj ćelija koje ekspresiraju tirozin-hidroksilazu, u odnosu na ženke (Mariscal i sar., 2023). Dodatno, izraženiji efekat propranolola na težinu bolesti kod mužjaka pacova može se povezati i sa većom ekspresijom gena za  $\beta_2$ -AR u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine (CD11b+ ćelije koje prevashodno sačinjava mikroglija; Slika 20), u odnosu na ove ćelije ženki pacova, kako kod zdravih životinja, tako i kod životinja kojima je indukovana EAE. Treba dodati da polne razlike

u ekspresiji iRNK za  $\beta_1$ -AR u mijeloidnim ćelijama nisu registrovane, i da ove ćelije ekspimiraju značajno niže nivoe iRNK za  $\beta_1$ -AR nego  $\beta_2$ -AR, te da noradrenalin svoje efekte na ove ćelije ostvaruje većinski posredstvom  $\beta_2$ -AR (Mori i sar., 2002). Podaci koji direktno govore o polnim razlikama u ekspresiji  $\beta$ -AR u CNS su izuzetno oskudni, osim nalaza koji sugerišu postojanje polnih razlika u delovanju propranolola na funkcije mikroglije (Barnard i sar., 2019).

U prilog tezi da poremećaj u imunomodulatornom delovanju kateholamina može doprineti razvoju MS, odnosno EAE (Racosta i Kimpinski, 2016), i u ovoj studiji je pokazano da se na vrhuncu bolesti smanjuje koncentracija noradrenalina u kičmenoj moždini pacova oba pola. U prilog tome govore podaci o smanjenoj koncentraciji noradrenalina u kičmenoj moždini i moždanom stablu na vrhuncu EAE kod pacova soja *Lewis* (Krenger i sar., 1989; Krenger i sar., 1986; White i sar., 1983), što se pripisuje oštećenju nervnih vlakana koja sadrže noradrenalin u samoj kičmenoj moždini (White i sar., 1983), ali i oštećenju LC (Polak i sar., 2011).

U okviru mikrosredine CNS, mikroglija ima presudan značaj u kontroli autoimunske neuroinflamacije, od podsticanja razvoja EAE u ranim fazama bolesti, kroz aktivaciju prvog talasa encefalitogenih T-limfocita koji infiltriraju CNS i produkciju proinflamatornih medijatora (Sosa i sar., 2013; Thompson i Tsirka, 2017), do kontrole oštećenja i reparacije tkiva u kasnijim stadijumima (Shin i sar., 2012; Thompson i Tsirka, 2017). Takođe, ćelije mikroglije se smatraju „imunološkim senzorima“ odgovora na stres (Frank i sar., 2019), prevodeći povećanja koncentracije noradrenalina u CNS u proinflamatorne signale (Blandino i sar., 2006). Stoga, kako bi se utvrdili mehanizmi delovanja propranolola na težinu EAE, uključujući i polne razlike u ekspresiji bolesti, sledeći stadijum istraživanja odnosio se na ispitivanje fenotipskih i funkcijskih karakteristika ćelija mikroglije.

U korelaciji sa blažim neurološkim deficitom kod životinja oba pola tretiranih propranololom, iz njihove kičmene moždine je izolovano manje ćelija ukupne i aktivirane mikroglije u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje. Ovakav nalaz je bio očekivan, imajući u vidu da je u drugim studijama pokazano da noradrenalin, delujući posredstvom  $\beta$ -AR, stimuliše aktivaciju mikroglije (Liu i sar., 2019; Sugama i sar., 2019; Sugama i Kakinuma, 2021), i dovodi do povećanja broja ćelija aktivirane mikroglije, kako to pokazuje ekspresija markera aktivacije Iba-1, u različitim regionima CNS (Sugama i sar., 2019). Takođe, u animalnim modelima stresa pokazano je da je aktivacija mikroglije praćena ushodnom regulacijom ekspresije proinflamatornih medijatora (hemokina, citokina), koja vodi nekontrolisanom proinflamatornom odgovoru (Blandino i sar., 2006). Utvrđeno je da su ovi efekti stresa posredovani kateholaminima (Wohleb i sar., 2015) i da mogu biti sprečeni primenom propranolola (Wohleb i sar., 2011). Kod kontrolnih mužjaka, u korelaciji sa težim neurološkim deficitom, nađen je veći broj ćelija ukupne i aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini u odnosu na ženke, što je podržano ranijim istraživanjima koja su pokazala polne razlike u aktivaciji mikroglije u odgovoru na različite stimuluse (Acaz-Fonseca i sar., 2015; Bruce-Keller i sar., 2007; Kerr i sar., 2019; Wright i sar., 2017). Kako je propranolol ostvario izraženiji efekat na broj ukupnih i aktiviranih ćelija mikroglije kod mužjaka nego ženki pacova, kod tretiranih životinja nisu zapažene polne razlike u vrednostima ovih parametara.

Osim smanjenja broja aktiviranih ćelija mikroglije, tretman propranololom je i stimulisao njihovu diferencijaciju u pravcu anti-inflamatornog fenotipa, povećavajući ekspresiju gena za hemokin CX3CL1 u tkivu kičmene moždine, uporedo sa povećanjem zastupljenosti mikroglije koja eksprimira odgovarajući receptor, CX3CR1, kao i gustine njegove membranske ekspresije. Naime, smatra se da CX3CL1 poreklom iz neurona, delujući posredstvom CX3CR1 na membrani ćelija mikroglije, prenosi ovim ćelijama tonički inhibicioni signal koji suprimira njihove proinflamatorne funkcije (Biber i sar., 2007) i predstavlja jedan od ključnih mehanizama održavanja anti-inflamatornog fenotipa ovih ćelija (Frank i sar., 2019) i suzbijanja neuroinflamacije (Wolf i sar.,

2013). Nedostatak receptora CX3CR1 povezan je sa pogoršanjem EAE koje se karakteriše izraženom inflamacijom i oštećenjem neurona (Cardona i sar., 2018). U prilog povećanju ekspresije CX3CL1 i CX3CR1 kod pacova tretiranih propranololom govore podaci da noradrenalin može da smanji ekspresiju gena za CX3CL1 (Hinojosa i sar., 2013), kao i da u stresu dolazi do smanjenja ekspresije CX3CR1 (Wohleb i sar., 2014).

U skladu sa prethodno diskutovanim promenama u ekspresiji komponenti CX3CL1/CX3CR1 signalne osovine u kičmenoj moždini pacova tretiranih propranololom, u izolovanim CD11b<sup>+</sup> mijeloidnim ćelijama (prevashodno mikroglija) nađena je manja ekspresija gena za Nrf2 i, posledično, HO-1. Da bi prethodna konstatacija bila jasnija, treba navesti da aktivacija CX3CL1/CX3CR1 signalne osovine dovodi od aktivacije transkripcionog faktora Nrf2 i, posledično, ekspresije enzima HO-1, koja se smatra merilom Nrf2-zavisnog anti-inflamatornog odgovora (Lastres-Becker i sar., 2014). U prilog istoj tezi govori podatak da nedostatak CX3CR1 u mikrogliji dovodi do izražene nishodne regulacije ekspresije Nrf2, i potpunog odsustva ekspresije HO-1, što je povezano sa smanjenom sposobnošću ovih ćelija da razviju anti-inflamatorni fenotip/funkcije (Castro-Sánchez i sar., 2019; Lastres-Becker i sar., 2014). Posledično, u uslovima izostanka ekspresije Nrf2 dolazi do bržeg razvoja i težeg oblika neurološkog deficita kod životinja kojima je indukovano EAE (Johnson i sar., 2010). Dodatno, propranolol bi mogao da utiče na signalnu kaskadu koju čine Nrf2/HO-1 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine i direktno, nezavisno od aktivacije receptora CX3CR1. U tom smislu, pokazano je da signali posredstvom cAMP značajno smanjuju aktivnost transkripcionog faktora Nrf2, dok Rp-cAMPS, kompetitivni inhibitor protein-kinaze A, značajno povećava aktivnost Nrf2, prevashodno delujući na njegovu akumulaciju u jedru (Ziady i sar., 2012). Osim toga, utvrđeno je da blokada  $\beta$ -AR može dovesti do aktivacije signalnih puteva zavisnih od transkripcionog faktora Nrf2, u različitim tkivima i tipovima ćelija, u odsustvu aktivacije CX3CL1/CX3CR1 signalne osovine (Ouyang i sar., 2013; Pilipović i sar., 2020; Wang i sar., 2014; Wilson i sar., 2013). Treba naglasiti da je efekat propranolola na CX3CL1/CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalnu osovinu u ćelijama kičmene moždine bio izraženiji kod mužjaka nego ženki pacova. U skladu sa većim brojem ćelija aktivirane mikroglije u kičmenoj moždini, vrednosti svih ispitivanih parametara aktivacije CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalne osovine kod kontrolnih mužjaka bile su niže u odnosu na iste parametre kod ženki, dok kod životinja tretiranih propranololom polne razlike ili nisu uočene ili je njihov smer bio suprotan (gustina membranske ekspresije CX3CR1 na mikrogliji mužjaka tretiranih propranololom bila je veća nego kod ženki). Značaj ovih nalaza ističe činjenica da je manja ekspresija gena regulisanih transkripcionim faktorom Nrf2 utvrđena i u različitim ćelijama mužjaka/muškaraca u poređenju sa ćelijama ženki/žena (Liu i sar., 2021; Pellegrini i sar., 2017).

Poznato je da aktivacija CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalnog puta sprečava ushodnu regulaciju proinflamatornih medijatora u mikrogliji, uz istovremenu stimulaciju sinteze anti-inflamatornih citokina, te na taj način podstiče polarizaciju/diferencijaciju ovih ćelija u smeru alternativne aktivacije i anti-inflamatornih/regulatornih funkcija (Dinkova-Kostova i sar., 2018; Limatola i Ransohoff, 2014; Saha i sar., 2020). U skladu sa ovim nalazima, istraživanja prikazana u sklopu ove doktorske disertacije pokazala su da primena propranolola smanjuje procentualnu zastupljenost ćelija mikroglije koje sintetišu IL-1 $\beta$  kod životinja oba pola. Naime, ključni mehanizam neuroprotektivnog delovanja CX3CR1 jeste nishodna regulacija sinteze IL-1 $\beta$  (Limatola i Ransohoff, 2014), koji se smatra ključnim posrednikom u odgovoru na delovanje stresora u CNS (Blandino i sar., 2006; Frank i sar., 2019; Wohleb i sar., 2011). U prilog prethodno pomenutom nalazu govore podaci da mikroglija izolovana iz životinja prethodno izloženih stresu pokazuje veću ekspresiju gena za IL-1 $\beta$  u odgovoru na restimulaciju (Frank i sar., 2007; Wohleb i sar., 2011), te da se povećanje nivoa IL-1 $\beta$  u CNS indukovano delovanjem stresora može sprečiti propranololom

(najverovatnije usled blokiranja delovanja noradrenalina na mikrogliju, koja se smatra ključnim izvorom IL-1 $\beta$  u odgovoru na stres) (Blandino i sar., 2006; Johnson i sar., 2005). Dodatno, u prilog smanjenoj ekspresiji IL-1 $\beta$  u ćelijama mikroglije pacova kod kojih je indukovana EAE i koji su tretirani propranololom, treba navesti da aktivacija  $\beta$ -AR povećava proizvodnju IL-1 $\beta$  u mikrogliji (Tomozawa i sar., 1995; Wang i sar., 2010). Kao pokazatelj usmeravanja mikroglije prema anti-inflamatornom funkcijskom statusu, smanjena ekspresija gena za NADPH-oksidadu i iNOS, čija povećana ekspresija karakteriše mikrogliju proinflamatornog fenotipa (Kovac i sar., 2015; Rojo i sar., 2010), detektovana je u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine ženki i mužjaka pacova sa EAE koji su podvrgnuti tretmanu propranololom.

S druge strane, potpuno očekivano u kontekstu svega prethodno diskutovanog, u mikrogliji izolovanoj iz kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom, nađeno je povećanje procentualne zastupljenosti ćelija koje sintetišu IL-10 i TGF- $\beta$ , u odnosu na mikrogliju kontrolnih životinja. Ovi citokini su uključeni u fagocitozu apoptotičnih/mrtvih ćelija i ćelijskog debrisa te rezoluciju neuroinflamacije i reparaciju tkiva (Lobo-Silva i sar., 2016; Sugimoto i sar., 2016), i predstavljaju markere tzv. alternativne aktivacije mikroglije (Guo i sar., 2022). Ovi nalazi se mogu povezati sa činjenicom da HO-1 direktno indukuje produkciju IL-10 (Ambegaokar i Kolson, 2014). Potrebno je istaći i da sâm IL-10 može da podstakne produkciju HO-1, uspostavljajući pozitivnu povratnu spregu koja pojačava anti-inflamatorni odgovor (Lee i Chau, 2002). Osim toga, sinteza IL-10 u mikrogliji važna je za produkciju TGF- $\beta$  u ovim ćelijama (Laffer i sar., 2019), dok ovaj citokin može dodatno stimulisati ekspresiju HO-1, što je pokazano u različitim tipovima ćelija (Hill-Kapturczak i sar., 2000; Kuo i sar., 2017). Konačno, u populaciji mijeloidnih ćelija, prevashodno mikrogliji, ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom izmerena je povećana ekspresija iRNK za Arg1, što je, uz smanjenje ekspresije gena za iNOS u ovim ćelijama, dovelo do smanjenja količnika ekspresije gena za iNOS/gena za Arg1. Ovaj nalaz potkrepljuju podaci koji pokazuju da je jedan od osnovnih mehanizama delovanja HO-1 u rezoluciji inflamacije njegova interferencija sa ekspresijom iNOS (Syapin, 2008). Preciznije, u različitim eksperimentalnim sistemima, pokazano je da je ekspresija HO-1 obrnuto proporcionalna ekspresiji iNOS u ćelijama mikroglije, odnosno da HO-1 direktno inhibira ekspresiju iNOS (Syapin, 2008). Dodatno, kod miševa deficijentnih za Nrf2 uočena je ushodna regulacija ekspresije iNOS, uporedo sa nishodnom regulacijom ekspresije Arg1 (Rojo i sar., 2010).

Niske vrednosti količnika ekspresije iNOS i Arg1, takođe, odražavaju diferencijaciju mikroglije prema anti-inflamatornom/regenerativnom fenotipu, što se povezuje sa povećanom sposobnošću endocitoze posredovane manoznim receptorom (Kigerl i sar., 2009), kao i fagocitoze (Frank i sar., 2019). Zaista, u populaciji mikroglije izolovane iz kičmene moždine ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom uočena je povećana procentualna zastupljenost ćelija koje su izvršile endocitozu dekstrana, kao i onih koje su fagocitovale čestice lateksa. Sledstveno, u populaciji mikroglije životinja tretiranih propranololom, pokazana je veća zastupljenost CD163+ ćelija koje su alternativno aktivirane i pokazuju ekspresiju manoznog receptora (Mammana i sar., 2018). Prisustvo CD163 na ćelijama mikroglije povezano je sa fagocitozom apoptotičnih/nekrotičnih ćelija i njihovih ostataka (Zhang i sar., 2011), a povećanje ekspresije ovog molekula sa smanjenjem neuroinflamacije u modelu akutnog EAE i, posledično, oporavkom od paralize (Ahn i sar., 2012). Dobijeni nalazi su, takođe, u saglasju sa podacima da mikroglija deficijentna u ekspresiji CX3CR1 (Castro-Sánchez i sar., 2019; Lampron i sar., 2015), kao i Nrf2 (Lastres-Becker i sar., 2014), pokazuje smanjenu ekspresiju gena za TAM receptore i, sledstveno, smanjenu sposobnost fagocitoze.

Odražavajući manju aktivaciju CX3CR1/Nrf2/HO-1 signalne osovine u kičmenoj moždini, svi pokazatelji anti-inflamatornog aktivacionog profila mikroglije/mijeloidnih ćelija pokazivali su

niže vrednosti, dok su parametri proinflamatornog statusa ovih ćelija imali više vrednosti kod kontrolnih mužjaka u odnosu na ženke. Odsustvo polnih razlika, njihovo smanjivanje (ekspresija gena za Nox2 u mijeloidnim ćelijama) ili promena smera (procenat IL-10<sup>+</sup> ćelija u okviru mikroglije) ponovo su jasno demonstrirali da je delovanje propranolola bilo izraženije kod pacova muškog pola.

