

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Јелена З. Миловановић

**Инфекција *Cytomegalovirus*-ом и патогенеза експерименталног
аутоимунског енцефаломијелитиса**

Ментор: проф др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ 2017

Захваљујем се ментору проф др Миодрагу Лукићу, проф др Небојши
Арсенијевићу и мојој сестри Марији на подстреку, саветима, поверењу и
неизмерној помоћи;
колегама из Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија
асс. др Александру Арсенијевићу и асс.др Бојани Стојановић на помоћи

Садржај

1. УВОД	6
1.1. Мултипла склероза.....	6
1.1.1. Ток болести и клиничке манифестације.....	7
1.1.2. Етиологија мултипле склерозе	8
1.1.3. Улога микроорганизама у патогенези мултипле склерозе.	10
1.1.4. Патохистологија	12
1.1.5. Популације ћелија у зонама инфламациј	13
1.2. Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис.....	16
1.2.1. CD4+Т лимфоцити у ЕАЕ.....	20
1.2.2. CD8+Т лимфоцити у ЕАЕ.....	22
1.2.3. Мане ЕАЕ-а као модела за проучавање МС	22
1.3. Цитомегаловирус.....	23
1.3.1. Грађа цитомегаловируса	24
1.3.2. Инфекција ЦНС-а Цитомегаловирусом	25
1.3.3. Имуни одговор на инфекцију цитомегаловирусом	27
1.3.4. Имуни одговор у ЦНС-у на инфекцију цитомегаловирусом	31
1.3.5. Модулација имуног одговора цитомегаловирусом	33
1.4. Могући начини утицаја CMV на патогенезу аутоимунских болести	34
1.4.1. Молекулска мимикрија	34
1.4.2. Посматрачка активација.....	34
1.4.3. Ширење епитопа.....	35
2. ЦИЉ РАДА.....	36
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	37
3.1. Експерименталне животиње	37
3.2. Инфекција МСМV-ом.....	37
3.3. Индукција ЕАЕ.....	37
3.4. Праћење клиничког тока ЕАЕ.....	38
3.5. Хистопатолошка анализа ткива мозга и кичмене мождине.....	38
3.5.1. Фиксација ткива.....	38

3.5.2. Обрада ткива	39
3.5.3. Просветљавање ткива.....	39
3.5.4. Калупљење ткива.....	41
3.5.5. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	41
3.6. Процена хистолошког скорa	42
3.7. Изолација леукоцита из ЦНС-а.....	42
3.8. Изолација леукоцита из лимфног чвора	42
3.9. Анализа популација моноклеарних ћелија ЦНС-а и дренирајућег лимфног чвора проточном цитометријом	43
3.9.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера.....	43
3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина	44
3.10. Бојење тетрамерима	46
3.11. IFN- γ есеј (одређивање специфичности лимфоцита за пептид MOG ₃₅₋₅₅).....	47
3.12. Имунохистохемија ткивних исечака кичмене мождине	47
3.13. Статистичка обрада података.....	48
4. РЕЗУЛТАТИ.....	49
4.1. Инфекција MCMV-ом у неонаталном периоду повећава осетљивост BALB/c мишева на развој EAE.....	49
4.1.1. BALB/c мишеви инфицирани неонатално MCMV-ом и имунизовани пептидом MOG ₃₅₋₅₅ у адултном добу развијају инфилтрате у ЦНС-у у којима су подједнако заступљени CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т лимфоцити.....	53
4.1.2. Имунизација мишева, неонатално инфицираних MCMV-ом, пептидом MOG ₃₅₋₅₅ покреће значајан инфлукс проинфламацијских Th1, Th17, и Tc17 лимфоцита у ЦНС	55
4.2. Инфекција BALB/c мишева MCMV-ом у адултном добу прекида резистенцију на развој EAE изазваног пептидом MOG ₃₅₋₅₅	60
4.3. Постоји значајна разлика у заступљености субпопулација моноклеарних ћелија у ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅ и мишева само имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅	67
4.4. У ЦНС-у мишева инфицираних вирусом који развијају EAE су присутни T1/T17 CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т лимфоцити	68
4.5. Присуство CD4 ⁺ лимфоцита је неопходно за развој неуроинфламације у групи BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅	73
4.6. CD8 ⁺ ћелије играју улогу у развоју аутоимунске неуроинфламације код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅	74

4.7. Хронична непродуктивна МСМV инфекција омогућава настанак ЕАЕ код ВАLB/c мишева.....	79
4.8. Инфекција МСМV-ом конвертује микроглију у М1 фенотип.....	82
4.9. Имунизација енцефалитогеном после инфекције МСМV-ом је праћена значајним повећањем целуларности дренажујућих лимфних чворова и повећањем броја Т лимфоцита у њима	84
4.10. Инфекција МСМV-ом и имунизација енцефалитогеном ВАLB/c мишева је праћена индукцијом развоја проинфламацијских Т лимфоцита у дренажујућим лимфним чворовима у раној фази индукције ЕАЕ	87
4.11. МСМV инфекција индукује инфламацијски фенотип антиген презентујућих ћелија на периферији	92
4.12. Дендритске ћелије које долазе у лимфни чвор услед инфламацијског стимулуса су проинфламацијске.....	97
5. ДИСКУСИЈА	99
5.1. Инфекција СМV-ом чини ВАLB/c мишеве осетљивим на индукцију ЕАЕ.....	99
5.2. CD8 ⁺ лимфоцити играју улогу развоју аутоимунске неуроинфламације коју развијају ВАLB/c мишеви имунизовани енцефалитогеном и претходно инфицирани цитомегаловирусом.....	103
5.3. Инфилтрати у ЦНС-у ВАLB/c мишева инфицираних МСМV-ом и имунизованих енцефалитогеном садрже проинфламацијске Т1/Т17 CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т лимфоците.....	107
5.4. Инфекција МСМV-ом подстиче развој М1 микроглије.....	112
5.5. За развој енцефалитогеног процеса је важан утицај инфекције МСМV-ом на антиген презентујуће ћелије	113
6. ЗАКЉУЧЦИ	117
7.Референце:	120
8. ПРИЛОГ.....	148

1. УВОД

1.1. Мултипла склероза

Мултипла склероза је хронична инфламацијска демиелинизирајућа болест централног нервног система (ЦНС). Болест је први пут описао 1868. године француски лекар *Jean-Martin Charcot*, а карактеришу је фокални плакови примарне демиелинизације у белој маси мозга и кичмене мождине са релативно очуваним аксонима (1-3). Етиологија болести још увек није позната али се сматра да је осетљивост на болест одређена генским као и факторима околине. Патогенеза МС такође није у потпуности разјашњена. Иако се МС описује и као примарно дегенеративно обољење са секундарним оштећењем које је посредовано имунским механизмима (4-7) преовладава став да је ова болест у основи инфламацијске природе (8).

Инфламација је адаптивно компензаторна реакција ткива или читавог организма настала услед нарушавања хомеостазе траумом, инфективним или неинфективним агенсом агенсом (9). Одликује је низ метаболичких, ћелијских и васкуларних промена у покушају неутрализације дејства патогеног агенса и стварања услова за оздрављење ткива (10). Ткиво ЦНС-а је веома осетљиво на проинфламацијске стимулусе, а одликује га и веома мала способност регенерације (11). Услед постојања крвно-моздане баријере која спречава продор токсичних материја и ћелија у ЦНС (12, 13) као и одсуства лимфног система у ЦНС-у, ткиво ЦНС-а се традиционално описује као имунски привилеговано ткиво. Крвно-моздану баријеру граде тесно спојене ендотелне ћелије које садрже пумпе којима елиминишу токсичне и распадне продукте метаболизма из ЦНС-а у системску циркулацију; као и базалне мембране и продужци астроцита који формирају глијалну мембрану. Зато, да би циркулишуће ћелије продрле у ЦНС, морају да мигрирају кроз ендотел у периваскуларни простор, а потом да кроз глијалну мембрану инфилтришу паренхим централног нервног система (14). Уколико је глијална мембрана интактна, ћелије не улазе у паренхим ЦНС-а већ су локализоване периваскуларно (1). Ћелије микроглије су резидентна ћелијска популација у ЦНС-у, а по активацији мењају облик формирајући многобројне протоплазматске продужетке сличне активираним макрофагима (15) и продукују бројне проинфламацијске цитокине, хемокине, азот моноксид (NO)

комуницирајући са другим ћелијама у ЦНС-у па тако активирају астроците што оштећује крвно мождану баријеру и омогућује леукоцитима продор у ткиво ЦНС-а (16). Неуроинфламација започиње активацијом микроглије, а наставља активацијом других глијалних ћелија које такође продукују NO, слободне радикале и хемокине (17). У овом процесу у активацији ћелија стечене имуности важну улогу игра субпопулација макрофага, неактивних у физиолошким условима, а локализованих периваскуларно (18). *Rivest* је 2009. године (19) указао на присуство ретких Т лимфоцита који посредством адхезивних молекула ендотелних ћелија капилара мигрирају у паренхим ЦНС-а али у одсуству антигена или аутоантигена не покрећу имунски одговор. Да би отпочео процес неуроинфламације потребно је да већи број моноцита и активираних Т лимфоцита из системске циркулације уђе у ткиво ЦНС-а или да у ЦНС-у постоје антигени на које су Т лимфоцити сензибилисани (20). Неуроинфламацију одликује: продукција великог броја цитокина и хемокина који привлаче моноците и лимфоците у ЦНС, пролиферација ћелија микроглије, активација система комплемента, активација хуморалне имуности и продукција антитела (21). Главна подручја развоја неуроинфламације су мождане овојнице, подручје комора као и паренхим мозга (22, 23).