U kontekstu nalaza: 1) da delecija transkripcionog faktora Stat3 u mijeloidnim ćelijama ublažava EAE kod miševa, što je povezano sa smanjenom sposobnošću prezentacije antigena i produkcije proinflamatornih citokina mijeloidnih ćelija, a time i sa diferencijacijom encefalitogenih Th17 limfocita (Lu i sar., 2020), i 2) da noradrenalin povećava ekspresiju/aktivnost Stat3 posredstvom  $\beta$ -AR (Landen i sar., 2007), ispitani su i efekti delovanja propranolola na komponente Stat3/Socs3 signalnog puta u mikrogliji/mieloidnim ćelijama i time diferencijaciju Th17 limfocita. Imajući u vidu podatke o kritičnom značaju signalnog puta Stat3 za aktivaciju mikroglije i razvoj neuroinflamacije (Chen i sar., 2017), manja aktivacija mikroglije kod pacova oba pola tretiranih propranololom u odnosu na kontrolne pacove, bila je potpuno u skladu sa smanjenom ekspresijom gena za Stat3 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine ovih životinja. Pokazano je da noradrenalin povećava aktivaciju transkripcionog faktora Stat3 u ćelijama karcinoma jajnika, kao i da ovaj efekat može biti sprečen dejstvom propranolola, pri čemu su efekti noradrenalina direktno posredovani  $\beta$ -AR i protein-kinazom A, i nezavisni od IL-6 (Landen i sar., 2007). Međutim, imajući u vidu kritičan značaj IL-6 u aktivaciji gena za Stat3 (Ichiba i sar., 1998), smanjena ekspresija iRNK za Stat3 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine životinja tretiranih propranololom može se povezati i sa smanjenjem ekspresije transkripta za IL-6 u ovim ćelijama. U prilog ovakvom zaključku govori podatak da noradrenalin, posredstvom  $\beta$ -AR, sinergistički sa IL-1 $\beta$ , podstiče ekspresiju IL-6 u ćelijama glioma (Zumwalt i sar., 1999). Shodno ovome i smanjena procentualna zastupljenost IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> ćelija u mikrogliji kičmene moždine životinja tretiranih propranololom u odnosu na kontrolne životinje podržava manju ekspresiju IL-6 u mijeloidnim ćelijama životinja tretiranih propranololom. Dodatnu težinu ovom nalazu daju podaci koji ukazuju da se povećanje ekspresije IL-6, indukovano noradrenalinom, može sprečiti propranololom (Haldar i sar., 2018; Yang i sar., 2014). Ekspresija gena za Stat3 i IL-6 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine kontrolnih mužjaka bila je veća nego u ovim ćelijama ženki, a propranolol je efikasnije smanjivao ekspresiju iRNK za oba gena u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine mužjaka pacova. Ovaj nalaz je potrebno istaći, budući da u stresu, blokada  $\beta$ -AR smanjuje koncentraciju IL-6 u cirkulaciji kod muškaraca, ali ne i kod žena (Steptoe i sar., 2018).

Imajući u vidu da je Socs3 ključni regulator IL-6/Stat3 signalnog puta (Babon i sar., 2014), postavilo se pitanje da li negativna regulacija ekspresije gena za Stat3 i IL-6 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine nakon tretmana propranololom pacova kod kojih je indukovano EAE može biti posledica pojačane transkripcione aktivnosti gena za Socs3. Da je to zaista moglo biti tako sugerišu nalazi koji povezuju povećanu ekspresiju Socs3 u ćelijama sa smanjenim nivoom Stat3 proteina u njima (Kong i sar., 2002). Zaista, nakon tretmana propranololom pokazana je povećana ekspresija iRNK za Socs3 u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine pacova kod kojih je indukovano EAE, sa efektom, kao i u slučaju transkripta za IL-6 i Stat3, izraženijim kod mužjaka. Smanjenje ekspresije Socs3 kod životinja tretiranih propranololom podržavaju podaci koji ukazuju da, u uslovima nedostatka IL-6, stimulacija  $\beta$ -AR uzrokuje smanjenje ekspresije Socs3 (Dziemidowicz i sar., 2019). Ovaj rezultat se može povezati i sa povećanom zastupljenošću IL-10<sup>+</sup> ćelija mikroglije kod životinja oba pola tretiranih propranololom, budući da IL-10 selektivno pojačava ekspresiju iRNK za Socs3 u imunskim ćelijama (Cassatella i sar., 1999; Cevey i sar., 2019; Ding i sar., 2003). Važno je napomenuti da Socs3 specifično deluje na prenos signala koji zavisi od gp-130 (engl. *glycoprotein 130*), i time reguliše signalizaciju posredstvom IL-6, ali ne utiče na signalizaciju koju

pokreće IL-10 (Prêle i sar., 2006). Naime, iako oba citokina mogu da aktiviraju Stat3, razlike u kinetici njegove aktivacije nakon dejstva IL-6 i IL-10 za posledicu imaju pokretanje potpuno različitih ćelijskih sekretornih odgovora (Braun i sar., 2013). IL-6 podstiče proinflamatorni, dok IL-10 pokreće snažan anti-inflamatorni odgovor ćelija, a povećanje Socs3 selektivno utiče na ekspresiju gena koji učestvuju u proinflamatornom odgovoru (Braun i sar., 2013; Carow i Rottenberg, 2014).

Kao sa signalnim putevima zavisnim od Nrf2 (Johnson i sar., 2010), promene u ekspresiji i/ili aktivnosti transkripcionih faktora Stat3 i Socs3 povezane su sa težinom neurološkog deficita u EAE. Farmakološka inhibicija Stat3 u mišjem modelu EAE, smanjuje neuroinflamaciju i ublažava težinu bolesti (Alhazzani i sar., 2021; Dang i sar., 2021). U svetlu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji posebno je važan nalaz da selektivna delecija gena za Stat3 u mijeloidnim ćelijama potpuno sprečava razvoj EAE (Lu i sar., 2020), što je povezano sa smanjenom sposobnošću mijeloidnih ćelija da prezentuju antigene i njihovim smanjenim kapacitetom podsticanja diferencijacije patogenih Th17 limfocita i, sledstveno, smanjenom neuroinflamacijom. Suprotno ovim nalazima, delecija Socs3 u mijeloidnim ćelijama, mikrogliji i makrofagima, izaziva pojavu težeg oblika EAE, zahvaljujući pojačanoj aktivnosti Stat3 signalnog puta u mijeloidnim ćelijama, te povećanoj ekspresiji inflamatornih medijatora, kao i imunskom odgovoru posredovanom Th1/Th17 limfocitima (Qin i sar., 2012; Yan i sar., 2019).

Uz sve prethodno navedeno, potrebno je napomenuti da su signani putevi transkripcionih faktora Nrf2 i Stat3, po svemu sudeći, unakrsno regulisani. Postoje podaci da aktivacija Nrf2, povećavajući ekspresiju proteina SHP (engl. *small heterodimeric protein*), ima za posledicu smanjenje transkripcije gena za Stat3 (Gong i sar., 2020). Smanjenje ekspresije Stat3 kod životinja tretiranih propranololom moglo bi se, takođe, dovesti u vezu sa povećanjem ekspresije Nrf2, uzimajući u obzir da je aktivacija Stat3 neophodna za gensku transkripciju zavisnu od NF- $\kappa$ B, koja dovodi do smanjenja transkripcije i aktivnosti Nrf2 (Lee i sar., 2009; Wardyn i sar., 2015).

Promene u aktivnosti Nrf2/HO-1 i Stat3/Socs3 signalnih puteva u mikrogliji/mijeloidnim ćelijama nakon tretmana propranololom mogu se povezati sa smanjenom ekspresijom gena za hemokine CCL2, CCL19 i CCL21 u tkivu kičmene moždine pacova oba pola, pri čemu je tretman efikasnije delovao kod mužjaka. Precizno, aktivacija transkripcionog faktora Nrf2 sprečava ushodnu regulaciju ekspresije gena za CCL2 (Dinkova-Kostova i sar., 2018), koji se sintetiše u mikrogliji (Semple i sar., 2010) i jedan je od široko prihvaćenih markera proinflamatornih ćelija (Qin i sar., 2012). Osim toga, pokazano je da u odsustvu gena za Stat3, mijeloidne ćelije pokazuju smanjenu sintezu proinflamatornih hemokina (Lu i sar., 2020), dok nedostatak gena za Socs3 rezultuje povećanjem njihove ekspresije (Qin i sar., 2012), uključujući i CCL2. S druge strane, sugerisano je da noradrenalin, posredstvom  $\beta$ -AR, može doprineti ushodnoj regulaciji gena za CCL2 i CCL21, kao i niza drugih hemokina u kičmenoj moždini (Arima i sar., 2012). Manja ekspresija gena za hemokine u tkivu kičmene moždine pacova koji su tretirani propranololom može se povezati sa smanjenim ulaskom inflamatornih monocita/makrofaga (Columba-Cabezas i sar., 2003; Semple i sar., 2010; Shi i Pamer, 2011; Yu i sar., 2012), ali i patogenih CD4+ T-limfocita (Alt i sar., 2002; Columba-Cabezas i sar., 2003; Kara i sar., 2015) u njihovu kičmenu moždinu. Zaista, iz kičmene moždine ženki i mužjaka pacova koji su primali propranolol izolovan je manji broj monocita/makrofaga i CD4+ T-limfocita.

Kod ženki i mužjaka pacova koji su tretirani propranololom, osim manjeg broja inflamatornih monocita/makrofaga koji infiltriraju kičmenu moždinu, u ovoj populaciji ćelija je nađena i manja procentualna zastupljenost IL-1 $\beta$ + ćelija, a veća procentualna zastupljenost ćelija koje proizvode IL-10 i TGF- $\beta$ , u odnosu na odgovarajuće kontrolne pacove. Ovo je važno s obzirom na činjenicu da je sinteza/sekrecija IL-1 $\beta$  u/iz inflamatornih monocita/makrofaga ključna



za razvoj EAE (Lévesque i sar., 2016), kao i da je povećanje sinteze/sekrecije anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- $\beta$  u/iz monocita povezano sa povoljnim tokom EAE kod miševa tretiranih glatiramer-acetatom, lekom odobrenim za terapiju MS (Weber i sar., 2007). U prilog ovom nalazu govore prethodno navedena istraživanja koja su pokazala da: 1) selektivna delecija gena za Stat3 u mijeloidnim ćelijama korelira sa njihovom smanjenom sintezom proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6) nakon infiltracije u kičmenu moždinu (Lu i sar., 2020), i 2) selektivna delecija gena za Socs3 u mijeloidnim ćelijama promovira njihovu diferencijaciju u klasično aktivirane ćelije koje sintetišu proinflamatorne citokine, poput IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23 (Qin i sar., 2012). Pored toga, funkcijski fenotip makrofaga kritično zavisi od promena u njihovom citokinskom mikrookruženju, tako da prisustvo citokina poput IL-10 i TGF- $\beta$  favorizuje anti-inflamatorne funkcije ovih ćelija (Stout i sar., 2005). Sledstveno, povećana zastupljenost mikroglije koja eksprimira ove anti-inflamatorne citokine u kičmenoj moždini nakon tretmana propranololom mogla bi doprineti i polarizaciji infiltrirajućih mijeloidnih ćelija u smeru alternativne aktivacije.

Pored smanjene infiltracije CD4<sup>+</sup> T-limfocita, promene u aktivnosti CX3CR1/Nrf2/HO-1 i Stat3/Socs3 signalnih osovina mogu se dovesti u vezu i sa njihovom smanjenom reaktivacijom u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova tretiranih propranololom. Naime, delecijom gena za CX3CR1, ćelije mikroglije mogu razviti fenotip dendritskih ćelija koje efikasno aktiviraju T-limfocite (Garcia i sar., 2013), dok prisustvo CX3CR1 na membrani ovih ćelija suprimira njihovu sposobnost aktivacije T-limfocita (Schetters i sar., 2018). Takođe, dostupni podaci sugerišu da, u odsustvu ekspresije Stat3, mijeloidne ćelije imaju smanjenu sposobnost aktivacije i stimulacije proliferacije patogenih T-limfocita (Lu i sar., 2020), dok ih nedostatak ekspresije Socs3 čini efikasnijim u aktivaciji i pokretanju proliferacije T-limfocita (Qin i sar., 2012).

Konačno, pokazano je i da CD4<sup>+</sup> T-limfociti u kičmenoj moždini ženki i mužjaka pacova koji su tretirani propranololom pokazuju manju diferencijaciju u patogene Th17 limfocite, uključujući i izuzetno patogene T-limfocite koji uz IL-17 proizvode i IFN- $\gamma$  i GM-CSF. Ovaj nalaz se može objasniti smanjenom ekspresijom gena za IL-6 u mijeloidnim ćelijama (Harbour i sar., 2020), kao i manjom procentualnom zastupljenošću IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> mikroglije/infiltrirajućih mijeloidnih ćelija (Ghoreschi i sar., 2010) u kičmenoj moždini pacova koji su tretirani propranololom. Naime, IL-6 je uključen u indukciju diferencijacije, kao i održavanje fenotipa i funkcije Th17 limfocita (Harbour i sar., 2020), dok je IL-1 $\beta$  ključni faktor u ranoj diferencijaciji (Ghoreschi i sar., 2010), ali i ekspanziji (Mufazalov i sar., 2017) patogenih Th17 limfocita, uključujući i subpopulaciju koja koeksprimira IFN- $\gamma$  i GM-CSF (El-Behi i sar., 2011; Lukens i sar., 2012; Mufazalov i sar., 2017). Sa druge strane, pokazano je da je hemokin CCL2 uključen i u infiltraciju kičmene moždine CD8<sup>+</sup> T-limfocitima (Kooij i sar., 2014), koji se, pod istim uslovima kao i CD4<sup>+</sup> T-limfociti, diferenciraju u ćelije sposobne za produkciju IL-17 (Arra i sar., 2017; Srenathan i sar., 2016). Kako ove ćelije potpomažu diferencijaciju autoreaktivnih Th17 limfocita (El-Behi i sar., 2014; Huber i sar., 2013; Stojić-Vukanić i sar., 2018b), moguće je pretpostaviti da je smanjena diferencijacija patogenih Th17 limfocita u kičmenoj moždini pacova koji su primali propranolol, bar delom, posledica umanjene infiltracije kičmene moždine autoreaktivnim CD8<sup>+</sup> T-limfocitima, i njihove diferencijacije u CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> ćelije. S obzirom na smanjenu diferencijaciju patogenih Th17 limfocita, a u svetlu neizmenjene zastupljenosti Treg ćelija u kičmenoj moždini pacova tretiranih propranololom, količnik broja IL17<sup>+</sup> Tef i Treg ćelija kod ovih životinja bio je smanjen. Količnik broja IL-17<sup>+</sup> efektorskih i Treg ćelija važan je za razvoj autoimunske inflamacije, i smatra se da je povećanje ovog količnika važan faktor u patogenezi različitih autoimunskih bolesti, uključujući multiplu sklerozu (Lee, 2018). Imajući u vidu povećanje zastupljenosti TGF- $\beta$ <sup>+</sup> ćelija, uporedo sa smanjenom zastupljenošću IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> ćelija i ekspresijom gena za IL-6 u mikrogliji/infiltrirajućim mijeloidnim ćelijama kičmene moždine nakon tretmana propranololom, izostanak promene

zastupljenosti Treg ćelija u subpopulaciji CD4+ limfocita nije bio očekivan (Freudenberg i sar., 2018; Lee, 2018). Ovaj fenomen može biti objašnjen podacima da stimulacija  $\beta_2$ -AR, zavisno od aktivacije protein-kinaze A, stimuliše konverziju konvencionalnih efektorskih CD4+Foxp3-limfocita u Treg ćelije, kao i njihovu supresivnu funkciju (Guereschi i sar., 2013). Drugim rečima, stimulatívno delovanje propranolola na raspoloživost TGF- $\beta$ , po svemu sudeći, bilo je antagonizovano njegovim direktnim inhibitornim delovanjem na diferencijaciju CD4+ T-limfocita u Treg ćelije.

Kako su efekti primene propranolola na aktivnost CX3CR1/Nrf2/HO-1 i IL-6/Stat3/Socs3 signalnih osovina u ćelijama kičmene moždine bili izraženiji kod mužjaka u odnosu na ženke pacova, ovaj tretman je pokazao i veću efikasnost kod mužjaka u ograničavanju neuroinflamacije posredovane Th17 limfocitima i, u skladu sa tim, u smanjenju težine neurološkog deficita EAE.

Sumirano, poslednji deo istraživanja je pokazao: 1) da noradrenalin u kičmenoj moždini, posredstvom  $\beta$ -AR, delujući na Nrf2/HO-1 i IL-6/Stat3/Socs3 signalne osovine, stimuliše polarizaciju mikroglije prema proinflamatornom fenotipu i, posledično, pospešuje infiltraciju kičmene moždine Th17 i mijeloidnim ćelijama iz cirkulacije, pojačava njihove proinflamatorne funkcije, i time povećava težinu neurološkog deficita u EAE, i 2) da je ovakvo delovanje izraženije kod jedinki muškog pola, odražavajući veću koncentraciju noradrenalina i ekspresiju  $\beta_2$ -AR u njihovoj kičmenoj moždini, kao i postojanje polnih razlika u ispitivanim signalnim osovinama. Ova saznanja su izuzetno važna imajući u vidu raširenu primenu propranolola u terapiji velikog broja oboljenja (Farzam i Jan, 2022), uključujući i tremor u MS (Koch i sar., 2007; Meador i sar., 2016; Schneider i Deuschl, 2014). Takođe, nalazi ovih istraživanja jasno sugerišu da bi, pri razmatranju terapijskih pristupa u cilju ograničavanja patološkog Th17 ćelijskog odgovora i neuroinflamacije, trebalo uzeti u obzir polne razlike u delovanju ne samo antagonista  $\beta$ -AR već i drugih supstanci koje utiču na odeljak mijeloidnih ćelija u CNS. Naime, podaci iz kliničke prakse pokazuju postojanje polnih razlika u odgovoru na tretman autoimunskih oboljenja, pri čemu imunosupresivne terapije, po svemu sudeći, pokazuju veću efikasnost kod muškaraca (Klein i Morgan, 2020).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije moguće je doneti sledeće zaključke.

### I Tretman antagonistom $\beta$ -AR propranololom u peri-induktivnoj/induktivnoj fazi EAE efikasniji je u smanjenju težine neurološkog deficita kod mužjaka nego kod ženki pacova soja DA

1. Tretman propranololom smanjuje infiltraciju kičmene moždine mononuklearnim ćelijama, uključujući i Th17 limfocite, što se može povezati sa: smanjenom migracijom antigen-prezentujućih ćelija koje su preuzele antigen sa mesta imunizacije u drenirajuće limfne čvorove (što, makar delimično, odražava smanjenu ekspresiju gena za CCL19 i CCL21 u njima) i, sledstveno, manjom zastupljenošću aktiviranih CD11b<sup>+</sup> antigen-prezentujućih ćelija, pa i aktiviranih/proliferišućih ukupnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita i Th17 subpopulacije T-limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima.
2. Ispitivanja delovanja propranolola u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova pokazuju da propranolol povećava:
  - a) proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita, što se može povezati sa izraženijom stimulacijom sinteze i/ili sekrecije IL-2 u/iz ovih ćelija mužjaka u odnosu na ćelije ženki pacova;
  - b) zastupljenost CD4<sup>+</sup> limfocita koji sintetišu IL-17, uključujući i one koji sintetišu GM-CSF, što korelira s povećanjem ekspresije gena koji kodira ROR $\gamma$ t, a kao rezultat delovanja blokade  $\beta$ -AR kako direktno na njegovu ekspresiju u CD4<sup>+</sup> limfocitima, tako i indirektno, povećanjem ekspresije gena za IL-1 $\beta$  i IL-23 u antigen-prezentujućim ćelijama.
3. Inhibitorni efekti tretmana propranololom na migraciju antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove i njihov aktivacioni profil su izraženiji kod mužjaka nego kod ženki pacova kojima je indukovana EAE, što se može povezati sa većom koncentracijom noradrenalina u tkivu drenirajućih limfnih čvorova mužjaka, ali su stimulatorni efekti propranolola na proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita i diferencijaciju Th17 limfocita izraženiji u kulturama ćelija drenirajućih limfnih čvorova mužjaka nego ženki pacova kojima je indukovana EAE, te se može pretpostaviti da ovakvi efekti propranolola ne dozvoljavaju da do izražaja dođu posledice polnih razlika koje su uočene u njegovom delovanju na migraciju antigen-prezentujućih ćelija u drenirajuće limfne čvorove EAE životinja.
4. Odsustvo polnih razlika u inhibitornim efektima prazosina, antagonista  $\alpha_1$ -AR, na proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita i njihovu diferencijaciju u ćelije koje proizvode IL-17 u kulturi ćelija drenirajućih limfnih čvorova EAE životinja objašnjava fokusiranje daljih istraživanja na ispitivanje uticaja noradrenalina, posredstvom  $\beta$ -AR, na ćelije koje učestvuju u patogenezi EAE.
5. Odsustvo polnih razlika u delovanju propranolola na aktivaciju/proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita i broj Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima, ukazuje da izraženije smanjenje težine neurološke slike EAE kod mužjaka tretiranih propranololom najverovatnije ne zavisi

od polno-specifičnih efekata tretmana na primarni (auto)imunski odgovor, već od efekata na nivou ciljnog organa (kičmene moždine).

## **II Tretman propranololom u efektorskoj fazi EAE izraženije ublažava težinu neurološkog deficita kod mužjaka nego kod ženki pacova soja DA, što se može povezati sa:**

1. Efikasnijom transkripcionom aktivacijom komponenti anti-inflamatorne Nrf2/HO-1 signalne osovine (direktnim delovanjem propranolola, ili indirektno, stimulacijom CX3CL1/CX3CR1 signalnog puta), kao i smanjenom ekspresijom komponenti IL-6/Stat3 signalne osovine, a povećanom ekspresijom gena za Socs3 (ključni regulator IL-6/Stat3 puta), u mijeloidnim ćelijama (prevažodno mikrogliji) kičmene moždine mužjaka pacova na vrhuncu bolesti, i sledstveno efikasnijom stimulacijom njihove polarizacije ka anti-inflamatornom/protektivnom fenotipu, sudeći prema smanjenoj ekspresiji proinflamatornih (iNOS, Nox2, IL-1 $\beta$ ), a povećanoj ekspresiji anti-inflamatornih (Arg1, IL-10, TGF- $\beta$ ) enzima/citokina u mijeloidnim ćelijama/mikrogliji i povećanoj sposobnosti mikroglije za fagocitozu/endocitozu.
2. Efikasnijim smanjenjem infiltracije mijeloidnih ćelija i T-limfocita iz cirkulacije u kičmenu moždinu mužjaka pacova kod kojih je indukovana EAE, što se može, makar delimično, pripisati detektovanom izraženijem smanjenju ekspresije gena za hemokine CCL2, CCL19 i CCL21 u tkivu kičmene moždine ovih životinja.
3. Efikasnijim usmeravanjem diferencijacije mijeloidnih ćelija koje infiltriraju kičmenu moždinu mužjaka pacova u ćelije anti-inflamatornog fenotipa (sudeći prema manjoj zastupljenosti ćelija koje proizvode IL-1 $\beta$ , a većoj zastupljenosti onih koje proizvode IL-10 i TGF- $\beta$  u ovoj populaciji).
4. Efikasnijim smanjenjem reaktivacije T-limfocita koji infiltriraju kičmenu moždinu mužjaka pacova, njihove diferencijacije u ćelije koje proizvode IL-17, uključujući i one izrazito patogenog IFN- $\gamma$ +GM-CSF+ fenotipa, što pomera odnos broja IL-17+ T-limfocita i Treg ćelija na stranu Treg ćelija.
5. Većom koncentracijom noradrenalina u tkivu i ekspresijom gena za  $\beta_2$ -AR, ključni podtip  $\beta$ -AR u imunskom sistemu, u mijeloidnim ćelijama kičmene moždine mužjaka pacova, čemu se mogu pripisati sve prethodno opisane polne razlike u delovanju propranolola.

Ukratko, rezultati ove disertacije su pokazali (a) da noradrenalin, poreklom iz nervnih vlakana, ali i imunskih ćelija, delujući posredstvom  $\beta$ - i  $\alpha_1$ -AR, na različite populacije imunskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima i kičmenoj moždini učestvuje u patogenezi EAE, s tim što se efekti posredovani  $\beta$ -AR mogu povezati s polnim razlikama u njegovom delovanju (izraženiji efekti kod mužjaka), i (b) da prevažodno polne razlike u delovanju ovog neurotransmitera/hormona na rezidentne mijeloidne ćelije u ciljnom organu (kičmenoj moždini) doprinose polnim razlikama u težini bolesti.

## 7. LITERATURA

- Alvarez-Sanchez N., Dunn S.E.. Immune cell contributors to the female sex bias in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. (2023). *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 62, 333-373. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2022\\_324](https://doi.org/10.1007/7854_2022_324)
- Acaz-Fonseca, E., Duran, J. C., Carrero, P., Garcia-Segura, L. M., & Arevalo, M. A. (2015). Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *Glia*, 63(11), 1966–1981. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22867>
- Adamczyk, B., & Adamczyk-Sowa, M. (2016). New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1973834>
- 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 Research*, 1453, 77–86. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.03.023>
- Alderson, K. L., Zhou, Q., Berner, V., Wilkins, D. E. C., Weiss, J. M., Blazar, B. R., Welniak, L. A., Wiltout, R. H., Redelman, D., & Murphy, W. J. (2008). Regulatory and Conventional CD4 + T Cells Show Differential Effects Correlating with PD-1 and B7-H1 Expression after Immunotherapy . *The Journal of Immunology*, 180(5), 2981–2988. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2981>
- Alhazzani, K., Ahmad, S. F., Al-Harbi, N. O., Attia, S. M., Bakheet, S. A., Sarawi, W., Alqarni, S. A., Algahtani, M., & Nadeem, A. (2021). Pharmacological inhibition of stat3 by stattic ameliorates clinical symptoms and reduces autoinflammation in myeloid, lymphoid, and neuronal tissue compartments in relapsing–remitting model of experimental autoimmune encephalomyelitis in sjl/j mice. *Pharmaceutics*, 13(7), 925. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13070925/S1>
- Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. A., & Laufer, T. M. (2008). Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T cells. *Immunity*, 29(5), 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.013>
- Alley, J., Khasabov, S., Simone, D., Beitz, A., Rodriguez, M., & Njenga, M. K. (2003). More severe neurologic deficits in SJL/J male than female mice following Theiler’s virus-induced CNS demyelination. *Experimental Neurology*, 180(1), 14–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(02\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(02)00054-7)
- 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. *Journal of Neuroimmunology*, 209(1–2), 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.01.026>
- Alt, C., Laschinger, M., & Engelhardt, B. (2002). Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyel. *European Journal of Immunology*, 32(8), 2133–2144. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200208\)32:8<2133::AID-IMMU2133>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2133::AID-IMMU2133>3.0.CO;2-W)
- Ambegaokar, S., & Kolson, D. (2014). Heme Oxygenase-1 Dysregulation in the Brain: Implications for HIV Associated Neurocognitive Disorders. *Current HIV Research*, 12(3), 174–188. <https://doi.org/10.2174/1570162X12666140526122709>
- Ankenman, R., & Salvatore, M. F. (2007). Low dose alpha-methyl-para-tyrosine (AMPT) in the treatment of dystonia and dyskinesia. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*,

19(1), 65–69. <https://doi.org/10.1176/jnp.2007.19.1.65>

- Araujo, L.P., Maricato, J.T., Guereschi, M.G., Takenaka, M.C., Nascimento, V.M., de Melo, F.M., Quintana, F.J., Brum, P.C., & Basso, A.S. (2019). The Sympathetic Nervous System Mitigates CNS Autoimmunity via  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signaling in Immune Cells. *Cell Reports*, 28(12):3120–3130.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.042>
- Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J. H., Kawano, F., Yull, F. E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U. A. K., Márquez, G., Blackwell, T. S., Ohira, Y., Hirano, T., & Murakami, M. (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*, 148(3), 447–457. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.022>
- Arra, A., Lingel, H., Kuropka, B., Pick, J., Schnoeder, T., Fischer, T., Freund, C., Pierau, M., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2017). The differentiation and plasticity of Tc17 cells are regulated by CTLA-4-mediated effects on STATs. *Oncoimmunology*, 6(2). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1273300>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Ascherio, A. (2013). Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 13(12 SUPPL.), 3–9. <https://doi.org/10.1586/14737175.2013.865866>
- Atkins, G. J., Amor, S., Fletcher, J. M., & Mills, K. H. G. (2012). The Biology of Multiple Sclerosis. *The Biology of Multiple Sclerosis*, 1–136. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511979088>
- Bao JY, Huang Y, Wang F, Peng YP, Qiu YH. (2007) Expression of alpha-AR subtypes in T lymphocytes and role of the alpha-ARs in mediating modulation of T cell function. *Neuroimmunomodulation*, 14(6):344-53. doi: 10.1159/000129670
- Babon, J. J., Varghese, L. N., & Nicola, N. A. (2014). Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Seminars in Immunology*, 26(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2013.12.004>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet.* 2017 Dec;33(12):960-970. doi: 10.1016/j.tig.2017.09.004
- Barnard, D. F., Gabella, K. M., Kulp, A. C., Parker, A. D., Dugan, P. B., & Johnson, J. D. (2019). Sex differences in the regulation of brain IL-1 $\beta$  in response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*, 103, 203–211. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2019.01.026>
- Barnes, C., & Eltherington, L. (1966). *Drug dosage in laboratory animals: a handbook*. University of California Press.
- Basu, A., Krady, J. K., & Levison, S. W. (2004). Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2), 151–156. <https://doi.org/10.1002/JNR.20266>
- Beeton, C., Garcia, A., & George Chandy, K. (2007). Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 5. <https://doi.org/10.3791/224>
- Bellinger, D. L., & Lorton, D. (2014). Autonomic regulation of cellular immune function. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 182, 15–41. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2014.01.006>
- Benarroch EE. (2009). The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology*. 73:1699–704. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c2937c

- Benarroch, E.E. (2018). Locus coeruleus. *Cell and Tissue Research*, 373(1), 221–232. <https://doi.org/10.1007/S00441-017-2649-1>
- Benusa, S. D., & Lafrenaye, A. D. (2020). Microglial process convergence on axonal segments in health and disease. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 7(23). <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2019.28>
- Bereshchenko, O., Bruscoli, S., & Riccardi, C. (2018). Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01332>
- Bergman, R. K., Munoz, J. J., & Portis, J. L. (1978). Vascular permeability changes in the central nervous system of rats with hyperacute experimental allergic encephalomyelitis induced with the aid of a substance from Bordetella pertussis. *Infection and Immunity*, 21(2), 627. <https://doi.org/10.1128/IAI.21.2.627-637.1978>
- Bhowmick, S., Singh, A., Flavell, R. A., Clark, R. B., O'Rourke, J., & Cone, R. E. (2009). The sympathetic nervous system modulates CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells via a TGF-beta-dependent mechanism. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(6), 1275–1283. <https://doi.org/10.1189/JLB.0209107>
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., & Boddeke, H. W. G. M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(11), 596–602. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.08.007>
- Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. (2004). Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*, 15;172(6):3893-904. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3893
- Billiau A, Matthys P. (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*, 70:849–60. doi: 10.1189/jlb.70.6.849
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 86. <https://doi.org/10.3791/51275>
- Blandino, P., Barnum, C. J., & Deak, T. (2006). The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL-1 $\beta$  responses to stress. *Journal of Neuroimmunology*, 173(1–2), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.11.021>
- Bollampalli, V. P., Nylén, S., & Rothfuchs, A. G. (2016). A CFSE-based Assay to Study the Migration of Murine Skin Dendritic Cells into Draining Lymph Nodes During Infection with Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2016(116), 54620. <https://doi.org/10.3791/54620>
- Borchard, U. (1990). Pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking agents: clinical significance of hepatic and/or renal clearance. *Clinical Physiology and Biochemistry*, 8 Suppl 2, 28–34.
- Bordeleau, M., Carrier, M., Luheshi, G. N., & Tremblay, M. È. (2019). Microglia along sex lines: From brain colonization, maturation and function, to implication in neurodevelopmental disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, 152–163. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.06.001>
- Bouman, A., Heineman, M., & Faas, M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update*, 11(4), 411–423. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMI008>
- Bove, R., & Chitnis, T. (2014). The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/1352458513519181>, 20(5), 520–526. <https://doi.org/10.1177/1352458513519181>
- Braun, D. A., Fribourg, M., & Sealfon, S. C. (2013). Cytokine Response Is Determined by Duration of Receptor and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) Activation.