Аутоимунска природа болести је потврђена налазима, који су добијени у студијама експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), где се болест развија код осетљивих животиња после имунизацији антигенима ЦНС-а. МС и ЕАЕ имају сличне клиничке и патолошке карактеристике тако да је ЕАЕ прихваћен као експериментални модел за проучавање мултипле склерозе.

1.1.1. Ток болести и клиничке манифестације

МС су хетерогени. Код већине оболелих болест у почетку, у чак 85 процената, има фазе релапса и ремисија. Овај облик болести карактерише иницијална епизода неуролошке дисфункције (клинички изоловани синдром), коју следи период ремисије без клиничких манифестација, затим следи фаза релапса па поновне ремисије. Релапси се поклапају са инфламацијом и демиелинизацијом у ЦНС-у које се у белој маси уочавају магнетном резонанцом. После сваког релапса се смањује степен опоравка оболелих, тако да за деценију до две око 80 процената оболелих развија секундарно прогресивну мултиплу склерозу. Око 10% оболелих никада и не уђе у фазу релапса, већ је болест примарно прогресивна (24). У

секундарно прогресивном облику болести више и нема типичних инфламацијских лезија већ је неуролошки поремећај удружен са атрофијом ЦНС-а, смањењем волумена мозга и значајним губитком аксона. У око 10% оболелих се болест дијагностикује као примарна прогресивна МС коју карактеришу стално погоршање болести без релапса. Ако се болест јави у старијем животном добу, чешћи је прогресивни тип МС него облик са релапсима и ремисијама што указује да промене које се дешавају у мозгу са старењем имају одређену улогу у спором али сталном погоршању неуролошких поремећаја (25).

1.1.2.Етиологија мултипле склерозе

Етиологија мултипле склерозе није позната. Сматра се да болест настаје код генски предиспонираних особа изложених одређеним спољашњим факторима. Утврђено је да генски фактори учествују са 30% у повећању укупног ризика за развој МС. У студијама испитивања генома је утврђено око 100 различитих генских региона чије се одређене варијанте удружене са већим ризиком од развоја мултипле склерозе (26).

Непознато је да ли развој МС започиње на периферији или у ЦНС-у. У периферном моделу болести, аутореактивни Т лимфоцити се активирају на периферији процесом молекуларне мимикрије (27-29), посматрачке активације или због коекспресије TCR-а са различитим специфичностима (30). Ови аутореактивни Т лимфоцити одлазе у ЦНС заједно са активираним В лимфоцитима и моноцитима (31). У централном моделу болести није познато који тачно догађај у ЦНС-у може да започне развој болести, и ту је инфилтрација аутореактивним лимфоцитима секундарни феномен. Могуће је да се покреће инфламацијски одговор на до сада непознати вирусни агенс који има афинитет ка ЦНС-у. Ова хипотеза је базирана делимично на теорији имунског надзора ЦНС-а (32, 33).

1.1.2.1.Генска предиспозиција.

Показано је да је преваленца мултипле склерозе већа у породицама у којима већ постоје оболели од ове болести (34). Тако је ризик да развију мултиплу склерозу код најближих рођака оболелих 15–25 пута већи него у општој популацији. Већина продуката оних гена за које се сматра да су удружени са МС су укључени у регулисање функционисања имунског система. Неки од ових гена такође повећавају ризик од развоја других аутоимунских

болести (26) што може да укаже на заједничке предиспонирајуће имунске процесе што иде у прилог теорији периферне иницијације МС. Супротно, присуство неких гена потпуно различито утиче на ризик од развоја других аутоимунских обољења. Тако, иста варијанта генског региона који кодира TNFR1 повећава ризик од развоја МС, а смањује ризик од настанка анкилозирајућег спондилитиса, што потврђују и супротни ефекти лекова који делују на TNFR1 пут, па тако ови лекови ефикасни у лечењу анкилозирајућег спондилитиса изазивају релапсе МС (35). Међу генима који чине основу генске предиспозиције за развој МС а чији продукти учествују у имунским реакцијама издавају се гени за IL-2, IFN- γ и NF- κ B (36). Занимљиво је и да већи број секвенци ДНК учесталије присутних у популацији оболелих не припадају кодирајућим секванцама већ се налазе у регионима енхансера или репресора (37).

Детаљније разумевање генских фактора који играју улогу у развоју болести постоји само за локусе као што су HLA-A, HLA-DRB1 (38, 39) и гене који кодирају α ланац рецептора за IL-2 и IL-7 (40-43). Налази указују на поремећаје механизма централне толеранције као и поремећене функције ефекторских ћелија због измењеног одговора на цитокине и продукцију цитокина. Анализом експресије гена како у ткиву плака тако и у морфолошки непромењеном делу мозга оболелих од мултипле склерозе (44, 45) и у ЕАЕ идентификована су четири гена који су константно оверекспримирани, а то су: транскрипциони фактор jun-D, тромбински рецептор PAR3 (енг. *Protease-Activated Receptor 3*), рецептор T1/ST2 за IL-33 и арахидонат 5-липооксигеназа која је укључена у синтезу леукотриена (44).

1.1.2.2. Негенски фактори и фактори околине.

На важност негенских фактора у развоју мултипле склерозе указује релативно ниска стопа конкордантности код идентичних близанаца (34, 46). Инфективни агенси, навике и понашање утичу на развој болести (47). Болест се чешће јавља код младих особа женског пола (48). Болест најчешће настаје у тридесетим годинама и углавном за нешто више од две деценије узрокује непокретност. О утицају хормона на развој болести указују подаци да је мањи број релапса у току трудноће, а да се погоршање болести дешава после порођаја (49). Показана је и протективна улогу тестостерона, као и терапијски ефекти естриола у примарно прогресивном облику МС (50). Не зна се тачан механизам како хормони повећавају ризик од развоја мултипле склерозе али се вероватно ради о стимулаторном

ефекту естрогена на продукцију проинфламацијских цитокина и супротном ефекту андрогена. Студије указују да на инциденцу мултипле склерозе утичу и изложеност сунчевим зрацима, витамин D и географска ширина. Инциденца болести је најмања у подручју екватора док идући ка половима расте. Већа је у подручјима САД-а настањеним имигрантима из Северне Европе, али је упола мања у поређењу са инциденцом у Европи. Уочено је и то да ако особа мигрира из подручја са високом преваленцом мултипле склерозе у подручје ниске преваленце, пре 15-те до 16-те година живота, ризик за појаву болести постаје мањи, међутим уколико је миграција у каснијем добу, ризик остаје исти. Могуће је да је узрок промењена изложеност сунчевим зрацима која зависи од географске ширине, што утиче или на функцију имунорегулаторних ћелија или на синтезу витамина D (51). Услед смањеног излагања сунчевим зрацима повећава се продукција мелатонина који појачава Th1 имунски одговор који је удружен са развојем мултипле склерозе. Модулацијска улога фактора околине се највероватније заснива на успостављању проинфламацијског миљеа при чему се активирају проинфламацијски аутореактивни Т лимфоцити.

1.1.3. Улога микроорганизама у патогенези мултипле склерозе.