- The Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 2986. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.386573>
- Brennan, F. H., Li, Y., Wang, C., Ma, A., Guo, Q., Li, Y., Pukos, N., Campbell, W. A., Witcher, K. G., Guan, Z., Kigerl, K. A., Hall, J. C. E., Godbout, J. P., Fischer, A. J., McTigue, D. M., He, Z., Ma, Q., & Popovich, P. G. (2022). Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-31797-0>
- Bretscher, P. A. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 185–190. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.185>
- Briones-Buixassa L, Milà R, M Aragonès J, Bufill E, Olaya B, Arrufat FX. (2015) Stress and multiple sclerosis: a systematic review considering potential moderating and mediating factors and methods of assessing stress. *Health Psychol Open*, 2:2055102915612271. doi: 10.1177/2055102915612271
- Brosnan, C. F., Goldmuntz, E. A., Cammer, W., Factor, S. M., Bloom, B. R., & Norton, W. T. (1985). Prazosin, and  $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(17), 5915–5919. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.17.5915>
- Brown, B. N., Valentin, J. E., Stewart-Akers, A. M., McCabe, G. P., & Badylak, S. F. (2009). Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*, 30(8), 1482–1491. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.11.040>
- Bruce-Keller, A. J., Dimayuga, F. O., Reed, J. L., Wang, C., Angers, R., Wilson, M. E., Dimayuga, V. M., & Scheff, S. W. (2007). Gender and Estrogen Manipulation Do Not Affect Traumatic Brain Injury in Mice. <https://Home.Liebertpub.Com/Neu>, 24(1), 203–215. <https://doi.org/10.1089/NEU.2006.0163>
- Butterfield RJ, Blankenhorn EP, Roper RJ, Zachary JF, Doerge RW, Sudweeks J, Rose J, Teuscher C. (1999) Genetic analysis of disease subtypes and sexual dimorphisms in mouse experimental allergic encephalomyelitis (EAE): relapsing/remitting and monophasic remitting/nonrelapsing EAE are immunogenetically distinct. *J Immunol*, 1;162(5):3096-102. doi: 10.4049/jimmunol.162.5.3096
- Butterworth, M., McClellan, B., & Aklansmith, M. (1967). Influence of Sex on Immunoglobulin Levels. *Nature* 1967 214:5094, 214(5094), 1224–1225. <https://doi.org/10.1038/2141224a0>
- Cai, W., Dai, X., Chen, J., Zhao, J., Xu, M., Zhang, L., Yang, B., Zhang, W., Rocha, M., Nakao, T., Kofler, J., Shi, Y., Anne Stetler, R., Hu, X., & Chen, J. (2019). STAT6/Arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *JCI Insight*, 4(20). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.131355>
- Capellino, S., Weber, K., Gelder, M., Härle, P., & Straub, R. H. (2012). First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. *Arthritis and Rheumatism*, 64(4), 1110–1118. <https://doi.org/10.1002/ART.33431>
- Cardona, S. M., Kim, S. V., Church, K. A., Torres, V. O., Cleary, I. A., Mendiola, A. S., Saville, S. P., Watowich, S. S., Parker-Thornburg, J., Soto-Ospina, A., Araque, P., Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2018). Role of the fractalkine receptor in CNS autoimmune inflammation: new approach utilizing a mouse model expressing the human CX3CR1I249/M280 variant. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 416796. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00365/BIBTEX>
- Carow, B., & Rottenberg, M. E. (2014). SOCS3, a major regulator of infection and inflammation.



- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A., & Turano, A. (1997). Flow Cytometric Analysis of Activation Markers on Stimulated T Cells and Their Correlation With Cell Proliferation. In *Cytometry* (Vol. 27). Wiley-Liss, Inc.
- Cassatella, M. A., Gasperini, S., Bovolenta, C., Calzetti, F., Vollebregt, M., Scapini, P., Marchi, M., Suzuki, R., Suzuki, A., & Yoshimura, A. (1999). Interleukin-10 (IL-10) Selectively Enhances CIS3/SOCS3 mRNA Expression in Human Neutrophils: Evidence for an IL-10-Induced Pathway That Is Independent of STAT Protein Activation. *Blood*, 94(8), 2880–2889. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.8.2880.420K31\\_2880\\_2889](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.8.2880.420K31_2880_2889)
- Castro-Sánchez, S., García-Yagüe, Á. J., Kügler, S., & Lastres-Becker, I. (2019). CX3CR1-deficient microglia shows impaired signalling of the transcription factor NRF2: Implications in tauopathies. *Redox Biology*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101118>
- Cevey, Á. C., Penas, F. N., Alba Soto, C. D., Mirkin, G. A., & Goren, N. B. (2019). IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1267. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01267>
- Chelmicka-Schorr E, Checinski M, Arnason BG. (1988) Sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 540:707-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb27220.x
- Chelmicka-Schorr, E., Kwasniewski, M. N., Thomas, B. E., & Arnason, B. G. W. (1989). The  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of Neuroimmunology*, 25(2–3), 203–207. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90138-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90138-0)
- Chen, S., Dong, Z., Cheng, M., Zhao, Y., Wang, M., Sai, N., Wang, X., Liu, H., Huang, G., & Zhang, X. (2017). Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-017-0963-X>
- Chhatar, S., & Lal, G. (2021). Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication. *Current Research in Immunology*, 2, 202. <https://doi.org/10.1016/J.CRIMMU.2021.11.001>
- Chitnis T. (2013). Role of puberty in multiple sclerosis risk and course. *Clin Immunol*, 149(2):192-200. doi: 10.1016/j.clim.2013.03.014
- Choi, B. Y., Kim, J. H., Kho, A. R., Kim, I. Y., Lee, S. H., Lee, B. E., Choi, E., Sohn, M., Stevenson, M., Chung, T. N., Kauppinen, T. M., & Suh, S. W. (2015). Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0325-5>
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., MacE, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C. N., Muratet, M., Newberry, K. M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F. K., Birchmeier, C., Wagner, E. F., Murphy, K. M., ... Littman, D. R. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*, 151(2), 289–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>
- Codarri, L., Gyölvészii, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., & Becher, B. (2011). ROR $\gamma$ 3t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, 12(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>
- Columba-Cabezas, S., Serafini, B., Ambrosini, E., & Aloisi, F. (2003). Lymphoid Chemokines

- CCL19 and CCL21 are Expressed in the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for the Maintenance of Chronic Neuroinflammation. *Brain Pathology*, 13(1), 38. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2003.TB00005.X>
- Confavreux, C., Aimard, G., & Devic, M. (1980). Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain : A Journal of Neurology*, 103(2), 281–300. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/103.2.281>
- Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*, 339(5):285-91. doi: 10.1056/NEJM199807303390501
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 164, Issue 4, pp. 1079–1106). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Correale J., Balbuena Aguirre M.E, Farez M.F. (2013). Sex-specific environmental influences affecting MS development. *Clin Immunol*, 149(2):176-81. doi: 10.1016/j.clim.2013.02.006
- Cook, I. F. (2008). Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine*, 26(29–30), 3551–3555. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2008.04.054>
- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K., & Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(2), 667–673. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.1094>
- Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. (2008). Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol*, 28(6):697-706. doi: 10.1007/s10875-008-9236-x
- Coyle, P. K. (2021). What Can We Learn from Sex Differences in MS? *Journal of Personalized Medicine*, 11(10), 1006. <https://doi.org/10.3390/JPM11101006>
- Cyster, J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual Review of Immunology*, 23, 127–159. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115628>
- Damsker, J. M., Hansen, A. M., & Caspi, R. R. (2010). Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1183, pp. 211–221). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x>
- Dang, C., Lu, Y., Chen, X., & Li, Q. (2021). Baricitinib Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.650708>
- Dart A.M., Du X.J., Kingwell B.A. (2002). Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 53(3):678-87. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00508-9
- Da Silva J.A. (1999). Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 876:102-17; discussion 117-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07628.x
- Deckx N., Lee W.P., Berneman Z.N., Cools N. (2013). Neuroendocrine immunoregulation in multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol*, 705232. doi: 10.1155/2013/705232
- de Coupade, C., Brown, A. S., Dazin, P. F., Levine, J. D., & Green, P. G. (2007). beta(2)-Adrenergic receptor-dependent sexual dimorphism for murine leukocyte migration. *Journal of Neuroimmunology*, 186(1–2), 54–62. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2007.02.010>
- de Coupade, C., Gear, R. W., Dazin, P. F., Sroussi, H. Y., Green, P. G., & Levine, J. D. (2004).

- Beta 2-adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic. *British Journal of Pharmacology*, 143(8), 1033–1041. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705972>
- De León-Nava, M. A., Nava, K., Soldevila, G., López-Griego, L., Chávez-Ríos, J. R., Vargas-Villavicencio, J. A., & Morales-Montor, J. (2009). Immune sexual dimorphism: Effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 113(1–2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.11.003>
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1059–1064. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.3.1059>
- Dello Russo C., Boullerne A.I., Gavrilyuk V., Feinstein D.L. (2004). Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J Neuroinflammation*, 30;1(1):9. doi: 10.1186/1742-2094-1-9
- Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 15(9):545-58. doi: 10.1038/nri3871
- Dimitrijević, M., Rauški, A., Radojević, K., Kosec, D., Stanojević, S., Pilipović, I., & Leposavić, G. (2007).  $\beta$ -adrenoceptor blockade ameliorates the clinical course of experimental allergic encephalomyelitis and diminishes its aggravation in adrenalectomized rats. *European Journal of Pharmacology*, 577(1–3), 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.021>
- Dimitrijević, M., Pilipović, I., Stanojević, S., Mitić, K., Radojević, K., Pešić, V., & Leposavić, G. (2009). Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide. *Journal of Neuroimmunology*, 211(1–2), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.03.014>
- Ding, Y., Chen, D., Tarcsafalvi, A., Su, R., Qin, L., & Bromberg, J. S. (2003). Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(3), 1383–1391. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.3.1383>
- Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V., & Kazantsev, A. G. (2018). The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. In *FEBS Journal* (Vol. 285, Issue 19, pp. 3576–3590). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14379>
- Djelilovic-Vranic, J., Alajbegovic, A., Tiric-Campara, M., Nakicevic, A., Osmanagic, E., Salcic, S., & Niksic, M. (2012). Stress as Provoking Factor for the First and Repeated Multiple Sclerosis Seizures. *Materia Socio-Medica*, 24(3), 142. <https://doi.org/10.5455/MSM.2012.24.142-147>
- Djikić, J., Nacka-Aleksić, M., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Bufan, B., Kosec, D., Dimitrijević, M., & Leposavić, G. (2014). Age-associated changes in rat immune system: Lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Gerontology*, 58, 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.08.005>
- Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci*, 13(7):8219-8258. doi: 10.3390/ijms13078219
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ENE.13819>
- Doss, P. M. I. A., Umair, M., Baillargeon, J., Fazazi, R., Fudge, N., Akbar, I., Yeola, A. P., Williams, J. B., Leclercq, M., Joly-Beauparlant, C., Beauchemin, P., Ruda, G. F., Alpaugh, M., Anderson, A. C., Brennan, P. E., Droit, A., Lassmann, H., Moore, C. S., & Rangachari, M. (2021). Male sex chromosomal complement exacerbates the pathogenicity of Th17 cells in a chronic model of central nervous system autoimmunity. *Cell Reports*, 34(10). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.108833>
- Dupuis, M. L., Maselli, A., Pagano, M. T., Pierdominici, M., & Ortona, E. (2019). Immune

- response and autoimmune diseases: A matter of sex. *Italian Journal of Gender-Specific Medicine*, 5(1), 11–20. <https://doi.org/10.1723/3148.31294>
- Dziemidowicz, M., Bonda, T. A., Litvinovich, S., Taranta, A., Winnicka, M. M., & Kamiński, K. A. (2019). The role of interleukin-6 in intracellular signal transduction after chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation in mouse myocardium. *Archives of Medical Science: AMS*, 15(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2019.89452>
- Ebbinghaus M., Gajda M., Boettger M.K., Schaible H.G., Bräuer R. (2012). The anti-inflammatory effects of sympathectomy in murine antigen-induced arthritis are associated with a reduction of Th1 and Th17 responses. *Ann Rheum Dis*, 71(2):253–61. doi: 10.1136/ard.2011.150318
- 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 TH 17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology*, 12(6), 568–575. <https://doi.org/10.1038/ni.2031>
- El-Behi, M., Dai, H., Magalhaes, J. G., Hwang, D., Zhang, G. X., Rostami, A., & Ciric, B. (2014). Committed Tc17 cells are phenotypically and functionally resistant to the effects of IL-27. *European Journal of Immunology*, 44(10), 3003–3014. <https://doi.org/10.1002/EJI.201344360>
- Elenkov I.J., Chrousos G.P. (1999). Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab*, 10(9):359–368. doi: 10.1016/s1043-2760(99)00188-5
- Elenkov, I., Wilder, R., Chrousos, G., & Vizi, E. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 595–638.
- Engler, K. L., Rudd, M. L., Ryan, J. J., Stewart, J. K., & Fischer-Stenger, K. (2005). Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 $\beta$ . *Journal of Neuroimmunology*, 160(1–2), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.11.005>
- Farzam K, & Jan A. (2022). *Beta Blockers - StatPearls - NCBI Bookshelf*. Beta Blockers. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532906/>
- Felten D.L., Felten S.Y., Carlson S.L., Olschowka J.A. and Livnat S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol*, 135:755s–765s.
- Felten, S. Y., Housel, J., & Felten, D. L. (1986). Use of in vivo dialysis for evaluation of splenic norepinephrine and serotonin. *Soc. Neurosci.*, 12, 1065.
- Filippi M., Bar-Or A., Piehl F., Preziosa P., Solari A., Vukusic S., Rocca M.A. (2018). Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4
- Fink, A. L., Engle, K., Ursin, R. L., Tang, W.-Y., & Klein, S. L. (2018). Biological sex affects vaccine efficacy and protection against influenza in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(49), 12477–12482. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1805268115>
- Flatmark, T., & Stevens, R. C. (1999). Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chemical Reviews*, 99(8), 2137–2160. <https://doi.org/10.1021/cr980450y>
- Flachenecker P., Reiners K., Krauser M., Wolf A., Toyka K.V. (2001). Autonomic dysfunction in multiple sclerosis is related to disease activity and progression of disability. *Mult Scler*, 7:327–34. doi: 10.1177/135245850100700509
- Flachenecker, P., Rufer, A., Bihler, I., Hippel, C., Reiners, K., Toyka, K. V., & Kesselring, J. (2003). Fatigue in MS is related to sympathetic vasomotor dysfunction. *Neurology*, 61(6), 851–853. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000080365.95436.B8>
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental*

- Immunology*, 162(1), 1. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2010.04143.X>
- Flierl, M. A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Vidya Sarma, J., & Award, P. (2008). Catecholamines - Crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box? *Molecular Medicine*, 14(3-4), 195-204. <https://doi.org/10.2119/2007-00105.FLIERL/FIGURES/3>
- Flügel, T., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H., & Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14(5), 547-560. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00143-1)
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., & Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80059-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80059-8)
- Frank, M. G., Baratta, M. V., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), 47-59. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2006.03.005>
- Frank, M. G., Fonken, L. K., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2019). Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, 176-185. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.01.001>
- Freudenberg, K., Lindner, N., Dohnke, S., Garbe, A. I., Schallenberg, S., & Kretschmer, K. (2018). Critical role of TGF- $\beta$  and IL-2 receptor signaling in Foxp3 induction by an inhibitor of DNA methylation. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 320635. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00125/BIBTEX>
- Ganusov, V. V., Milutinović, D., & De Boer, R. J. (2007). IL-2 Regulates Expansion of CD4 + T Cell Populations by Affecting Cell Death: Insights from Modeling CFSE Data . *The Journal of Immunology*, 179(2), 950-957. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.950>
- Garcia, J. A., Pino, P. A., Mizutani, M., Cardona, S. M., Charo, I. F., Ransohoff, R. M., Forsthuber, T. G., & Cardona, A. E. (2013). Regulation of adaptive immunity by the fractalkine receptor during autoimmune inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(3), 1063-1072. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1300040>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., Ramos, H. L., Wei, L., Davidson, T. S., Bouladoux, N., Grainger, J. R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W. T., Sun, H. W., Eberl, G., Shevach, E. M., Belkaid, Y., Cua, D. J., ... O'Shea, J. J. (2010). Generation of pathogenic TH 17 cells in the absence of TGF- $\beta$  2 signalling. *Nature*, 467(7318), 967-971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>
- Ghorpade A., Gendelman H.E., Kipnis J. (2008). Macrophages, microglia and dendritic cells. In: Ikezu T, Gendelman HE (eds) Neuroimmune pharmacology. Springer, New York
- Giles, D. A., Washnock-Schmid, J. M., Duncker, P. C., Dahlawi, S., Ponath, G., Pitt, D., & Segal, B. M. (2018). Myeloid cell plasticity in the evolution of central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology*, 83(1), 131-141. <https://doi.org/10.1002/ANA.25128>
- Gold, S. M., Mohr, D. C., Huitinga, I., Flachenecker, P., Sternberg, E. M., & Heesen, C. (2005). The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. *Trends in Immunology*, 26(12), 644-652. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.09.010>
- Gold S.M., Voskuhl R.R. (2009). Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*, 175:239-51. doi: 10.1016/S0079-6123(09)17516-7
- Golden, L. C., & Voskuhl, R. (2017). The importance of studying sex differences in disease: The

- example of multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 633–643. <https://doi.org/10.1002/JNR.23955>
- Goldenberg, M. M. (2012). Multiple Sclerosis Review. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(3), 175. [/pmc/articles/PMC3351877/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3351877/)
- Goldmuntz, E. A., Brosnan, C. F., & Norton, W. T. (1986). Prazosin treatment suppresses increased vascular permeability in both acute and passively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 137(11), 3444–3450.
- Gong, H., Tai, H., Huang, N., Xiao, P., Mo, C., Wang, X., Han, X., Zhou, J., Chen, H., Tang, X., Zhao, T., Xu, W., Gong, C., Zhang, G., Yang, Y., Wang, S., & Xiao, H. (2020). Nrf2-SHP Cascade-Mediated STAT3 Inactivation Contributes to AMPK-Driven Protection Against Endotoxic Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11, 515660. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00414/BIBTEX>
- Gonzalez-Cabrera, P. J., Shi, T., Yun, J., McCune, D. F., Rorabaugh, B. R., & Perez, D. M. (2004). Differential regulation of the cell cycle by  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtypes. *Endocrinology*, 145(11), 5157–5167. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0728>
- Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, 72(4):551-60. doi: 10.1016/0092-8674(93)90074-z
- Goyarts, E., Matsui, M., Mammone, T., Bender, A. M., Wagner, J. A., Maes, D., & Granstein, R. D. (2008). Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. *Experimental Dermatology*, 17(3), 188–196. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00677.x>
- Graber, D. J., Hickey, W. F., & Harris, B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-8>
- Gregory A.P., Dendrou C.A., Attfield K.E., Haghikia A., Xifara D.K., Butter F., Poschmann G., Kaur G., Lambert L., Leach O.A., Prömel S., Punwani D., Felce J.H., Davis S.J., Gold R., Nielsen F.C., Siegel R.M., Mann M., Bell J.I., McVean G., Fugger L. (2012). TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*, 488(7412):508-511. doi: 10.1038/nature11307
- Griffin, A. C., Lo, W. D., Wolny, A. C., & Whitacre, C. C. (1993). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by restraint stress: sex differences. *Journal of Neuroimmunology*, 44(1), 103–116. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90273-2](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90273-2)
- Griffin, A. C., & Whitacre, C. C. (1991). Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease. *Journal of Neuroimmunology*, 35(1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90161-Y](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90161-Y)
- Grisanti L.A., Woster A.P., Dahlman J., Sauter E.R., Combs C.K., Porter J.E. (2011a).  $\alpha$ 1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*, 338(2):648-57. doi: 10.1124/jpet.110.178012
- Grisanti L.A., Perez D.M., Porter J.E. (2011b). Modulation of immune cell function by  $\alpha$ (1)-adrenergic receptor activation. *Curr Top Membr*, 67:113-38. doi: 10.1016/B978-0-12-384921-2.00006-9
- Grobecker, H., Planz, G., Wiethold, G., Simrock, R., Becker, H. J., Lutz, E., & Petersen, P. (1976). Specific and non-specific effects of beta-adreno-receptor blocking drugs in man. *Klinische Wochenschrift*, 54(16), 783–788. <https://doi.org/10.1007/BF01614295>

- Guereschi, M. G., Araujo, L. P., Maricato, J. T., Takenaka, M. C., Nascimento, V. M., Vivanco, B. C., Reis, V. O., Keller, A. C., Brum, P. C., & Basso, A. S. (2013). Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *European Journal of Immunology*, 43(4), 1001–1012. <https://doi.org/10.1002/EJI.201243005>
- Gültner, S., Kuhlmann, T., Hesse, A., Weber, J. P., Riemer, C., Baier, M., & Hutloff, A. (2010). Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE. *European Journal of Immunology*, 40(12), 3403–3412. <https://doi.org/10.1002/EJI.201040576>
- Guneykaya D., Ivanov A., Hernandez D.P., Haage V., Wojtas B., Meyer N., Maricos M., Jordan P., Buonfiglioli A., Gielniewski B., Ochocka N., Cömert C., Friedrich C., Artiles L.S., Kaminska B., Mertins P., Beule D., Kettenmann H., Wolf S.A. (2018). Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep*, 4;24(10):2773-2783.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.001
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., & Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *Journal of Experimental Medicine*, 189(3), 451–460. <https://doi.org/10.1084/jem.189.3.451>
- Guo, S., Wang, H., & Yin, Y. (2022). Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.815347>
- Hadden, J. W., Hadden, E. M., & Middleton, E. (1970). Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cellular Immunology*, 1(6), 583–595. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(70\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(70)90024-9)
- Haldar, R., Shaashua, L., Lavon, H., Lyons, Y. A., Zmora, O., Sharon, E., Birnbaum, Y., Allweis, T., Sood, A. K., Barshack, I., Cole, S., & Ben-Eliyahu, S. (2018). Perioperative inhibition of  $\beta$ -adrenergic and COX2 signaling in a clinical trial in breast cancer patients improves tumor Ki-67 expression, serum cytokine levels, and PBMCs transcriptome. *Brain, Behavior, and Immunity*, 73, 294–309. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.05.014>
- Han, J., Fan, Y., Zhou, K., Blomgren, K., & Harris, R. A. (2021). Uncovering sex differences of rodent microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12974-021-02124-Z/TABLES/2>
- Harbour, S. N., DiToro, D. F., Witte, S. J., Zindl, C. L., Gao, M., Schoeb, T. R., Jones, G. W., Jones, S. A., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2020). TH17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. *Science Immunology*, 5(49). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAW2262>
- Harirchian, M. H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N. M., & Bitarafan, S. (2018). Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 20, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.12.015>
- Hart, B. A., Gran, B., & Weissert, R. (2011). EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 17(3), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.006>
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*, 133(12), 1380-1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- Heijnen C.J., Rouppe van der Voort C., van de Pol M., Kavelaars A. (2002). Cytokines regulate alpha(1)-adrenergic receptor mRNA expression in human monocytic cells and endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 125(1-2):66-72. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00034-6
- Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2010). Adrenoceptors in brain: Cellular

- gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Neurochemistry International*, 57(4), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.03.019>
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., & Wynn, T. A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(11), 6533–6544. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.11.6533>
- Hetier, E., Ayala, J., Bousseau, A., & Prochiantz, A. (1991). Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by  $\beta$ -adrenergic agonists in mouse amoeboid microglial cells. *Experimental Brain Research*, 86(2), 407–413. <https://doi.org/10.1007/BF00228965>
- 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 & Immunity* 2009 10:5, 10(5), 509–516. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.12>
- Hill-Kapturczak, N., Truong, L., Thamilselvan, V., Visner, G. A., Nick, H. S., & Agarwal, A. (2000). Smad7-dependent regulation of heme oxygenase-1 by transforming growth factor-beta in human renal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40904–40909. <https://doi.org/10.1074/JBC.M006621200>
- Hill, K. E., Pigman, M., Fujinami, R. S., & Rose, J. W. (1998). Gender variations in early Theiler's virus induced demyelinating disease: Differential susceptibility and effects of IL-4, IL-10 and combined IL-4 with IL-10. *Journal of Neuroimmunology*, 85(1), 44–51. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00263-4)
- Hill, N. J., Hultcrantz, M., Sarvetnick, N., & Flodström-Tullberg, M. (2007). The target tissue in autoimmunity - An influential niche. In *European Journal of Immunology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 589–597). Eur J Immunol. <https://doi.org/10.1002/eji.200636368>
- Hinojosa-Laborde, C., Chapa, I., Lange, D., & Haywood, J. R. (1999). GENDER DIFFERENCES IN SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM REGULATION. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(2), 122–126. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1681.1999.02995.X>
- Hinojosa, A. E., Caso, J. R., García-Bueno, B., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. M. (2013). Dual effects of noradrenaline on astroglial production of chemokines and pro-inflammatory mediators. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 81. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-81>
- Hirota K., Duarte J.H., Veldhoen M., Hornsby E., Li Y., Cua D.J., Ahlfors H., Wilhelm C., Tolaini M., Menzel U., Garafalaki A., Potocnik A.J., Stockinger B. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*, 12(3):255-63. doi: 10.1038/ni.1993
- Hollenbach, J. A., & Oksenberg, J. R. (2015). The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2015.06.010>
- Honorat J.A., Kinoshita M., Okuno T., Takata K., Koda T., Tada S., Shirakura T., Fujimura H., Mochizuki H., Sakoda S., Nakatsuji Y. (2013). Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One*, 8(8):e71329. doi: 10.1371/journal.pone.0071329
- Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature Reviews. Neurology*, 11(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2014.207>
- Huang, M. H., Bahl, J. J., Wu, Y., Hu, F., Larson, D. F., Roeske, W. R., & Ewy, G. A. (2005). Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart. *American*



- Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288(2 57-2).  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2004>
- Huang, Ming He, Friend, D. S., Sunday, M. E., Singh, K., Haley, K., Austen, K. F., Kelly, R. A., & Smith, T. W. (1996). An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *Journal of Clinical Investigation*, 98(6), 1298–1303. <https://doi.org/10.1172/JCI118916>
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., Wittmann, E., Buch, T., Da Costa, O. P., Brüstle, A., Brenner, D., Mak, T. W., Mittrücker, H. W., Tackenberg, B., Kamradt, T., & Lohoff, M. (2013). IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 247. <https://doi.org/10.1172/JCI63681>
- Ichiba, M., Nakajima, K., Yamanaka, Y., Kiuchi, N., & Hirano, T. (1998). Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP- responsive element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6132–6138. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6132>
- Izeboud, C. A., Mocking, J. A. J., Monshouwer, M., Van Miert, A. S. J. P. A. M., & Witkamp, R. F. (1999). Participation of  $\beta$ -adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 19(1–4), 191–202. <https://doi.org/10.3109/10799899909036645>
- Ji, R., Meng, L., Li, Q., & Lu, Q. (2015). TAM receptor deficiency affects adult hippocampal neurogenesis. In *Metabolic Brain Disease* (Vol. 30, Issue 3, pp. 633–644). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9636-y>
- Jiang, W., St-Pierre, S., Roy, P., Morley, B. J., Hao, J., & Simard, A. R. (2016). Infiltration of CCR2 + Ly6C high Proinflammatory Monocytes and Neutrophils into the Central Nervous System Is Modulated by Nicotinic Acetylcholine Receptors in a Model of Multiple Sclerosis . *The Journal of Immunology*, 196(5), 2095–2108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501613>
- Johnson, D. A., Amirahmadi, S., Ward, C., Fabry, Z., & Johnson, J. A. (2010). The Absence of the Pro-antioxidant Transcription Factor Nrf2 Exacerbates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Toxicological Sciences*, 114(2), 237. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP274>
- Johnson, J. D., Campisi, J., Sharkey, C. M., Kennedy, S. L., Nickerson, M., Greenwood, B. N., & Fleshner, M. (2005). Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, 135(4), 1295–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.090>
- Jovanova-Nešić, K., Nikolić, V., & Janković, B. D. (1993). Locus ceruleus and immunity. II. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus. *The International Journal of Neuroscience*, 68(3–4), 289–294. <https://doi.org/10.3109/00207459308994284>
- Kamath, A. B., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (1998). Characterization of phenotypic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thymocytes in vivo and its effect on apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150(1), 117–124. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1998.8390>
- Kara, E. E., McKenzie, D. R., Bastow, C. R., Gregor, C. E., Fenix, K. A., Ogunniyi, A. D., Paton, J. C., Mack, M., Pombal, D. R., Seillet, C., Dubois, B., Liston, A., Macdonald, K. P. A., Belz, G. T., Smyth, M. J., Hill, G. R., Comerford, I., & McColl, S. R. (2015). CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms9644>
- Karaszewski, J. W., Reder, A. T., Maselli, R., Brown, M., & Arnason, B. G. W. (1990). Sympathetic skin responses are decreased and lymphocyte beta-adrenergic receptors are

- increased in progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 27(4), 366–372. <https://doi.org/10.1002/ANA.410270404>
- Karpus, W. J., Konkol, R. J., & Killen, J. A. (1988). Central catecholamine neurotoxin administration. 1. Immunological changes associated with the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 18(1), 61–73. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(88\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0165-5728(88)90135-X)
- Karussis, D. (2014). The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 48–49, 134–142. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2014.01.022>
- Kavelaars A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. (2002). *Brain Behav Immun*, 16(6):799-807. doi: 10.1016/s0889-1591(02)00033-8
- Kawakami, N., Lassmann, S., Li, Z., Odoardi, F., Ritter, T., Ziemssen, T., Klinkert, W. E. F., 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. *Journal of Experimental Medicine*, 199(2), 185–197. <https://doi.org/10.1084/jem.20031064>
- Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13(10):1173-5. doi: 10.1038/nm1651
- Keith, A. B. (1978). Sex difference in Lewis rats in the incidence of recurrent experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 1978 272:5656, 272(5656), 824–825. <https://doi.org/10.1038/272824a0>
- Kerr, N., Dietrich, D. W., Bramlett, H. M., & Raval, A. P. (2019). Sexually dimorphic microglia and ischemic stroke. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(12), 1308. <https://doi.org/10.1111/CNS.13267>
- Khan, D., & Ahmed, S. A. (2015). Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 6, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00236>
- Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 29(43), 13435–13444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009>
- Kim BJ, Jones HP. (2010). Epinephrine-primed murine bone marrow-derived dendritic cells facilitate production of IL-17A and IL-4 but not IFN- $\gamma$  by CD4+ T cells. *Brain Behav Immun*, 24(7):1126-36. doi: 10.1016/j.bbi.2010.05.003
- Klein, S.L. (2012). Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology*, 153(6), 2544–2550. <https://doi.org/10.1210/EN.2011-2120>
- Klein, S L, Jedlicka, A., & Pekosz, A. (2010). The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(5), 338–349. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70049-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70049-9)
- Klein, Sabra L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:10, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Klein, Sabra L., & Morgan, R. (2020). The impact of sex and gender on immunotherapy outcomes. *Biology of Sex Differences*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13293-020-00301-Y/FIGURES/2>
- Klein, Sabra L., & Roberts, C. W. (2010). Sex hormones and immunity to infection. In *Sex*

*Hormones and Immunity to Infection*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-02155-8>

- Klotz, L., Burgdorf, S., Dani, I., Saijo, K., Flossdorf, J., Hucke, S., Alferink, J., Novak, N., Beyer, M., Mayer, G., Langhans, B., Klockgether, T., Waisman, A., Eberl, G., Schultze, J., Famulok, M., Kolanus, W., Glass, C., Kurts, C., & Knolle, P. A. (2009). The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2079–2089. <https://doi.org/10.1084/JEM.20082771>
- Ko H.J., Brady J.L., Ryg-Cornejo V., Hansen D.S., Vremec D., Shortman K., Zhan Y., Lew A.M. (2014). GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *J Immunol*, 192(5):2202-9. doi: 10.4049/jimmunol.1302040
- Kobelt, G., Thompson, A., Berg, J., Gannedahl, M., & Eriksson, J. (2017). New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(8), 1123. <https://doi.org/10.1177/1352458517694432>
- Koch, M., Mostert, J., Heersema, D., & De Keyser, J. (2007). Tremor in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 254(2), 133. <https://doi.org/10.1007/S00415-006-0296-7>
- Kohm, A. P., & Sanders, V. M. (2001). Norepinephrine and  $\beta$ 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 53, Issue 4, pp. 487–525).
- Kong, F., Xialing, G., Noel, J. G., Wells, D. A., Lovell, G. J., & Ogle, C. K. (2002). Thermal injury-induced increases of hepatocyte SOCS3 lead to decreases in STAT3. *Shock (Augusta, Ga.)*, 18(4), 374–379. <https://doi.org/10.1097/00024382-200210000-00014>
- Konkol, R. J., Wesselmann, U., Karpus, W. J., Leo, G. L., Killen, J. A., & Roerig, D. L. (1990). Suppression of clinical weakness in experimental autoimmune encephalomyelitis associated with weight changes, and post-decapitation convulsions after intracisternal-ventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Journal of Neuroimmunology*, 26(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90116-5)
- Kooij, G., Kroon, J., Paul, D., Reijerkerk, A., Geerts, D., Van Der Pol, S. M. A., Van Het Hof, B., Drexhage, J. A., Van Vliet, S. J., Hekking, L. H. P., Van Buul, J. D., Pachter, J. S., & De Vries, H. E. (2014). P-glycoprotein regulates trafficking of CD8(+) T cells to the brain parenchyma. *Acta Neuropathologica*, 127(5), 699–711. <https://doi.org/10.1007/S00401-014-1244-8>
- Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(4), 794. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2014.11.021>
- Kovats, S., Carreras, E., & Agrawal, H. (2010). Sex steroid receptors in immune cells. *Sex Hormones and Immunity to Infection*, 53–91. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02155-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02155-8_3)
- Krementsov DN, Teuscher C. Environmental factors acting during development to influence MS risk: insights from animal studies. *Mult Scler*. 2013 Nov;19(13):1684-9. doi: 10.1177/1352458513506954
- Krementsov DN, Noubade R, Dragon JA, et al. Sex-specific control of CNS autoimmunity by p38 MAPK signaling in myeloid cells. *Ann Neurol*. 2013 Sep 11. doi: 10.1002/ana.24020
- Krenger, W., Kabiersch, A., & Honegger, C. G. (1989). Monoamines and related substances in brainstem and spinal cord of Lewis rats during the attack and recovery of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research*, 491(2), 374–378. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90074-7)
- Krenger, Werner, Honegger, C. G., Feurer, C., & Cammisuli, S. (1986). Changes of