Према хигијенској хипотези смањено или одложено излагање инфективним узрочницима у детињству (у развијеним земљама) мења имунски одговор и потенцира развој аутоимунских и алергијских болести. Сматра се да су вируси директније укључени у иницијацију активације аутореактивних Т лимфоцита (28-29). Проспективне студије су указале да се релапси мултипле склерозе често јављају после вирусних инфекција. Истраживање у моделу ЕАЕ је показало да скоро 100% трансгених мишева који експримирају TCR специфичан за антиген мијелинског омотача (МВР) развијају ЕАЕ уколико се гаје у нестерилним условима, док истоветни мишеви одгајани у условима *specific-pathogen-free* остају здрави (52).

Прекид ауто толеранције може да настане и због утицаја фактора околине који индукују настанак нових аутоантигена (53). Поред тога, инфективни агенси који имају тропизам за ЦНС могу да изазову ослобађање секвестрираних антигена ЦНС-а на периферију што је показано у моделу инфекције Тајлеровим вирусом мишјег енцефаломијелитиса (енг. *Theiler's encephalomyelitis virus*, TMEV) (27, 54).

Епштајн-Баров (*Epstein-Barr*) вирус (EBV) је најчешће апострофирани фактор околине у етиопатогенези МС-а (55). Предложено је неколико механизма за објашњење улоге овог вируса у настанку и развоју болести. Према једној од тих хипотеза неадекватна контрола латентне инфекције EBV за последицу има реактивацију вируса у ћелијама ЦНС-а, а ћелије присутне у менингеама и периваскуларном простору експримирају вирусне пептиде и на тај начин реактивирају Т лимфоците претходно активирани на периферији (56). Тако перзистентна вирусна инфекција временом повећава број Т лимфоцита специфичних за вирусне антигене (57). Друга хипотеза указује да EBV нема тако специфичну каузалну улогу већ узрокује општу дисрегулацију имунског система у прилог чему говори и налаз корелације инфекције EBV-ом и ризика од настанка разних других аутоимунских болести попут системског лупуса (27).

Постоје конфликтни подаци о повезаности инфекције цитомегаловирусом и етиопатогенезе мултипле склерозе.

На позитивну корелацију између CMV инфекције и развоја МС указују:

- Повећане концентрације антитела специфичних за CMV и његову ДНК код оболелих од мултипле склерозе (58);
- Краће време између релапса, и тежи релапси код оболелих који имају антитела специфична за CMV (59);
- Израженија атрофија сиве моздане масе и целог мозга код оболелих од мултипле склерозе уколико су присутна и антитела на CMV (60).

Супротно, неке студије указују да инфекција цитомегаловирусом штити од развоја МС:

- CMV инфекција која две недеље претходи инокулацији TMEV-а ублажава овако изазвану демијелинизирајућу болест (61).
- Мања инциденца, краћи релапс и мање изражена атрофија код оболелих од мултипле склерозе уколико су присутна антитела специфична за CMV (62).
- Здраве особе које имају антитела специфична за CMV имају мању шансу за развој мултипле склерозе (63).
- Рана инфекција цитомегаловирусом смањује ризик од развоја МС до 18-те године (64).

1.1.4. Патохистологија

Кључна одлика мултипле склерозе, која ову болест разликује од других инфламацијских болести мозга, огледа се у ширењу примарне демиелинизације што ствара велике фокалне лезије са комплетним губитком мијелина и парцијалну, варијабилну дегенерацију уз губитак аксона у лезијама (65-67). Тако је субпијална демиелинизација у кортексу апсолутно специфична за МС и не виђа се у другим инфламацијским болестима мозга (68, 69). МС карактеришу конфлуентна подручја демиелинизације у белој и сивој маси мозга и кичмене мождине. Ове лезије су назване плаковима и указују на губитак мијелинског омотача и олигодендроцита. У класичној форми МС је описано неколико стадијума плака. У *акутном плаку* уз јасно изражену инфилтрацију Т лимфоцитима и макрофагима региструју се и активација ендотела, едем мијелина и губитак олигодендроцита. У *хронично-активном плаку* уочавају се периваскуларно размештени лимфоцити, јасне зоне демиелинизације са присутним макрофагима и оштећење аксона, губитак олигодендроцита и астроцитоза. *Хронични-инактивни плак* одликује се мањим перзистирајућим, појасним, периваскуларним инфилтратима лимфоцита, макрофага и плазмоцита. У макрофагима, за разлику од акутног и хронично-активног плака, нема фагоцитозних везикула које садрже мијелин. Демаркација према здравог ткиву је јасна, а унутар плака се уочава глиоза са редукцијом олигодендроцита и губитком аксона (70).

Доминантне одлике облика болести са релапсима као и прогресивне МС су: инфламација, примарна демиелинизација и неуродегенерација. Инфламација је присутна у свим стадијумима МС али је више изражена у акутним него у хроничним фазама болести. У раним лезијама се налазе ћелије имунског система пристигле са периферије кроз поремећену крвно-моздану баријеру (енг. *Blood Brain Barrier*, BBB). Демиелинизација обухвата и подручја сиве масе укључујући кортекс, једра и кичмену мождину (71). Иако су у почетку аксони и неурони очувани, са напредовањем болести постепено настају неуроаксонска оштећења која су у корелацији са инвалидитетом, атрофијом мозга и проширењем комора.

Најизраженије карактеристике прогресивне форме МС су:

1. Споро ширење већ постојећих демиелинизованих лезија са формирањем нових плакова у белој маси и масивном инфламацијом док је оштећење BBB ретко (72).

2. Прогресивна дегенерација аксона у плаковима и у наизглед нормалној белој маси. Ове промене и у наизглед нормалној белој маси су делом последица ретроградне и антероградне дегенерације неурона и инфламације у менингеама и ткиву мозга (73). Овакве промене су присутне и у активним лезијама МС (74).
3. Кортикална (субпијална) подручја демиелинизације су перзистентна и могу да захвате до 90% кортекса (75)
4. У основи свих ових промена је умерена инфламацијска реакција лимфоцита удружена са знатном активацијом микроглије у лезијама и белој маси (74).

1.1.5. Популације ћелија у зонама инфламације

Истраживања јасно указују да, иако CD8+Т и В лимфоцити могу да имају важнију улогу у каснијим фазама болести, у иницијацији инфламацијске каскаде (на почетку болести) централно место припада CD4+Т лимфоцитима (26). У инфилтратима доминирају макрофаги, а CD8+Т лимфоцита има много више него CD4+Т лимфоцита, В лимфоцита и плазмоцита (74, 76, 77). Резидентне инфламацијске ћелије ЦНС-а су кључне у поступном оштећењу аксона и уништавању олигодендроцита, важних за формирање мијелина. Ове активирани резидентне ћелије не само да су преобладајућа популација у плаковима, већ су разасуте и дифузно кроз белу масу која делује неизмењено (78-80), а њихов број корелира са степеном оштећења ткива (71). Астроцити су у активним лезијама одговорни за ширење инфламацијског одговора и следствено оштећење ткива (81), док у хроничним лезијама формирају бројне склеротске ожиљке у белој маси. Подручја демиелинизације могу да се делимично ремиелинизују али ова способност ремиелинизације временом слаби, што је последица сталног губитка олигодендроцита процесом апоптозе, као и онемогућене пролиферације и сазревања прекурсора (82).

Са напредовањем болести, атрофија је све израженија и у сивој и у белој маси (71). Са прогресијом болести не мења се проценат Т лимфоцита у инфилтратима, али се релативни удео В лимфоцита и плазмоцита повећава . Ћелије микроглије и макрофаги стално су присутни у променама у ЦНС-у (83). Током прогресије болести могуће је и смањење инфламацијских лезија у ЦНС-у и њихова организација. У секундарно прогресивном облику болести, у менингеама су присутне терцијерне структуре лимфног ткива које могу

да допринесу кортикалној демиелинизацији и оштећењу ткива у каснијим стадијумима болести (84).

Аутореактивни Т лимфоцити. Т лимфоцити су присутни унутар лезија у ЦНС-у током раног стадијума мултипле склерозе, а њихове главне мете су антигени мијелинског омотача. Циркулишући CD4+Т лимфоцити оболелих од МС су специфични за мијелински базни протеин (МРВ), протеолипидни протеин (PLP) и мијелински олигодендроцитни гликопротеин (MOG), мада се овакви лимфоцити детектују и код здравих особа. Постоје контрадикторни подаци о потенцијалним разликама у фреквенцији и авидитету ових ћелија за антигене између здравих и оболелих (85, 86).