- Neurotransmitter Systems in Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rat Brain and Spinal Cord. *Journal of Neurochemistry*, 47(4), 1247–1254. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1986.TB00747.X>
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 2008 Jul 7;205(7):1535-41. doi: 10.1084/jem.20080159
- Kuo, S. J., Yang, W. H., Liu, S. C., Tsai, C. H., Hsu, H. C., & Tang, C. H. (2017). Transforming growth factor  $\beta$ 1 enhances heme oxygenase 1 expression in human synovial fibroblasts by inhibiting microRNA 519b synthesis. *PloS One*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176052>
- Kurschus, F.C. (2015). T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. In *Biomedical Journal* (Vol. 38, Issue 3, pp. 183–193). Chang Gung Medical Journal. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.155590>
- Kurschus, F.C., Croxford, A.L., Heinen, A.P., Wörtge, S., Ielo, D., Waisman, A. (2010). Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol*, 40(12):3336-46. doi: 10.1002/eji.201040755
- Laffer, B., Bauer, D., Wasmuth, S., Busch, M., Jalilvand, T. V., Thanos, S., Meyer zu Hörste, G., Loser, K., Langmann, T., Heiligenhaus, A., & Kasper, M. (2019). Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00430>
- Lampert, P. Electron microscopic studies on ordinary and hyperacute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol*. 1967 Oct 20;9(2):99-126. doi: 10.1007/BF00691436
- Lampron, A., Laroche, A., Laflamme, N., Préfontaine, P., Plante, M. M., Sánchez, M. G., Wee Yong, V., Stys, P. K., Tremblay, M. È., & Rivest, S. (2015). Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *Journal of Experimental Medicine*, 212(4), 481–495. <https://doi.org/10.1084/JEM.20141656/VIDEO-1>
- Landen, C. N., Lin, Y. G., Pena, G. N. A., Das, P. D., Arevalo, J. M., Kamat, A. A., Han, L. Y., Jennings, N. B., Spannuth, W. A., Thaker, P. H., Lutgendorf, S. K., Savary, C. A., Sanguino, A. M., Lopez-Berestein, G., Cole, S. W., & Sood, A. K. (2007). Neuroendocrine Modulation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 67(21), 10389–10396. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0858>
- Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017 Feb;133(2):223-244. doi: 10.1007/s00401-016-1631-4
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):210-8. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x
- Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2011 Dec 1;585(23):3715-23. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.004
- Lastres-Becker, I., Innamorato, N. G., Jaworski, T., Rábano, A., Kügler, S., Van Leuven, F., & Cuadrado, A. (2014). Fractalkine activates NRF2/NFE2L2 and heme oxygenase 1 to restrain tauopathy-induced microgliosis. *Brain*, 137(1), 78–91. <https://doi.org/10.1093/brain/awt323>
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M., & O’Shea, J. J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371–381. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.02.009>
- Lee, G. R. (2018). The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS19030730>
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D.

- M., & Yu, H. (2009). Persistently Activated Stat3 Maintains Constitutive NF- $\kappa$ B Activity in Tumors. *Cancer Cell*, 15(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.015>
- Lee, T. S., & Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature Medicine* 2002 8:3, 8(3), 240–246. <https://doi.org/10.1038/nm0302-240>
- Leonard, J. P., MacKenzie, F. J., Patel, H. A., & Cuzner, M. L. (1990). Splenic noradrenergic and adrenocortical responses during the preclinical and clinical stages of adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of Neuroimmunology*, 26(2), 183–186. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90090-A](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90090-A)
- Leposavić, G., Pilipović, I., & Perišić, M. (2011). Cellular and nerve fibre catecholaminergic thymic network: steroid hormone dependent activity. *Physiological Research*, 60(Suppl 1). <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.932175>
- Lévesque, S. A., Paré, A., Mailhot, B., Bellver-Landete, V., Kébir, H., Lécuyer, M. A., Alvarez, J. I., Prat, A., de Rivero Vaccari, J. P., Keane, R. W., & Lacroix, S. (2016). Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 $\beta$ -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 213(6), 929–949. <https://doi.org/10.1084/JEM.20151437>
- Levine, S., & Sowinski, R. (1973). Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 110(1), 139–143.
- Liao, W., Lin, J.-X., & Leonard, W. J. (2013). *Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>
- Libert, C., Dejager, L., & Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology* 2010 10:8, 10(8), 594–604. <https://doi.org/10.1038/nri2815>
- Limatola, C., & Ransohoff, R. M. (2014). Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG), 229. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00229>
- Lindgren, E. M., Nielsen, R., Petrovic, N., Jacobsson, A., Mandrup, S., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Noradrenaline represses PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptor) gamma2 gene expression in brown adipocytes: intracellular signalling and effects on PPARgamma2 and PPARgamma1 protein levels. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 2), 597–606. <https://doi.org/10.1042/BJ20031622>
- Lisak, R. P., Benjamins, J. A., Nedelkoska, L., Barger, J. L., Ragheb, S., Fan, B., Ouamara, N., Johnson, T. A., Rajasekharan, S., & Bar-Or, A. (2012). Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 246(1–2), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.02.015>
- Liu, J., Cui, J. Y., Lu, Y. F., Christopher Corton, J., & Klaassen, C. D. (2021). Sex-, Age-, and Race/Ethnicity-Dependent Variations in Drug-Processing and NRF2-Regulated Genes in Human Livers. *Drug Metabolism and Disposition*, 49(1), 111. <https://doi.org/10.1124/DMD.120.000181>
- Liu, Y., Rui, X. X., Shi, H., Qiu, Y. H., & Peng, Y. P. (2018). Norepinephrine inhibits Th17 cells via  $\beta$ 2-adrenergic receptor ( $\beta$ 2-AR) signaling in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Medical Science Monitor*, 24, 1196–1204. <https://doi.org/10.12659/MSM.906184>
- Liu, Y. U., Ying, Y., Li, Y., Eyo, U. B., Chen, T., Zheng, J., Umpierre, A. D., Zhu, J., Bosco, D. B., Dong, H., & Wu, L. J. (2019). Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nature Neuroscience*, 22(11), 1771. <https://doi.org/10.1038/S41593-019-0511-3>

- Livnat, S., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Bellinger, D. L., & Felten, D. L. (1985). Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. *Journal of Neuroimmunology*, *10*(1), 5–30. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(85\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0165-5728(85)90031-1)
- Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., & Saraiva, M. (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>
- Lorenzo, M., Hodgson, A., Robinson, D., Kaplan, J., Pekosz, A., & Klein, S. (2011). Antibody responses and cross protection against lethal influenza A viruses differ between the sexes in C57BL/6 mice. *Vaccine*, *29*(49), 9246–9255. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.09.110>
- Lorton, D., Lubahn, C., & Bellinger, D. (2005). Potential Use of Drugs that Target Neural-Immune Pathways in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Other Autoimmune Diseases. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, *2*(1), 1–30. <https://doi.org/10.2174/1568010033344499>
- Lorton, Dianne, & Bellinger, D. L. (2015). Molecular Mechanisms Underlying  $\beta$ -Adrenergic Receptor-Mediated Cross-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences 2015*, Vol. 16, Pages 5635-5665, *16*(3), 5635–5665. <https://doi.org/10.3390/IJMS16035635>
- Lotfi N, Thome R, Rezaei N, Zhang GX, Rezaei A, Rostami A, Esmaeil N. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1265. doi: 10.3389/fimmu.2019.01265
- Lu, H. C., Kim, S., Steelman, A. J., Tracy, K., Zhou, B., Michaud, D., Hillhouse, A. E., Konganti, K., & Li, J. (2020). STAT3 signaling in myeloid cells promotes pathogenic myelin-specific T cell differentiation and autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(10), 5430–5441. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1913997117/SUPPL\\_FILE/PNAS.1913997117.SD01.XLSX](https://doi.org/10.1073/PNAS.1913997117/SUPPL_FILE/PNAS.1913997117.SD01.XLSX)
- Luchetti S, van Eden CG, Schuurman K, van Strien ME, Swaab DF, Huitinga I. Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in Male and progesterone signaling in female lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* (2014) *73*(2):123–35. doi: 10.1097/NEN.0000000000000037
- Ludewig, B., Junt, T., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2001). Dendritic cells in autoimmune diseases. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 657–662). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00275-8)
- Lukens, J. R., Barr, M. J., Chaplin, D. D., Chi, H., & Kanneganti, T.-D. (2012). Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  regulates the production of GM-CSF by CD4(+) T cells and  $\gamma\delta$  T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(7), 3107–3115. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1103308>
- Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallström E, Khademi M, Oturai A, Ryder LP, Saarela J, Harbo HF, Celius EG, Salter H, Olsson T, Hillert J. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1108-13. doi: 10.1038/ng2
- Maan, A. A., Eales, J., Akbarov, A., Rowland, J., Xu, X., Jobling, M. A., Charchar, F. J., & Tomaszewski, M. (2017). The Y chromosome: a blueprint for men’s health? *European Journal of Human Genetics*, *25*(11), 1181. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2017.128>
- Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., Bien, C. G., Bauer, J., & Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*, *141*(7), 2066. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWY151>
- Mackenzie, F. J., Leonard, J. P., & Cuzner, M. L. (1989). Changes in lymphocyte  $\beta$ -adrenergic

- receptor density and noradrenaline content of the spleen are early indicators of immune reactivity in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Neuroimmunology*, 23(2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90027-1)
- Maes M, Lin A, Kenis G, Egyed B, Bosmans E. The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products. *Psychiatry Res.* 2000 Nov 20;96(3):245-53. doi: 10.1016/s0165-1781(00)00216-x
- Maestroni GJ. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):6743-7. doi: 10.4049/jimmunol.165.12.6743
- Maestroni GJ, Mazzola P. Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J Neuroimmunol.* 2003 Nov;144(1-2):91-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.08.039
- Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, Clark PM, Healy B, Walker N, Aubin C, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Sawcer S; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; De Jager PL, Wicker LS, Todd JA, Hafler DA. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet.* 2009 Jan;5(1):e1000322. doi: 10.1371/journal.pgen
- Mammana, S., Fagone, P., Cavalli, E., Basile, M. S., Petralia, M. C., Nicoletti, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). The role of macrophages in neuroinflammatory and neurodegenerative pathways of alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: Pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030831>
- Marik C, Felts PA, Bauer J, Lassmann H, Smith KJ. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain.* 2007 Nov;130(Pt 11):2800-15. doi: 10.1093/brain/awm236
- Marino, F., Cosentino, M. (2013). Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 45(1):55-71. doi: 10.1007/s00726-011-1186-6
- Marino, F., Cosentino, M. (2013). Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 45, 55–71.
- Mariscal, P., Bravo, L., Llorca-Torralla, M., Razquin, J., Miguelez, C., Suárez-Pereira, I., & Berrocoso, E. (2023). Sexual differences in locus coeruleus neurons and related behavior in C57BL/6J mice. *Biology of Sex Differences*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S13293-023-00550-7>
- Marrie RA, Horwitz RI, Cutter G, Tyry T, Vollmer T. Association between comorbidity and clinical characteristics of MS. *Acta Neurol Scand.* 2011 Aug;124(2):135-41. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01436.x
- Marsland, B. J., Bättig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lässig, U., Beerli, R. R., Dietmeier, K., Ivanova, L., Pfister, T., Vogt, L., Nakano, H., Nembrini, C., Saudan, P., Kopf, M., & Bachmann, M. F. (2005). CCL19 and CCL21 Induce a Potent Proinflammatory Differentiation Program in Licensed Dendritic Cells. *Immunity*, 22(4), 493–505. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2005.02.010>
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U. E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: Impact on T lymphocyte traffic and priming. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 615–621. <https://doi.org/10.1084/jem.20030448>
- McCombe PA and Greer JM (2022) Effects of biological sex and pregnancy in experimental autoimmune encephalomyelitis: It's complicated. *Front. Immunol.* 13:1059833. doi: 10.3389/fimmu.2022.1059833

- McGeachy, M. J., & Cua, D. J. (2008). Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. In *Immunity* (Vol. 28, Issue 4, pp. 445–453). *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.001>
- Meador, W., Salter, A. R., & Rinker, J. R. (2016). Symptomatic Management of Multiple Sclerosis–Associated Tremor Among Participants in the NARCOMS Registry. *International Journal of MS Care*, 18(3), 147–153. <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2015-008>
- Mel'nikov, M. V., Belousova, O. O., Zhetishev, R. R., Pashchenkov, M. V., & Boiko, A. N. (2018). Effects of Catecholamines on Th17 Cells in Multiple Sclerosis. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 48(3), 342–345. <https://doi.org/10.1007/S11055-018-0568-6/METRICS>
- Melgert, B. N., Oriss, T. B., Qi, Z., Dixon-McCarthy, B., Geerlings, M., Hylkema, M. N., & Ray, A. (2010). Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(5), 595–603. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2009-0016OC>
- Merkelbach, S., Haensch, C.A., Hemmer, B., Koehler, J., König, N.H., Ziemssen T. (2006) Multiple sclerosis and the autonomic nervous system. *J Neurol*. 253(Suppl 1):I21–5. doi: 10.1007/s00415-006-1105-z
- Mildner, A., MacK, M., Schmidt, H., Brück, W., Djukic, M., Zabel, M. D., Hille, A., Priller, J., & Prinz, M. (2009). CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 9), 2487–2500. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWP144>
- Miles BA, Lafuse WP, Zwilling BS. Binding of alpha-adrenergic receptors stimulates the anti-mycobacterial activity of murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol*. 1996 Dec;71(1-2):19-24. doi: 10.1016/s0165-5728(96)00113-0
- Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003 Dec;9(6):540-9. doi: 10.1191/1352458503ms965oa
- Mitsdoerffer, M., Di Liberto, G., Dötsch, S., Sie, C., Wagner, I., Pfaller, M., Kreutzfeldt, M., Fräßle, S., Aly, L., Knier, B., Busch, D. H., Merkler, D., & Korn, T. (2021). Formation and immunomodulatory function of meningeal B cell aggregates in progressive CNS autoimmunity. *Brain*, 144(6), 1697–1710. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB093>
- Miyake S. Mind over cytokines: crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clin Exp Neuroimmunol* (2012) 3:1-15. doi: 10.1111/j.1759-1961.2011.00023.x
- Miyakoshi A, Yoon WK, Jee Y, Matsumoto Y. Characterization of the antigen specificity and TCR repertoire, and TCR-based DNA vaccine therapy in myelin basic protein-induced autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Immunol*. 2003 Jun 15;170(12):6371-8. doi: 10.4049/jimmunol.170.12.6371
- Mohr, D. C., Hart, S. L., Julian, L., Cox, D., & Pelletier, D. (2004). Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ : British Medical Journal*, 328(7442), 731. <https://doi.org/10.1136/BMJ.38041.724421.55>
- Montalban, X., Hauser, S. L., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H.-P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Garren, H., ... Wolinsky, J. S. (2017). Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 376(3), 209–220. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606468>
- Moore CS, Rao VT, Durafourt BA, Bedell BJ, Ludwin SK, Bar-Or A, Antel JP. miR-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. *Ann Neurol*. 2013 Nov;74(5):709-20. doi: 10.1002/ana.23967



- Morale MC, Gallo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Marletta N, Spina-Purrello V, Avola R, Caucci F, Tomasi P, Delitala G, Barden N, Marchetti B. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunol Cell Biol.* 2001 Aug;79(4):400-17. doi: 10.1046/j.1440-1711.2001.01030.x
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., & Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 2$  adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, 43(6), 1026–1034. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00211-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00211-3)
- Mufazalov, I. A., Schelmbauer, C., Regen, T., Kuschmann, J., Wanke, F., Gabriel, L. A., Hauptmann, J., Müller, W., Pinteaux, E., Kurschus, F. C., & Waisman, A. (2017). IL -1 signaling is critical for expansion but not generation of autoreactive GM - CSF + Th17 cells . *The EMBO Journal*, 36(1), 102–115. [https://doi.org/10.15252/EMBJ.201694615/SUPPL\\_FILE/EMBJ201694615-SUP-0002-EVFIGS.PDF](https://doi.org/10.15252/EMBJ.201694615/SUPPL_FILE/EMBJ201694615-SUP-0002-EVFIGS.PDF)
- Musgrave, T., Tenorio, G., Rauw, G., Baker, G. B., & Kerr, B. J. (2011). Tissue concentration changes of amino acids and biogenic amines in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Neurochemistry International*, 59(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2011.03.020>
- Nacka-Aleksić, M., Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., Arsenović-Ranin, N., Dimitrijević, M., & Leposavić, G. (2015). Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: Sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.017>
- Nacka-Aleksić, M., Stojanović, M., Simić, L., Bufan, B., Kotur-Stevuljević, J., Stojić-Vukanić, Z., Dimitrijević, M., Ražić, S., & Leposavić, G. (2017). Sex as a determinant of age-related changes in rat spinal cord inflammation-oxidation state. *Biogerontology*, 18(5), 821–839. <https://doi.org/10.1007/S10522-017-9726-4>
- Nagatsu, T. The catecholamine system in health and disease -Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2007 Jan;82(10):388-415. doi: 10.2183/pjab.82.388
- Nance, D. M., & Sanders, V. M. (2007). Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987-2007). *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), 736. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2007.03.008>
- Neil-Dwyer, G., Bartlett, J., McAinsh, J., & Cruickshank, J. (1981). Beta-adrenoceptor blockers and the blood-brain barrier. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 11(6), 549–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1981.tb01169.x>
- Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 347–369. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2014.04.004>
- Niarchos, A. P., Gulati, O. P., & Carretero, O. A. (1977). Effects of propranolol on the development of renovascular hypertension in the rat. *American Heart Journal*, 94(1), 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(77\)80347-5](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(77)80347-5)
- Nicot, A. (2009). Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Frontiers in Bioscience*, 14(12), 4477–4515. <https://doi.org/10.2741/3543/PDF>
- Nijhuis, L. E., Olivier, B. J., Dhawan, S., Hilbers, F. W., Boon, L., Wolkers, M. C., Samsom, J. N., & De Jonge, W. J. (2014). Adrenergic  $\beta 2$  receptor activation stimulates anti-inflammatory