Th1 и Th17 ћелије су главне субпопулације ефекторских CD4+Т лимфоцита укључених у развој болести. Међутим, релативни значај Th1 ћелија насупрот Th17 ћелијама у патогенези МС је споран. Постоје студије које различито приказују значај или преминацију једног ћелијског типа над другим у време иницијалне дијагнозе и у каснијим стадијумима или прогресији болести (87, 88). Код оболелих од мултипле склерозе периферни CD4+Т лимфоцити, са исказаним хемокинским рецепторима CCR6, специфични за мијелин појачано продукују Th1 и Th17 цитокине: IFN- γ и IL-17 (89). Шта више, неки CD4+Т лимфоцити у лезијама имају интермедијерни фенотип и експримирају симултано и IFN- γ и IL-17 (90).

Примена устекинумаба, антитела које делује на субјединицу p40 заједничку за IL-12 и IL-23 (citoкина укључених у диференцијацију Th1 и Th17 ћелија) није дала очекиване резултате. Предложена објашњења ослањају се на непропусност BBB за овај лек. Како било, значај ова два цитокина у каснијим стадијумима болести је мањи (91).

CD8+Т лимфоцити су заступљенији у инфилтратима у белој и сивој маси као и пољима кортикалне демиелинизације него CD4+Т лимфоцити, а њихов број тесно корелира са степеном оштећења аксона (23). Конзистентно са кључном улогом ових ћелија у патогенези болести, CD8+Т лимфоцити специфични за мијелин се углавном активирају ширењем епитопа чак и у моделу ЕАЕ који је посредован CD4+Т ћелијама што подразумева и унакрсну презентацију антигена за коју су задужене дендритске ћелијама које у ЦНС-у потичу од моноцита (92). Код особа оболелих од МС, у активним лезијама око четвртина CD8+Т ћелија продукује IL-17, а сматра се да су то инваријантне Т ћелије које потичу из слузница (93).

Аутореактивни В лимфоцити. За разлику од Т лимфоцита, број инфилтришућих В лимфоцита у ЦНС-у варира у току прогресије болести. Клонови В лимфоцита могу да се нађу у менингеама, паренхиму и ликвору, а инратекални В лимфоцити продукују антитела која се детектују у ликвору и имају дијагностички значај. Код оболелих од примарне или секундарно прогресивне МС број плазмочита расте са годинама (23). Менингеа пацијената са секундарно прогресивном формом болести садрже и терцијерне лимфне структуре које садрже агрегате плазмочита, В и Т лимфоцита као и фоликуларне дендритске ћелије (84) и резултат су дуготрајне инфламације. Овакве структуре се јављају и у другим хроничним инфламацијским или инфективним болестима (94). Насупрот томе, примарна прогресивна болест се карактерише дифузном инфилтрацијом менингеа без формирања терцијалних фоликула (95). Скорашња примена нових технологија секвенционирања полипептида којима се може анализирати диверзитет В ћелијског рецептора омогућила је карактеризацију клонова В лимфоцита у периферним лимфним органима и ликвору пацијената. Оне указују да В лимфоцити који су се сусрели са антигеном могу да наставе процес матурације у дренирајућим лимфним чворовима пре трансмиграције у ЦНС (96, 97). Ови налази би могли да омогуће модулацију одређених субтипова В лимфоцита у терапијске сврхе (96, 97). Клиничке студије су показале да су моноклонска антитела специфична за CD20, попут ритуксимаба, (98) веома ефикасна у редуковању релапса. Ови лекови уклањају већину субсетова В лимфоцита али не и диферентоване плазмочите који продукују аутоантитела, па је вероватно да свој ефекат остварују смањивањем способности В лимфоцита да презентују антигене и инхибицијом продукције проинфламацијског IL-6 у В лимфоцитима (99).

Резидентне ћелије у ЦНС-у такође могу да продукују веома широк спектар неуротоксичних инфламацијских медијатора као што су цитокини, хемокини и реактивна једињења кисеоника који промовишу и одржавају оштећења неурона и аксона и тако изазивају неуродегенерацију (78, 100). Претпоставља се да ове ћелије имају улогу у инфламацији у ЦНС-у и то не само у каснијим стадијумима болести, када имунске ћелије са периферије инфилтришу ЦНС, него од самог почетка. Показано је да се одмах по првој манифестацији болести, повећава број и активација микроглије и макрофага у лезијама као и у наизглед здравој белој маси (71, 101). Осим тога, како се неуроаксонална дегенерација шири, активира се и микроглија у околини аксона, дистално од оштећења. Улога микроглије

у развоју и прогресији МС, у односу на макрофаге доспеле са периферије није у потпуности разјашњена јер постоје тешкоће у разликовању ове две морфолошки и функционално сличне популације ћелија. Подаци добијени истраживањем трансгених модела ЕАЕ указују да су за развој болести и почетак демјелинизације одговорни макрофаги који потичу од моноцита, док је микроглија више укључена у уклањање дебрија, што указује да микроглија може да има и вишеструку неуропротективну улогу помажући: у резолуцији инфламације (102), у активном успостављању специфичних неуронских синапси како би се одржала хомеостаза ЦНС-а (103) и кроз продукцију неуротрофичних фактора који учествују у репарацији неуроаксоналног оштећења. Сматра се да је примарна неуродегенерација у стањима као што је Алцхајмерова болест, делимично последица неадекватне неуропротективне улоге микроглије (104), што може да буде важно и за развој МС. С друге стране, здрави неурони конститутивно експримирају инхибиторе који блокирају фагоцитну способност микроглије указујући да уколико се не држи под контролом, микроглија може да промовише оштећење ткива и да успостави повратну спрегу која резултује прогресивним оштећењем неуроаксона. Поред тога, активирана микроглија може да подстиче дисфункцију астроцита. Астроцити могу да имају обе, и проинфламацијске и антиинфламацијске карактеристике и играју важну улогу у одржавању BBB формирањем глије лимитанс која окружује нервно ткиво. Рано током развоја МС дисфункција ових ћелија, која се огледа у продукцији хемокина, може да дозволи и олакша инфлукс периферних имунских ћелија у ЦНС. Шта више, лимфоцити активирани микроглијом могу да продукују CCL2 и GM-CSF што ће даље подстаћи пролиферацију и активацију микроглије (80).

Резултати клиничких студија указују на добре резултате антиинфламацијске терапије која је циљано усмерена на Т и В лимфоците или само В лимфоците (105, 106), док терапија која је усмерена само на помагачке CD4+ Т ћелије има слабије или је чак без ефекта (91, 107).

1.2. Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис

ЕАЕ је инфламацијска болест ЦНС-а индукована експериментално, а посредована Т лимфоцитима јер имунизација мијелинским аутоантигеном стимулише јак одговор Т лимфоцита који иницира патолошке промене у ЦНС-у које резултују деструкцијом мијелина. Већина садашњих сазнања о патогенези мултипле склерозе је заснована на основу

проучавања ЕАЕ пошто клинички и патолошки аспекти ове две болести имају велике сличности. И мултиплу склерозу и ЕАЕ одликује: деструкција мијелинског омотача и нервних продужетака, релативни губитак осталих нервних елеманата- нервних и потпорних ћелија ЦНС-а, као и присуство мултиплих лезија дисеминованих у времену и простору, а које су више изражене у можданом стаблу и кичменој моздини и предоминантно периваскуларно локализоване; као и инфламација, демијелинизација, глиоза, парцијална ремиелинизација и присуство имуноглобулина у ЦНС-у и ликвору (108).

Први опис ЕАЕ су дали, 1925. године, *Koritschoner* и *Schweinburg* (109) а нешто касније су *Stuart* и *Krikorian* (110, 111) 1928. и 1930. године показали да поновљено апликовање хомогената кичмене моздине људи или оваца у зечева индукује развој инфламације у кичменој моздини са последичним парализама.