- properties of dendritic cells in vitro. *PLoS ONE*, 9(1), 85086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085086>
- O'Brien, K., Gran, B., & Rostami, A. (2010). T-cell based immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunotherapy*, 2(1), 99. <https://doi.org/10.2217/IMT.09.61>
- O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res.* (2012) 37:2496–512. doi: 10.1007/s11064-012-0818-x
- Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017 Jan;13(1):25-36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187
- Ortona, E., Pierdominici, M., Maseli, A., Veroni, C., Aloisi, F., & Shoenfeld, Y. (2016). Sex-based differences in autoimmune diseases. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 52(2), 205–212. [https://doi.org/10.4415/ANN\\_16\\_02\\_12](https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_12)
- Ouyang, Y., Chen, Z., Tan, M., Liu, A., Chen, M., Liu, J., Pi, R., & Fang, J. (2013). Carvedilol, a third-generation  $\beta$ -blocker prevents oxidative stress-induced neuronal death and activates Nrf2/ARE pathway in HT22 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 917–922. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.10.160>
- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* (2003) 24:444-8. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00173-X
- Padro, C. J., & Sanders, V. M. (2014). Neuroendocrine regulation of inflammation. *Seminars in Immunology*, 26(5), 357–368. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2014.01.003>
- Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Di Lucia, P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., & Sinigaglia, F. (1997).  $\beta$ 2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1513–1519. <https://doi.org/10.1172/JCI119674>
- Parish, C. R., Glidden, M. H., Quah, B. J. C., & Warren, H. S. (2009). Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current Protocols in Immunology, Chapter 4(SUPPL. 84)*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM0409S84>
- Park, H. J., Park, H. S., Lee, J. U., Bothwell, A. L. M., & Choi, J. M. (2016). Sex-based selectivity of PPAR $\gamma$  regulation in Th1, Th2, and Th17 differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081347>
- Pearce, J. M. S. (2005). Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. *European Neurology*, 54(1), 49–53. <https://doi.org/10.1159/000087387>
- Pellegrini, G. G., Cregor, M., Mcandrews, K., Morales, C. C., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Peacock, M., Burr, D., Weaver, C., & Bellido, T. (2017). Nrf2 regulates mass accrual and the antioxidant endogenous response in bone differently depending on the sex and age. *PLoS ONE*, 12(2), e0171161. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0171161>
- Peng, Y. P., Qiu, Y. H., Jiang, J. L., & Wang, J. J. (2004). Effect of catecholamines on IL-2 production and NK cytotoxicity of rats in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(10), 1354–1360. <http://www.chinaphar.com/1671-4083/25/1354.htm>
- Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Prijić, I., Jasnić, N., & Laposavić, G. (2020). Propranolol diminished severity of rat EAE by enhancing immunoregulatory/protective properties of spinal cord microglia. *Neurobiology of Disease*, 134, 104665. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.104665>
- Polak, P. E., Kalinin, S., & Feinstein, D. L. (2011). Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*,

134(3), 665. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ362>

- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Jacobson, R. M. (2008). Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(11), 1659. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.11.1659>
- Pozzilli, C., & Pugliatti, M. (2015). An overview of pregnancy-related issues in patients with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 22, 34–39. <https://doi.org/10.1111/ENE.12797>
- Prêle, C. M., Keith-Magee, A. L., Yerkovich, S. T., Murcha, M., & Hart, P. H. (2006). Suppressor of cytokine signalling-3 at pathological levels does not regulate lipopolysaccharide or interleukin-10 control of tumour necrosis factor- $\alpha$  production by human monocytes. *Immunology*, 119(1), 8–17. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2006.02383.X>
- Qin, H., Yeh, W. I., De Sarno, P., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Muldowney, M. T., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., Fox, T. H., Park, K., Harrington, L. E., Raman, C., & Benveniste, E. N. (2012). Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), 5004–5009. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1117218109/SUPPL\\_FILE/SM02.MOV](https://doi.org/10.1073/PNAS.1117218109/SUPPL_FILE/SM02.MOV)
- Quirié, A., Demougeot, C., Bertrand, N., Mossiat, C., Garnier, P., Marie, C., & Prigent-Tessier, A. (2013). Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, 37(7), 1193–1202. <https://doi.org/10.1111/EJN.12111>
- Racosta, J.M., Kimpinski, K., Morrow, S.A., Kremenchutzky, M. (2015). Autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *Auton Neurosci*, 193:1-6. doi: 10.1016/j.autneu.2015.06.001
- Racosta, J.M., & Kimpinski, K. (2016). Autonomic dysfunction, immune regulation, and multiple sclerosis. *Clinical Autonomic Research*, 26(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/S10286-015-0325-7/METRICS>
- Racosta, J.M., & Kremenchutzky, M. (2014). The Role of Autonomic Dysregulation from Pathophysiology to Therapeutics of Multiple Sclerosis: A Putative Novel Treatment Target? *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9562.1000212>
- Rajda, C., Bencsik, K., Vécsei L, L., & Bergquist, J. (2002). Catecholamine levels in peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1–2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00002-4)
- Rama Rao, P., Reddy, M. N., Ramakrishna, S., & Diwan, P. V. (2003). Comparative in vivo evaluation of propranolol hydrochloride after oral and transdermal administration in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00038-9)
- Ramírez, G., Toro, R., Döbeli, H., & Von Bernhardi, R. (2005). Protection of rat primary hippocampal cultures from A $\beta$  cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiology of Disease*, 19(1–2), 243–254. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2005.01.007>
- Randolph, G. J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: Cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Seminars in Immunology*, 13(5), 267–274. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0322>
- 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 Jun 1;194(11):5085-93. doi: 10.4049/jimmunol.1403243
- Rawji, K. S., Mishra, M. K., Michaels, N. J., Rivest, S., Stys, P. K., & Yong, V. W. (2016). Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous

- system. *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 3), 653–661. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV395>
- Reguzzoni, M., Cosentino, M., Rasini, E., Marino, F., Ferrari, M., Bombelli, R., Congiu, T., Protasoni, M., Quacci, D., Lecchini, S., Raspanti, M., & Frigo, G. (2002). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in human peripheral blood mononuclear cells: effect of stimulation with phytohaemagglutinin. *Cell and Tissue Research*, 310(3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/S00441-002-0617-9>
- Robinson, A. P., Harp, C. T., Noronha, A., & Miller, S. D. (2014). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 122, pp. 173–189). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X>
- Robinson, M. J. F., Ross, E. C., & Franklin, K. B. J. (2011). The effect of propranolol dose and novelty of the reactivation procedure on the reconsolidation of a morphine place preference. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 281–284. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.08.009>
- Roca CA, Schmidt PJ, Deuster PA, Danaceau MA, Altemus M, Putnam K, Chrousos GP, Nieman LK, Rubinow DR. Sex-related differences in stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis during induced gonadal suppression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jul;90(7):4224-31. doi: 10.1210/jc.2004-2525
- Roederer, M. (2002). Compensation in flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry, Chapter 1*. <https://doi.org/10.1002/0471142956.CY0114S22>
- Roewe, J., Higer, M., Riehl, D. R., Gericke, A., Radsak, M. P., & Bosmann, M. (2017). Neuroendocrine Modulation of IL-27 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 199(7), 2503–2514. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700687>
- Rojo, A. I., Innamorato, N. G., Martín-Moreno, A. M., De Ceballos, M. L., Yamamoto, M., & Cuadrado, A. (2010). Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia*, 58(5), 588–598. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20947>
- Rossi, AG; McCutcheon, JC; Roy, N; Chilvers, ER; Haslett, C; Dransfield, I. (1998). Regulation of Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Cells by cAMP. *J Immunol*, 160(7), 3562–3568.
- Roth, N. S., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (1991). Structure and function of the adrenergic receptor family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 308, 223–238. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6015-5\\_20/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6015-5_20/COVER)
- Roupe van der Voort C, Kavelaars A, van de Pol M, Heijnen CJ. Neuroendocrine mediators up-regulate alpha1b- and alpha1d-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. *J Neuroimmunol*. 1999 Mar 1;95(1-2):165-73. doi: 10.1016/s0165-5728(99)00011-9
- Ryan, L., & Mills, K. H. G. (2022). Sex differences regulate immune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *European Journal of Immunology*, 52(1), 24–33. <https://doi.org/10.1002/EJI.202149589>
- Sadovnick AD. Differential effects of genetic susceptibility factors in males and females with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2013 Nov;149(2):170-5. doi: 10.1016/j.clim.2013.05.002
- Safi, N. V., & Krieger, S. (2021). Men with Multiple Sclerosis. *Pract. Neurol*, 37–40.
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225474>
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., & Bérard, F. (2003). Psychological Stress Exerts an Adjuvant Effect on Skin Dendritic Cell Functions In Vivo. *The Journal of Immunology*, 171(8), 4073–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4073>

- Sanders V.M., Baker R.A., RamerQuinn D.S., Kasprovicz D.J., Fuchs B.A., Street N.E. (1997). Differential expression of the beta(2)-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones – implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol*, 158:4200–10.
- Sanders, V.M., Kasprovicz, D.J., Kohm, A.P., Swanson, M.A., (2001). Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. In: Ader, R., Felten, D., Cohen, N. (Eds.). *Psychoneuroimmunology* Academic Press, San Diego, CA, pp. 161–196.
- Sanders V.M., Straub R.H. (2002). Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun*, 16(4):290-332. doi: 10.1006/brbi.2001.0639
- Scandella, E., Men, Y., Legler, D. F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B., & Groettrup, M. (2004). CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood*, 103(5), 1595–1601. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-05-1643>
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J. E., Zhang, D., Hashimoto, D., Merad, M., & Frenette, P. S. (2012). Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37(2), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021>
- Schetters, S. T. T., Gomez-Nicola, D., Garcia-Vallejo, J. J., & Van Kooyk, Y. (2018). Neuroinflammation: Microglia and T cells get ready to tango. *Frontiers in Immunology*, 8(JAN), 25. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01905>
- Schneider, S. A., & Deuschl, G. (2014). The Treatment of Tremor. *Neurotherapeutics*, 11(1), 128. <https://doi.org/10.1007/S13311-013-0230-5>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 182, Issue 3, pp. 311–322). *J Cell Physiol*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schwarz, J. M., Sholar, P. W., & Bilbo, S. D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), 948–963. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07630.X>
- Segal BM. The Diversity of Encephalitogenic CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis and Its Animal Models. *J Clin Med*. 2019 Jan 19;8(1):120. doi: 10.3390/jcm8010120
- Seiffert, K., & Granstein, R. D. (2006). Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088, 195–206. <https://doi.org/10.1196/annals.1366.011>
- Seiffert, K., Hosoi, J., Torii, H., Ozawa, H., Ding, W., Campton, K., Wagner, J.A., Granstein, R.D. (2002). Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. *J Immunol*, 168(12):6128-35. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6128
- Semple, B. D., Kossmann, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: A focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 30, Issue 3, pp. 459–473). SAGE Publications. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.240>
- Sharma, D., & Farrar, J. D. (2020). Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation. *Seminars in Immunopathology* 2020 42:6, 42(6), 709–717. <https://doi.org/10.1007/S00281-020-00829-6>
- Sheng, W., Png, C. W., Reynolds, J. M., & Zhang, Y. (2015). *T Cell-Derived GM-CSF, Regulation of Expression and Function*. <https://doi.org/10.4172/1745-7580.1000098>
- Shepshelovich D, Shoenfeld Y. Prediction and prevention of autoimmune diseases: additional aspects of the mosaic of autoimmunity. *Lupus*. (2006) 15:183–90. doi: 10.1191/0961203306lu2274rr
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2011 11:11, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Shin, T., Ahn, M., & Matsumoto, Y. (2012). Mechanism of experimental autoimmune

- encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anatomy & Cell Biology*, 45(3), 141. <https://doi.org/10.5115/acb.2012.45.3.141>
- Siddiqui, R. A., Sauermann, U., Altmüller, J., Fritzer, E., Nothnagel, M., Dalibor, N., Fellay, J., Kaup, F. J., Stahl-Hennig, C., Nürnberg, P., Krawczak, M., & Platzer, M. (2009). X Chromosomal Variation Is Associated with Slow Progression to AIDS in HIV-1-Infected Women. *American Journal of Human Genetics*, 85(2), 228. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2009.07.013>
- Sieve, A. N., Steelman, A. J., Young, C. R., Storts, R., Welsh, T. H., Welsh, C. J. R., & Meagher, M. W. (2004). Chronic restraint stress during early Theiler's virus infection exacerbates the subsequent demyelinating disease in SJL mice. *Journal of Neuroimmunology*, 155(1–2), 103–118. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.06.006>
- Sieve, A. N., Steelman, A. J., Young, C. R., Storts, R., Welsh, T. H., Welsh, C. J. R., & Meagher, M. W. (2006). Sex-dependent effects of chronic restraint stress during early Theiler's virus infection on the subsequent demyelinating disease in CBA mice. *J Neuroimmunol*, 177(1–2):46–62. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.04.020
- Sinner, P., Peckert-Maier, K., Mohammadian, H., Kuhnt, C., Draßner, C., Panagiotakopoulou, V., Rauber, S., Linnerbauer, M., Haimon, Z., Royzman, D., Kronenberg-Versteeg, D., Ramming, A., Steinkasserer, A., & Wild, A. B. (2023). Microglial expression of CD83 governs cellular activation and restrains neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40370-2>
- Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med*. 1998 Oct 19;188(8):1511–20. doi: 10.1084/jem.188.8.1511
- So SY, Savidge TC. Sex-Bias in Irritable Bowel Syndrome: Linking Steroids to the Gut-Brain Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 May 19;12:684096. doi: 10.3389/fendo.2021.684096
- 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, T. J., & Hanekom, W. A. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.007>
- Sosa, R. A., Murphey, C., Ji, N., Cardona, A. E., & Forsthuber, T. G. (2013). The Kinetics of Myelin Antigen Uptake by Myeloid Cells in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5848–5857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300771>
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683–747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707
- Spach KM, Hayes CE. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):4119–26. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.4119
- Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990 Sep 1;145(5):1430–4
- Spitzer, J. A. Gender differences in some host defense mechanisms. *Lupus* 8, 380–383 (1999).
- Srenathan, U., Steel, K., & Taams, L. S. (2016). IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunology Letters*, 178, 20–26. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2016.05.001>
- Stadhouders, R., Lubberts, E., & Hendriks, R. W. (2018). A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 87, 1–15.

<https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2017.12.007>

- Staedtke, V., Bai, R. Y., Kim, K., Darvas, M., Davila, M. L., Riggins, G. J., Rothman, P. B., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Zhou, S. (2018). Disruption of a self-amplifying catecholamine loop reduces cytokine release syndrome. *Nature*, *564*(7735), 273–277. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0774-y>
- Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, *36*(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.03.013>
- Steptoe, A., Ronaldson, A., Kostich, K., Lazzarino, A. I., Urbanova, L., & Carvalho, L. A. (2018). The effect of beta-adrenergic blockade on inflammatory and cardiovascular responses to acute mental stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, *70*, 369. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.03.027>
- Stojanovich, L., & Marisavljevic, D. (2008). Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, *7*(3), 209–213. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2007.11.007>
- Stojić-Vukanić Z, Pilipović I, Djikić J, Vujnović I, Nacka-Aleksić M, Bufan B, Arsenović-Ranin N, Kosec D, Lepasavić G. (2018a). Strain specificities in age-related changes in mechanisms promoting and controlling rat spinal cord damage in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Gerontol*, 101:37-53. doi: 10.1016/j.exger.2017.11.002
- Stojić-Vukanić, Z., Kotur-Stevuljević, J., Nacka-Aleksić, M., Kosec, D., Vujnović, I., Pilipović, I., Dimitrijević, M., & Lepasavić, G. (2018b). Sex Bias in Pathogenesis of Autoimmune Neuroinflammation: Relevance for Dimethyl Fumarate Immunomodulatory/Anti-oxidant Action. *Molecular Neurobiology*, *55*(5), 3755–3774. <https://doi.org/10.1007/S12035-017-0595-2/FIGURES/10>
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *AnnuRev Immunol* 1991;9:271–96.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(1), 342–349. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.1.342>
- Straub, R. H. (2007). The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*, *28*(5), 521–574. <https://doi.org/10.1210/ER.2007-0001>
- Stritesky, G. L., Yeh, N., & Kaplan, M. H. (2008). IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *The Journal of Immunology*, *181*(9), 5948–5955. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5948>
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* 2006 1:4, 1(4), 1810–1819. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285>
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* 2006 1:4, 1(4), 1952–1960. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.284>
- Sugama, S., & Kakinuma, Y. (2021). Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response. *Neurochemistry International*, *143*, 104943. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2020.104943>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Ohata, H., Takenaka, Y., & Kakinuma, Y. (2019). Stress-induced microglial activation occurs through  $\beta$ -adrenergic receptor: noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1632-Z>
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of

- Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00160>
- Syapin, P. J. (2008). Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *British Journal of Pharmacology*, 155(5), 623–640. <https://doi.org/10.1038/BJP.2008.342>
- Tahmasebinia, F., & Pourgholaminejad, A. (2017). The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79, 408–416. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2017.07.023>
- Takenaka, M. C., Araujo, L. P., Maricato, J. T., Nascimento, V. M., Guereschi, M. G., Rezende, R. M., Quintana, F. J., & Basso, A. S. (2016). Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through  $\beta$  2 -Adrenergic Receptor–Mediated Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 in Dendritic Cells . *The Journal of Immunology*, 196(2), 637–644. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501206>
- Tamura, Y., Sano, M., Nakamura, H., Ito, K., Sato, Y., Shinmura, K., Ieda, M., Fujita, J., Kurosawa, H., Ogawa, S., Nakano, S., Matsuzaki, M., & Fukuda, K. (2016). Neural crest-derived resident cardiac cells contribute to the restoration of adrenergic function of transplanted heart in rodent. *Cardiovascular Research*, 109(3), 350–357. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv267>
- Tan, K. S., Nackley, A. G., Satterfield, K., Maixner, W., Diatchenko, L., & Flood, P. M. (2007). Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cellular Signalling*, 19(2), 251–260. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2006.06.007>
- Tanaka, K. F., Kashima, H., Suzuki, H., Ono, K., & Sawada, M. (2002). Existence of functional  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors on microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 70(2), 232–237. <https://doi.org/10.1002/jnr.10399>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 16295–16296. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016295>
- Taneja, V. (2018). Sex hormones determine immune response. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01931/FULL>
- Tanuma N, Shin T, Matsumoto Y. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *J Neuroimmunol*. 2000 Aug 1;108(1-2):171-80. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00309-x
- Thompson, K. K., & Tsirka, S. E. (2017). The diverse roles of microglia in the neurodegenerative aspects of central nervous system (CNS) autoimmunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18030504>
- ThyagaRajan, S., Madden, K. S., Teruya, B., Stevens, S. Y., Felten, D. L., & Bellinger, D. L. (2011). Age-associated alterations in sympathetic noradrenergic innervation of primary and secondary lymphoid organs in female Fischer 344 rats. *Journal of Neuroimmunology*, 233(1–2), 54–64. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2010.11.012>
- Tomozawa, Y., Yabuuchi, K., Inoue, T., & Satoh, M. (1995). Participation of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in  $\beta$ -adrenoceptor-mediated interleukin-1 $\beta$  mRNA induction in cultured microglia. *Neuroscience Research*, 22(4), 399–409. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00922-G](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00922-G)
- Trooster WJ, Teelken AW, Gerrits PO, Lijnema TH, Loof JG, Minderhoud JM, Nieuwenhuis P. The effect of gonadectomy on the clinical course of chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Neurol Neurosurg*. 1996 Aug;98(3):222-6. doi: 10.1016/0303-



- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J. L., Medaer, R., Hupperts, R., & Stinissen, P. (2008). Compromised CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*, *123*(1), 79. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2007.02690.X>
- Villa A, Gelosa P, Castiglioni L, Cimino M, Rizzi N, Pepe G, et al. Sex-specific features of microglia from adult mice. *Cell Rep* (2018) 23(12):3501–11. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.048
- Viswanathan, K., Daugherty, C., & Dhabhar, F. S. (2005). Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *International Immunology*, *17*(8), 1059–1069. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXH286>
- Voskuhl, R. R., & Gold, S. M. (2012). Sex-related Factors in Multiple Sclerosis: Genetic, Hormonal and Environmental Contributions. *Nature Reviews. Neurology*, *8*(5), 255. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2012.43>
- Vremec, D., O’Keeffe, M., Wilson, A., Ferrero, I., Koch, U., Radtke, F., Scott, B., Hertzog, P., Villadangos, J., & Shortman, K. (2011). Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture. *Innate Immunity*, *17*(3), 338–352. <https://doi.org/10.1177/1753425910371396>
- Vuolteenaho, K., Koskinen, A., Kukkonen, M., Nieminen, R., Päivärinta, U., Moilanen, T., & Moilanen, E. (2009). Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators of Inflammation*, *2009*, 345838. <https://doi.org/10.1155/2009/345838>
- Walker FR, Nilsson M, Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets*. 2013 Oct;14(11):1262-76. doi: 10.2174/13894501113149990208
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *26*(14), 1816. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, J., Li, J., Sheng, X., Zhao, H., Cao, X. D., Wang, Y. Q., & Wu, G. C. (2010).  $\beta$ -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. *Journal of Neuroimmunology*, *223*(1–2), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.006>
- Wang, L., Wang, R., Jin, M., Huang, Y., Liu, A., Qin, J., Chen, M., Wen, S., Pi, R., & Shen, W. (2014). Carvedilol attenuates 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells: involvement of Akt and Nrf2/ARE pathways. *Neurochemical Research*, *39*(9), 1733–1740. <https://doi.org/10.1007/S11064-014-1367-2>
- Wang, X. Q., Liu, Y., Cai, H. H., Peng, Y. P., & Qiu, Y. H. (2016). Expression of tyrosine hydroxylase in CD4<sup>+</sup> T cells contributes to alleviation of Th17/Treg imbalance in collagen-induced arthritis. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(18), 2094–2103. <https://doi.org/10.1177/1535370216660635>
- Wardyn, J. D., Ponsford, A. H., & Sanderson, C. M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. *Biochemical Society Transactions*, *43*(4), 621. <https://doi.org/10.1042/BST20150014>
- Weber, M. S., Prod’homme, T., Youssef, S., Dunn, S. E., Rundle, C. D., Lee, L., Patarroyo, J. C.,

- Stüve, O., Sobel, R. A., Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2007). Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nature Medicine* 2007 13:8, 13(8), 935–943. <https://doi.org/10.1038/nm1620>
- Weinstein, Y., Ran, S., & Segal, S. (1984). Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *The Journal of Immunology*, 132(2).
- Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., & Coulter, J. D. (1983). Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Research*, 263(1), 15–31. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91196-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91196-4)
- Whitacre, C. C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2001 2:9, 2(9), 777–780. <https://doi.org/10.1038/ni0901-777>
- White, S. R., Bhatnagar, R. K., & Bardo, M. T. (1983). Norepinephrine Depletion in the Spinal Cord Gray Matter of Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, 40(6), 1771–1773. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1983.TB08156.X>
- Wilder, R. L. (1995). Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, 13(Volume 13, 1995), 307–338. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.13.040195.001515/CITE/REFWORKS>
- Williams JL, Kithcart AP, Smith KM, Shawler T, Cox GM, Whitacre CC. Memory cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein (Mog) govern the transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (2011) 234 (1-2):84–92. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.02.008
- Wilson, J., Higgins, D., Hutting, H., Serkova, N., Baird, C., Khailova, L., Queensland, K., Vu Tran, Z., Weitzel, L., & Wischmeyer, P. E. (2013). Early propranolol treatment induces lung heme-oxygenase-1, attenuates metabolic dysfunction, and improves survival following experimental sepsis. *Critical Care (London, England)*, 17(5). <https://doi.org/10.1186/CC12889>
- Witte, M. E., Geurts, J. J. G., de Vries, H. E., van der Valk, P., & van Horssen, J. (2010). Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*, 10(5), 411–418. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2010.05.014>
- Wohleb, E. S., Hanke, M. L., Corona, A. W., Powell, N. D., Stiner, L. M., Bailey, M. T., Nelson, R. J., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. (2011).  $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *Journal of Neuroscience*, 31(17), 6277–6288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011>
- Wohleb, E. S., McKim, D. B., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2015). Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Frontiers in Neuroscience*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2014.00447>
- Wohleb, E. S., Patterson, J. M., Sharma, V., Quan, N., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. (2014). Knockdown of Interleukin-1 Receptor Type-1 on Endothelial Cells Attenuated Stress-Induced Neuroinflammation and Prevented Anxiety-Like Behavior. *Journal of Neuroscience*, 34(7), 2583–2591. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3723-13.2014>
- Wolf, K. J., Emerson, R. O., Pingel, J., Buller, R. M., & DiPaolo, R. J. (2016). Conventional and Regulatory CD4+ T Cells That Share Identical TCRs Are Derived from Common Clones. *PLOS ONE*, 11(4), e0153705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153705>
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., & Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(MAR), 26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00026>
- Wright, D. K., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Mychasiuk, R. (2017). Sex matters: repetitive mild traumatic brain injury in adolescent rats. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(9),

640–654. <https://doi.org/10.1002/ACN3.441>

- Xia, H. J., Zhang, G. H., Wang, R. R., & Zheng, Y. T. (2009). The influence of age and sex on the cell counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in Chinese rhesus macaques. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(6), 433–440. <https://doi.org/10.1038/CMI.2009.55>
- Xu, B., Zhang, W.S., Yang, J.L., Xu, H., Deng, X.M., Zhang, Y.Q. (2010). Dexmedetomidine blocks thermal hyperalgesia and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(5), 523-530. doi: 10.1038/aps.2010.32
- Yan, Z., Yang, W., Parkitny, L., Gibson, S. A., Lee, K. S., Collins, F., Deshane, J. S., Cheng, W., Weinmann, A. S., Wei, H., Qin, H., & Benveniste, E. N. (2019). Deficiency of Socs3 leads to brain-targeted experimental autoimmune encephalomyelitis via enhanced neutrophil activation and ROS production. *JCI Insight*, 4(9). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.126520>
- Yanguas-Casás N. Physiological sex differences in microglia and their relevance in neurological disorders. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. 2020; 7(1): 13-22. <http://dx.doi.org/10.20517/2347-8659.2019.31>
- Yeretssian, G., Doiron, K., Shao, W., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Nicholson, D. W., & Saleh, M. (2009). Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 9016–9020. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0813362106/SUPPL\\_FILE/0813362106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0813362106/SUPPL_FILE/0813362106SI.PDF)
- Yeshokumar AK, Narula S, Banwell B. Pediatric multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2017 Jun;30(3):216-221. doi: 10.1097/WCO.0000000000000452
- Yovel, G., Shakhar, K., & Ben-Eliyahu, S. (2001). The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecologic Oncology*, 81(2), 254–262. <https://doi.org/10.1006/GYNO.2001.6153>
- Yu, C. R., Lee, Y. S., Mahdi, R. M., Surendran, N., & Egwuagu, C. E. (2012). Therapeutic Targeting of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) Pathway Inhibits Experimental Autoimmune Uveitis. *PLoS ONE*, 7(1), 29742. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0029742>
- Yun, T. J., & Clark, E. A. (1998). Cooperation, Mechanisms of Cellular. In *Encyclopedia of Immunology* (pp. 651–656). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0171>
- Zeng, H., Ding, M., Chen, X. X., & Lu, Q. (2014). Microglial NADPH oxidase activation mediates rod cell death in the retinal degeneration in rd mice. *Neuroscience*, 275, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.05.065>
- Zhang, H., Podojil, J. R., Chang, J., Luo, X., & Miller, S. D. (2010). TGF- $\beta$ -induced Myelin Peptide-Specific Regulatory T Cells Mediate Antigen-Specific Suppression of Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), 6629. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0904044>
- Zhang, K., Tian, L., Liu, L., Feng, Y., Dong, Y. Bin, Li, B., Shang, D. S., Fang, W. G., Cao, Y. P., & Chen, Y. H. (2013). CXCL1 contributes to  $\beta$ -amyloid-induced transendothelial migration of monocytes in Alzheimer's disease. *PloS One*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072744>
- Zhang, Z., Zhang, Z. Y., Schittenhelm, J., Wu, Y., Meyermann, R., & Schluesener, H. J. (2011). Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *Journal of Neuroimmunology*, 237(1–2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.06.006>
- Zhou, J., Liu, Z., Zhang, L., Hu, X., Wang, Z., Ni, H., Wang, Y., & Qin, J. (2020). Activation of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Promotes Growth and Angiogenesis in Breast Cancer by Down-

- regulating PPAR $\gamma$ . *Cancer Research and Treatment*, 52(3), 830–847. <https://doi.org/10.4143/CRT.2019.510>
- Zhou, L., Li, Y., Li, X., Chen, G., Liang, H., Wu, Y., Tong, J., & Ouyang, W. (2016). Propranolol Attenuates Surgical Stress–Induced Elevation of the Regulatory T Cell Response in Patients Undergoing Radical Mastectomy. *The Journal of Immunology*, 196(8), 3460–3469. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1501677>
- Ziady, A. G., Sokolow, A., Shank, S., Corey, D., Myers, R., Plafker, S., & Kelley, T. J. (2012). Interaction with CREB binding protein modulates the activities of Nrf2 and NF- $\kappa$ B in cystic fibrosis airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(11), 1221–1231. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00156.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH50111261230006.JPG>
- Zoukos, Y., Leonard, J. P., Thomaides, T., Thompson, A. J., & Cuzner, M. L. (1992).  $\beta$ -Adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: A regulatory role for cortisol and interleukin-1. *Annals of Neurology*, 31(6), 657–662. <https://doi.org/10.1002/ANA.410310614>
- Zoukos, Y., Thomaides, T., Mathias, C. J., & Cuzner, M. L. (1994). High  $\beta$ -adrenoceptor density on peripheral blood mononuclear cells in progressive multiple sclerosis: a manifestation of autonomic dysfunction? *Acta Neurologica Scandinavica*, 90(6), 382–387. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.1994.TB02745.X>
- Zuk, M. (1996). Disease, endocrine-immune interactions, and sexual selection. *Ecology*, 77(4), 1037–1042. <https://doi.org/10.2307/2265574>
- Zumwalt, J. W., Thunstrom, B. J., & Spangelo, B. L. (1999). Interleukin-1 $\beta$  and Catecholamines Synergistically Stimulate Interleukin-6 Release from Rat C6 Glioma Cells in Vitro: a Potential Role for Lysophosphatidylcholine. *Endocrinology*, 140(2), 888–896. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.2.6536>

## 8. BIOGRAFIJA

Ivana Prijic je rođena 18.04.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu, a školske 2006/07. godine upisala je osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,18 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Školske 2013/14. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Imunobiologija. Od 2013. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik u Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. U periodu 2013-19. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena (OI175050, MPNTR RS), pod rukovodstvom dr Gordane Leposavić, redovnog profesora na Katedri za patobiologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U periodu 2020-24. godine, istraživački rad Ivane Prijic je finansiran na osnovu Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO između Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, odnosno Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije. U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu je kao autor ili koautor objavila 22 rada, i to 13 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), 8 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22), i 1 rad u međunarodnom časopisu (kategorije M23). Na skupovima međunarodnog značaja učestvovala je sa 9 saopštenja, a 9 saopštenja je imala i na skupovima nacionalnog značaja. Član je Društva imunologa Srbije, Kluba mladih imunologa Srbije i Mladih imunologa Evrope.

## 9. IZJAVE

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Пријић

број индекса Б3033/2013

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полне специфичности у модулаторном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

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

Потпис докторанда



У Београду, 06.06.2024.

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Ивана Пријић

Број индекса Б3033/2013

Студијски програм Имунобиологија

Наслов рада Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

Ментори Др Иван Пилиповић

Др Биљана Божић Недељковић

Потписани/а Ивана Пријић

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

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

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

**Потпис докторанда**



У Београду, 06.06.2024



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Полне специфичности у модулаторном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у 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 Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

Потпис докторанда



У Београду, 06.06.2024

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