Схема 1

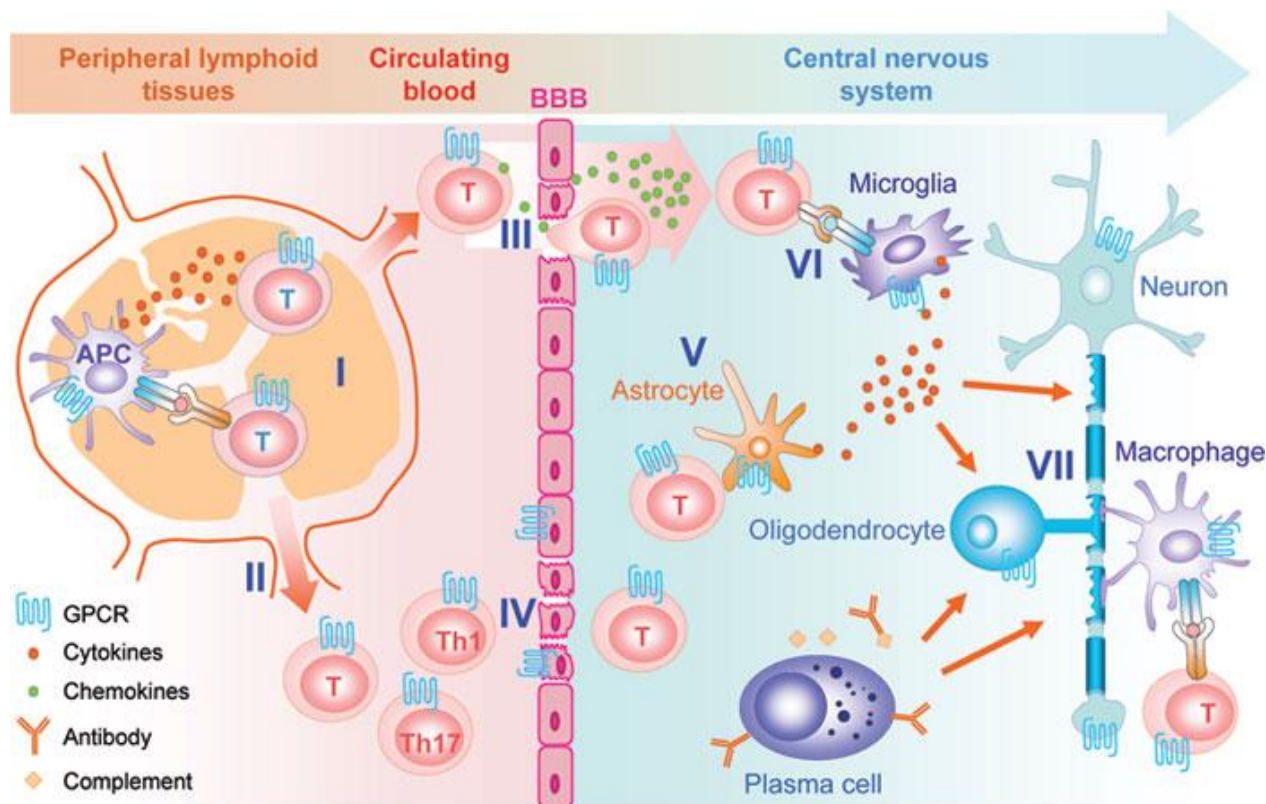


Схема 1. Патогенеза ЕАЕ (преузето из Du C, Xie X. G protein-coupled receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis. *Cell Research* . 2012; 22:1108–1128.

Наредно значајније истраживање, на резус мајмунима и зечевима, спровео је 1933. године Риверс, и том приликом уочио сличност неуролошких компликација вирусних болести (мале, велике и овчје богиње и беснило) које могу да захвате ЦНС. Његови експерименти састојали су се у томе да се хомогенати инфицираних мозгова апликују експерименталним животињама, а контролним групама убризгавани су хомогенати и екстракти мозгова здравих животиња. Интересантно је да су и животиње из контролне групе развиле несигуран ход и мишићну слабост удружену са периваскуларним инфилтратима и дегенерацијом мијелина у мозгу и кичменој мождини (19, 112). У другим експериментима урађеним у то време на зечевима, показано је да се по апликовању емулзије кичмене мождине код зечева детектују повећане концентрације антитела специфичних за антигене мозга и да део ових зечева развија парализу. Показан је и директно пропорцијални однос између имуногености емулзије и концентрације специфичних антитела а такође и броја оболелих животиња (113). Ови резултати су указали на повезаност демиелинизације и специфичног имунског одговора, што је и потврђено експериментима у којима су примењиване емулзије мозга помешане са убијеним бацилима *Mycobacterium tuberculosis* и парафинским уљем (*Freund's* адјуванс), супстанцама које појачавају продукцију антитела, што је нешто раније описао *Freund* (114). Резултат овакве примене хомогената мозга је био развој аутоимунског енцефаломијелитиса (сада познатог као ЕАЕ) (115, 116) који је индукован са само неколико инјекција хомогената за разлику од првих експеримената када је, без адјуванса, било потребно и до 84 инјекција да би животиње развиле парализу.

У каснијим експериментима публикованим 1947. године, резус мајмуни који су примили 3 дозе хомогената мозга зеца у комплетном Фројндовом адјувансу (енг. *Complete Freund's Adjuvant*, CFA) развиле су болест коју су одликовале фазе релапса и ремисија (117). Анализа хистолошких препарата је указала на постојање леукоцитног инфилтрата око крвних судова уз инфилтрацију зида крвног суда и периваскуларног простора у акутним лезијама, док су код хроничних лезија описани интензивнији инфилтрати са удруженом пролиферацијом и хипертрофијом ћелија микроглије (117). ЕАЕ је потом индукован различитим врстама животиња: заморчићима (118), зечевима (119), козама (120), мишевима (121), пацовима (122), хрчцима (123), псима (124), овцама (125), пилићима (126) при чему је утврђено постојање разлике у осетљивости на различите антигене, па су се тако и ток болести и

интензитет неуроинфламације разликовали. Показало се да су неке врсте животиња резистентне на индукцију ЕАЕ док су неке осетљивије (127). Мишји модели ЕАЕ су уведени педесетих година прошлог века али нису често коришћени због мале инциденце развоја болести све док у протокол индукције није уведен токсин пертусиса који је значајно повећао проценат животиња које развијају ЕАЕ. У већини ових модела се као адјуванси апликују СФА (енг. *Complete Freund's Adjuvant*) и токсин пертусиса који повећавају пермеабилност крвно моздане баријере и инфилтрацију ЦНС-а сензибилисаним циркулишућим леукоцитима (128). Најчешће коришћени мишји модели ЕАЕ су: ЕАЕ са релапсима и ремисијама код SJL мишева индукован пептидом (PLP₁₃₉₋₁₅₁) протеолипидног протеина; ЕАЕ код PL/J мишева који се индукује базним протеином мијелина (МВР-ом): хронично прогресивни модел ЕАЕ индукован мијелинским олигодендроцитним протеином (МОГ протеином) или форма ЕАЕ индукована МОГ₃₅₋₅₅ пептидом код C57/BL6 мишева и имунизација хомогенатима ЦНС-а или МОГ протеином који индукују болест са релапсима и ремисијама код *Biozzi* АВН мишева.

Кључни доказ којим је потврђено да су у основи ЕАЕ аутоимунски процеси је био пасивни трансфер болести Т лимфоцитима специфичним за антигене мијелина изолованим из имунизованих животиња и *in vitro* рестимулисаних специфичним антигеном (129), а нарочито доказивање присуства аутореактивних Т лимфоцита код наивних мишева (52).

Постоји и модел спонтаног ЕАЕ који се развија код трансгених животиња које имају огроман проценат Т лимфоцита специфичних за компоненте мијелина (52, 130, 131). Овако спонтано настали ЕАЕ има доста сличности са мултиплом склерозом и одликују га релапси и ремисије (132). Ови мишеви који су на SJL/J основи имају већи проценат МОГ специфичних CD4⁺ Т лимфоцита, развијају спонтано ЕАЕ са релапсима и ремисијама и различитим клиничким манифестацијама у сваком наредном релапсу. У основи овог модела је активација Т лимфоцита специфичних за компоненте ЦНС-а и то после интеракција са нормалном коменсалном флором црева (132). Активација ових патогених Т лимфоцита се одвија у лимфном ткиву црева. Да би настала болест неопходно је да овако активирани Т лимфоцити активирају В лимфоците специфичне за МОГ и то у цервикалним лимфним чворовима који су дренажујући за ЦНС. Активација В лимфоцита је МОГ зависна и подразумева мобилизацију и транспорт МОГ-а из ЦНС-а у цервикалне лимфне чворове. Описани модел ЕАЕ је јединствен јер има доста сличности (и клиничких и хистолошких)

са мултиплом склерозом, спонтано настаје и у патогенези играју улогу и Т и В лимфоцити (132).

ЕАЕ карактеришу мешовита инфилтрација ЦНС-а, различит степен демиелинизације као и различито изражени симптоми болести. Клинички ток ЕАЕ-а може да буде акутни или хронични (133). Клиничке манифестације болести укључују атонију репа, парезу а потом парализу прво задњих, а потом и предњих ногу.

Акутни облик болести је монофазан и одликује га изразита неуроинфламација уз благу демиелинизацију и најчешће одсуство неуродегенеративних процеса. Наиме, 7 до 10 дана после индукције ЕАЕ, болест је клинички манифестна наредних 5 дана, а потом, од 14-ог дана животиње улазе у ремисију (134). *Хронични облик ЕАЕ* је полифазни, са релапсима и ремисијама. Спонтани релапс се јавља од 18-ог до 25-ог дана после имунизације, а клиничке манифестације су идентичне онима у акутној фази болести. Опоравак животиња које преживе ЕАЕ је од 30-ог до 40-ог дана по имунизацији. У хроничној форми болести доминира демиелинизација уз екстензивну неуродегенерацију.

Примена акутног модела ЕАЕ је важна у тумачењу неуроинфламацијских процеса и њихове повезаности са клиничким манифестацијама болести, док је хронични модел ЕАЕ значајан за анализу неуродегенеративних промена које су типичне у каснијим фазама болести (135).

1.2.1. CD4+Т лимфоцити у ЕАЕ.

Т лимфоцити, а посебно CD4+Т лимфоцити су кључни за индукцију ЕАЕ, док остале ћелије имају улогу у ефекторској фази болести. Антиген презентујуће ћелије периферног лимфног чвора ендоцитују емулзију СFA и аутоантигена кога приказују у склопу молекула II класе МНС и на тај начин активирају специфичне CD4+Т лимфоците. MOG₃₅₋₅₅ садржи имунодоминантне епитопе за везивање за II класу МНС. Ови пептиди стимулишу аутоантиген специфичне Т лимфоците који су избегли негативну селекцију у тимусу. Настали CD4+ефекторски Т лимфоцити, у лимфном чвору, пролиферишу и потом мигрирају у ЦНС. У патогенезу ЕАЕ је углавном укључен IFN- γ продукујући аутореактивни Th1 субсет лимфоцита. Опште прихваћено мишљење да је ЕАЕ аутоимунска болест Th1 типа у којој постоји јака удруженост са Т лимфоцитима који секретују IFN- γ у ЦНС-у (136, 137), променило је откриће да трансфер трансгених Th2 лимфоцита стимулише алергијску форму ЕАЕ (138). Показано је и да мишеви са делецијом гена за IFN- γ или његов рецептор

или субјединицу p35 која је неопходна за диференцијацију у Th1 (139, 140) или IL-12Rb2 (141), развијају чак и јачи облик ЕАЕ, у поређењу са *wild type* животињама, а ради се о развоју Th17 имунског одговора (142-144). Данас се зна да су Th17 ћелије иницијатори болести у стандардном ЕАЕ моделу и да је за њихов развој неопходно присуство IL-23 и ROR γ t (145) као и ROR α (146). Ове ћелије, у ЦНС-у, касније мењају свој фенотип и продукују IFN- γ и GM-CSF, а губе експресију IL-17 (147, 148). Диференцијација наивних у подтипове ефекторских Т лимфоцита у дренирајућим лимфним чворовима је под утицајем баланса продукованих цитокина, а у инфекцијама је тип цитокина детерминисан типом инфективног микроорганизма. *M. tuberculosis* присутан у СФА може да покрене двојак имунски одговор: ка Th1 или Th17 ефекторским лимфоцитима. Тип антигена или епитоп који се користи за имунизацију такође одређује тип имунског одговора. Извесни антигени покрећу предоминантно Th17 имунски одговор и церебеларну болест, а други стимулишу Th1/Th17 одговор са типичним лумбалним инфилтрацијама (149).

Иако су ЕАЕ модели веома значајни за проучавање маханизамa болести *in vivo*, постоје имунске разлике међу врстама укључујући ту и неопходност IL-23 у индукцији Th17 ћелија код мишева али не и код људи (150, 151). Поред тога, Th17 лимфоцити су функционално различити код мишева и код људи. Мишји Th17 лимфоцити секретују GM-CSF што је веома важно за развој хроничне инфламације у ЕАЕ (152) док су код људи глсвни извор овог цитокина Th1 и други ћелијски типови (153).

У ЕАЕ Т лимфоцити инфилтришу ЦНС обично осмог или деветог дана после имунизације и углавном експримирају IL-17 (154). Продукција овог цитокина није обавезна за индукцију ЕАЕ јер и мишеви којима се специфичним антителима блокира IL-17 развијају ЕАЕ. Могуће је да је главна функција IL-17 да омогући улазак ћелија у ЦНС. IL-17 индукује секрецију матриксних металопроотеиназа (MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 и MMP13) и цитокина GM-CSF, IL-6 као и хемокина (CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, CXCL2 и CXCL5) у резидентним ткивним ћелијама. Ови молекули привлаче Т лимфоците и мијелоидне ћелије и омогућавају им улазак у ЦНС. IL-17 вероватно утиче на интегритет крвно мождане баријере индукцијом реактивних једињења кисеоника (ROS) у ендотелним ћелијама (155). Неки од цитокина попут G-CSF и GM-CSF мобилишу неутрофиле у ЦНС (156). Неутрофили улазе у ЦНС рано у току болести (157, 158). Деплеција неутрофила или блокада CXCR2, главног хемокинског рецептора за CXCL1/2 на неутрофилима успоставља интегритет BBB

и супримира развој ЕАЕ индукован активним или пасивним трансфером мијелин специфичних Т лимфоцита (159, 160). Стварна улога неутрофила у ЦНС-у није сасвим дефинисана али је показано да ове ћелије доприносе деструкцији крвно možдане баријере (161) и да имају важну улогу у матурацији локалних антиген презентујућих ћелија у ЦНС-у (162). Поред утицаја на мобилизацију неутрофила GM-CSF мобилише и инфламацијске моноците и повећава њихову способност да стимулишу диференцијацију Th лимфоцита у Th1/17 фенотип.

Т ћелије активирају макрофаге у ЕАЕ. Макрофаги имају неколико улога у патогенези ЕАЕ, пре свега секрецијом MMP2 и MMP9 оштећују паренхималну базалну мембрану коју формирају астроцити (163) што омогућава леукоцитима да напусте периваскуларни простор и инфилтришу паренхим ЦНС-а. Следећа улога макрофага се огледа у оштећењу мијелина генерисањем реактивних једињења кисеоника (ROS) (164, 165). У лезијама у ЕАЕ и MS макрофаги преузимају велике делове мијелина (166). Т лимфоцити иницирају овај процес директном активацијом макрофага и цитокинима: IFN- γ и TNF- α . Недавно је показано да макрофаги настали од пристиглих моноцита иницирају демиелинизацију у ЦНС-у, док микроглија има улогу у уклањању ћелијског дебрија (102).

1.2.2. CD8+Т лимфоцити у ЕАЕ

Олигодендроцити експримирају антигене у склопу I класе МНС па су CD8+Т лимфоцити способни да директно препознају мијелинске пептиде презентоване на олигодендроцитима. CD8+Т лимфоцити секретују перфорине, гранзиме и IFN- γ који директно оштећују олигодендроците (167, 168). CD8+Т лимфоцити изоловани из животиња имунизованих MOG пептидом способни су да након трансфера у здраве реципијенте узрокују демиелинизацију (169). CD8+Т лимфоцити могу да продукују и IL-17 и онда се означавају као Tc17 ћелије а детектоване су у лимфном чвору и у ЦНС-у мишева имунизованих MOG пептидом (170). За ове ћелије је у ЕАЕ показано да пружају подршку процесу диференцијације у Th17 (171).

1.2.3. Мане ЕАЕ-а као модела за проучавање MS

Иако је ЕАЕ широко распрострањен као модел за MS, није идеалан. Главно ограничење је артефицијална индукција ЕАЕ па је тешко на основу овог модела закључивати о етиологији

МС. У етиопатогенези МС важну улогу играју инфективни првенствено вирусни антигени који унакрсно реагују са мијелином (172), а у ЕАЕ моделима се користе инбредне врсте животиња које се гаје у *pathogen free* условима. У већини модела ЕАЕ се развија делимична демиелинизација у ЦНС-у или се уопште не развија, а ток болести је углавном акутни монофазни са спонтаним опоравком, што је у контрасту са хроничном прогресивном МС и демиелинизацијом код људи. Упркос наведеним недостатцима, ЕАЕ је и даље најкоришћенији модел који је омогућио низ открића како у патогенези, тако и у терапији МС (173).

1.3. Цитомегаловирус

Цитомегаловирус (*Cytomegalovirus*, CMV) припада фамилији *Herpetoviridae*, субфамилији *β -Herpesvirinae* и стриктно је *species* специфичан. Код имунокомпетентних људи изазива доживотну асимптоматску инфекцију. Цитомегаловирус изазива тешке форме болести код имунодефицијентних особа и водећи је инфективни узрочник конгениталних анормалија попут микроофталмије и микроцефалије, као и функционалних абнормалности као што су епилепсија и ментална ретардација (174, 175).

Прва проучавања овог вируса почела су испитивањем етиолошког узрочника промена које одликују нуклеарне и перинуклеарне инклузије и увећање читаве ћелије (цитомегалија), познатих под називом „совино око“ код мртворођене деце (1910) и касније (1964) код особа које су претходно имале трансплантације (176-178).

Студије хуманог цитомегаловируса (*Human Cytomegalovirus*, HCMV) указују на присуство вирусних антигена или нуклеинских киселина вируса у мукози гастроинтестиналног тракта (желуца, дуоденума, илеума, колона, ректума) (179-183), као и у алвеоларним епителним ћелијама (180, 184, 185) бубрежним гломерулима и епителу тубула бубрега (186) код имунокомпромитованих особа. Епителне површине су важне како за улазак тако и за екскрецију вируса. Начини уласка вируса у домаћина још увек нису јасно познати. Продуктивна инфекција је ограничена на жлездане епителне ћелије пљувачних жлезди у дужем временском периоду чак и код потпуно имунокомпетентних домаћина. Такође инфективни вирус може да се лако детектује у пљувачци хронично инфицираних мишева. Зато се сматра да је пљувачка главни извор хоризонталног ширења вируса и главни начин уласка овог вируса у епител гастроинтестиналног и горњег респираторног тракта.

HCMV инфицира најчешће епителне и ендотелне ћелије нарочито капилара и венула мозга (187), плућа (180, 184), срца (188, 189), гастроинтестиналног тракта (180), (181-183, 190), (191) и плаценте (192, 193). Вирус се ношен ћелијама хематогено дисеминује и инфицира различите типове ћелија укључујући поред ендотелних и епителних ћелија и фибробласте и глатке мишићне ћелије (194). Цитомегаловирус перзистира и у мијелоидним прекурсорским ћелијама, од стадијума CD34+ матичне ћелије хематопоезе до стадијума CD14+ моноцита (195). Моноцити након преласка из крви у ткива диферентују у макрофаге и тада цитомегаловирус уколико је присутан, прелази из латентне инфекције у литичку фазу.

1.3.1. Грађа цитомегаловируса

Вирус садржи дволанчану ДНК чији латентни и литички гени кодирају око 230-250 протеина од којих многи имају имунорегулаторне улоге (196). ДНК геном и централни протеини језгра се налазе унутар икозаедарног капсида који је окружен тегументумом који је релативно аморфан и садржи вирусне структурне протеине и ензиме који су неопходни за брзу репликацију вируса и за успостављање латентне инфекције. Тегументум окружује липопротеински омотач који настаје од нуклеарне и ћелијске мембране инфицираних ћелија домаћина. Овај омотач садржи бројне вирусне гликопротеине од којих само два омогућавају улазак вируса у ћелије. Гликопротеин В омогућује фузију омотача вируса са ћелијском мембраном и омогућава иницијално везивање вируса за хепаран сулфат глюкозаминогликана ћелије (197). Други гликопротеин је димер gH-gL који је кључан за улазак вируса у ћелије и то вероватно стимулисањем фузије гликопротеина В и ћелијске мембране (198).

Мишији цитомегаловирус (*Murine Cytomegalovirus, MCMV*) је 1954. године изоловала Маргарет Смит из културе ткива плувачних жлезда лабораторијских мишева (199). MCMV има доста сличности са HCMV. Геном оба вируса је линеаран, изазивају латентну инфекцију која се реактивира у стању имуносупресије и тада изазива дисеминовану, често фаталну болест. Оба вируса инфицирају скоро исте ћелије и органе, сличан је ток инфекције, а типичне патолошке промене су готово идентичне, осим што MCMV не пролази плаценту. (200). Како је болест коју развијају мишеви инфицирани мишјим цитомегаловирусом веома слична болести коју развијају људи инфицирани хуманим

цитомегаловирусом, последњих 20 година је интензивно проучавана патогенеза цитомегаловирусне инфекције на мишевима. Клиничке манифестације болести код мишева зависе од извора вируса, да ли је из културе ткива или из пљувачне жлезде, затим од величине инокулума и начина апликације, имунског статуса, старости и генске основе миша.

1.3.2.Инфекција ЦНС-а Цитомегаловирусом

Цитомегаловирусну инфекцију новорођених мишева карактерише хематогена дисеминација вируса у централни нервни систем (ЦНС) због још увек незреле крвно-мождане баријере (201). Ћелије које експримирају вирусне антигене могу да се детектују и у олфакторном епителу инфицираних животиња што указује да вирус може да уђе у мозак новорођених мишева и преко сензорног епитела (201). Инфекцију ЦНС-а новорођених мишева одликује просторна дисеминација, фокални ненекротизујући енцефалитис и поремећаји у развоју мозга (202).

CMV може да уђе у скоро све резидентне ћелије ЦНС-а: астроците, микроглију, олигодендроците и ендотелне ћелије, међутим комплетирање вириона није могуће у свим овим ћелијама (203, 204). Инфекција ћелија микроглије Цитомегаловирусом није литичка (205, 206). Астроцити су у потпуности пермисивни за Цитомегаловирус, који у њима изазива литичку инфекцију која резултује смрћу ћелије (205). Литичка инфекција ендотелних ћелија је такође могућа, а могуће је да вирус користи ове ћелије за улазак у ЦНС (207-209). Нервне матичне ћелије, NSC (од енг. *Neural Stem Cells*) као и прогениторске ћелије су у потпуности пермисивне за вирусну инфекцију (210), и инфекција ових ћелија резултује инхибицијом пролиферације и диференцијације и њиховим уласком у апоптозу (211-213). NSC које избегну литичку инфекцију и ипак диференцирају у неуроне експримирају касни антиген МСМV-а Е1 (214) и у њима је могућа реактивација вируса (215). Овакве ћелије имају поремећену миграцију и диференцијацију што је у основи неуролошких поремећаја (216). Измењена је морфогенеза церебелума, смањена пролиферација и миграција грануларног слоја, смањена експресија маркера диференцијације и активација неуротрофних рецептора (202).

Фокуси са малим бројем инфицираних ћелија детектују се у различитим регионима мозга попут кортекса, хипокампуса, перивентрикуларног региона као и церебелума и менингеа (202). Фокусе инфекције окружују инфилтрати мононуклеарних ћелија, у којима доминирају Т лимфоцити, F4/80+ макрофаги и микроглија (217), при чему су неретко F4/80+ ћелије позитивне на вирусне антигене (218).

Студије су указале да су нервне прогениторске и матичне ћелије и код одраслих мишева пермисивне за Цитомегаловирус после интрацеребралне инокулације, а да фактор раста епидерма (енг. *Epidermal growth factor*, EGF) повећава ту пермисивност (219). Рецептор за EGF (EGFR) се сматра једним од рецептора и за HCMV (220). Присуство EGF може да повећа популацију EGFR+ ћелија што резултује и повећаном пермисивношћу цитомегаловируса (220). По резолуцији инфекције нема елиминације вирусног генома из централног нервног система и вирус успоставља дугоживећу латентну инфекцију са периодичним реактивацијама.

Тачни механизми којима вирус пролази крвно моздану баријеру нису познати. Показано је да се после интраперитонеалне апликације новорођеним мишевима вирус детектује и у плазми и у ћелијама крви, што указује да HCMV може да уђе у ЦНС као слободан или ношен ћелијама (221). Вирус се најпре репликује у периферним органима и хематогено дисеминује у ЦНС. У ткиву мога се вирус поново репликује (202, 221) и детектује се већ седмог дана по инокулацији (217). Највећи број комплетних вириона у ЦНС-у се детектује од 10 до 14 дана после инокулације вируса, а већ од 21. дана вирус су у ЦНС-у недетектибилни (202, 221).

Важно је напоменути да је ЦНС код неонаталних мишева еквивалентан хуманом фетусу у 15-ој недељи гестације и да се инфекција HCMV-ом углавном дешава током раног периода другог триместра трудноће (222). Зато HCMV инфекција новорођених мишева у потпуности одговара стању након вертикалне HCMV трансмисије (217).

Хистолошке одлике лезија у мозгу неонатално инфицираних мишева се поклапају са налазима код оболелих од AIDS-а и инфицираних хуманих фетуса (202, 223). Вирусна инфекција обухвата различита подручја мозга која одговарају хематогеном ширењу вируса, као и код конгениталне HCMV инфекције (202), али су на инфекцију најпермисивније нервне матичне ћелије (224-226). Ове ћелије су присутне и у мозгу одраслих особа, у

највећој мери перивентрикуларно, где се Цитомегаловирус и детектује у случају инфекције ЦНС-а у адултном периоду (227).

1.3.3.Имунски одговор на инфекцију цитомегаловирусом

Прву линију одбране од вируса обезбеђују NK ћелије, макрофаги и бројни цитокини који се продукују активацијом ових ћелија. Важност урођене имуности за контролу инфекције Цитомегаловирусом је нарочито значајна у перинаталном периоду због незрелости стеченог имунског одговора у овом добу (228). Вирус се репликује у јетри, слезини, плућима, плувачним жлездама (229) тако да су ова инфицирана подручја главна места где се одвија урођени имунски одговор током акутне инфекције Цитомегаловирусом.

Дендритске ћелије остварују интеракцију са молекулским обрасцима Цитомегаловируса преко TLR3 и TLR9 чиме се активирају сигнални путеви NF- κ B и IRF3 што за последицу има продукцију бројних проинфламацијских и антивирусних цитокина (230).

Дендритске ћелије које препознају Цитомегаловирус продукују хемокин CCL3 који стимулише продукцију IFN- γ и TNF- α у NK ћелијама. Поред тога што показује антивирусну активност, IFN- γ стимулише експресију NO₂ у макрофагима (231, 232) који игра улогу у елиминацији разних вируса укључујући и Цитомегаловирус (232, 229). Кључну улогу у ограничавању репликације вируса током ране фазе вирусне инфекције имају IFN- α , који продукују макрофаги и дендритске ћелије и IFN- β , који продукују фибробласти и ендотелне ћелије (233). Истраживања указују да су мишеви са делецијом гена за рецептор IFN- α осетљивије на вирусну инфекцију у поређењу са мишевима који немају ген за рецептор IFN- γ . Мишеви без рецептора за IFN- α умиру од дозе која је 100 пута мања од леталне дозе за *wild type* мишеве (234, 235). Инфламацијски макрофаги продукују цитокине који омогућавају адекватну активацију ћелија стечене/специфичне имуности односно CD4+T и CD8+T лимфоцита. Ћелије специфичне имуности играју кључну улогу у резолуцији примарне инфекције и одржавању латенције вируса. У контроли вирусне инфекције учествује и хуморална имуност тако што по активацији латентне инфекције антивирусна антитела неутрализују вирус и блокирају дисеминацију.

Упркос брзом имунском одговору, Цитомегаловирус се лако шири кроз читаво тело заражене јединке што остварује стимулацијом продукције проинфламацијског хемокина

CCL2/MCP-1 у зараженим ћелијама (236). Експресија CCL2 је под контролом сигналних путева NF- κ B и IRF-3 који индиректно повећавају транскрипцију CCL2 активацијом разних интерфероном стимулираних гена (ISGs). IFN- β може да индукује транслокацију транскрипционог фактора STAT-1 и NF- κ B у нуклеус и тако стимулише експресију CCL2 (236). CCL2 делује хемоатрактантно на моноците који експримирају рецептор CCR2. То је заправо и кључни корак јер циркулишући моноцити дисеминују вирус током акутне инфекције, а по уласку у ткиво диферентују у зреле макрофаге што подстиче репликацију CMV-а. МСМV кодира синтезу проинфламацијског молекула МСК-2, који привлачи мијелоидне ћелије које експримирају рецептор CCR2 (237). МСК-2 подстиче имунски одговор домаћина и регрутовање мијеломоноцита на иницијално место инфекције. Мобилизација мијеломоноцита појачава дисеминацију вируса крвотоком (238).

Схема 2.

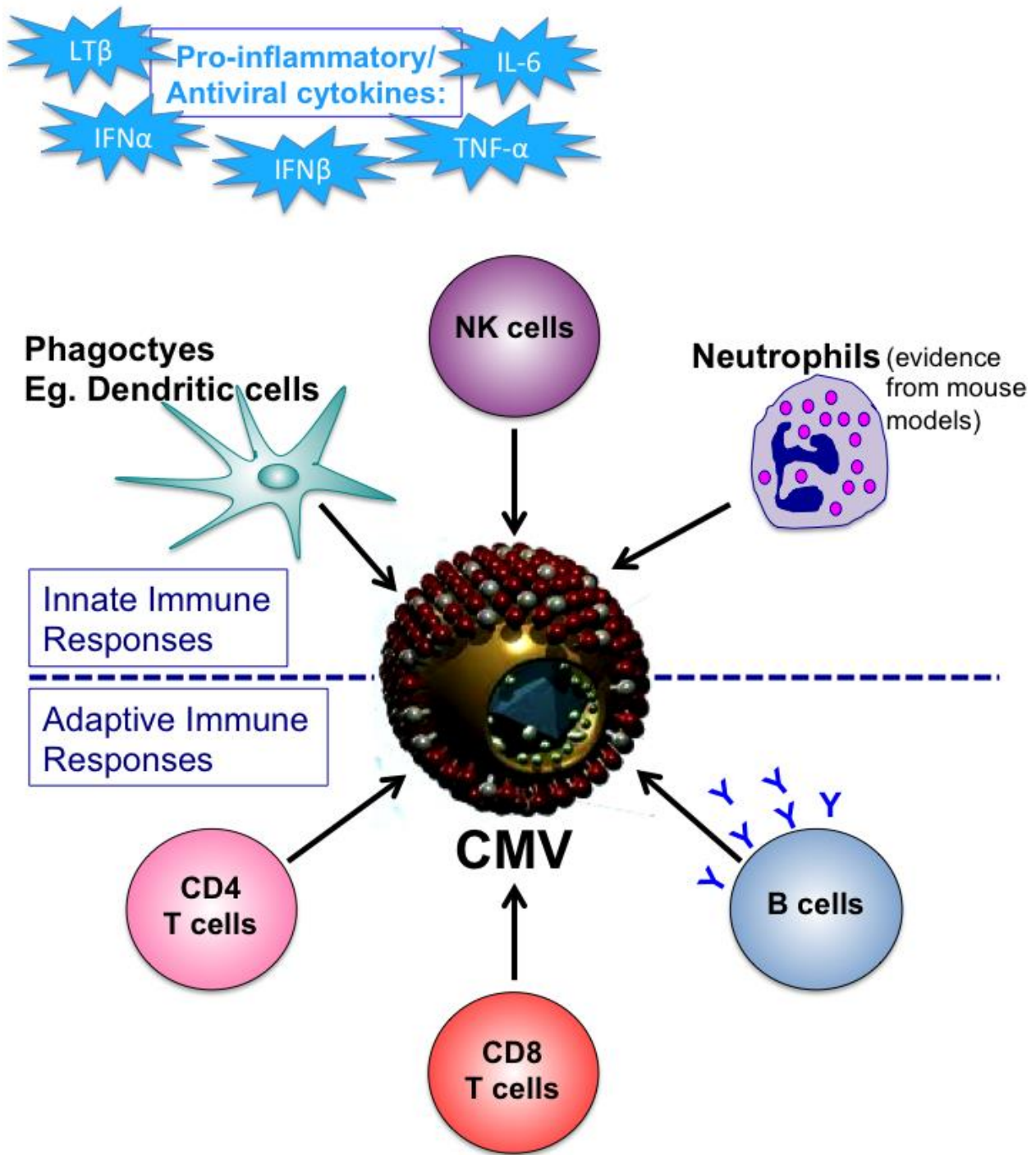


Схема 2. Телије имунског система укључене у одбрану од цитомегаловируса. Преузето из Human Cytomegalovirus (HCMV). Stack G, Stacey M. Cardiff University, UK. British Society for Immunology

Утврђене су значајне разлике у имунском одговору на МСМV у зависности од соја мишева. Тако, код C57BL/6 мишева у контроли инфекције кључну улогу играју механизми неспецифичне имуности тј. NK ћелије, док код BALB/c мишева ту улогу имају цитотоксички Т лимфоцити. Заправо, код C57BL/6 мишева молекула m157, који кодира вирус, активира NK ћелије кроз интеракцију са молекулом Ly49H. NK ћелије BALB/c мишева немају Ly49H па изостаје Ly49H/m157-NK интеракција тако да је клиренс вируса посредован цитотоксичким Т лимфоцитима. Пошто се интеракција Цитомегаловируса са молекулом Ly49H значајно одражава на имунски одговор, тиме се и објашњава разлика у осетљивости BALB/c мишева и резистенцији C57BL/6 мишева на МСМV (239), Ово је потврђено и налазом да деплеција Ly49H укида резистенцију на вирус код C57BL/6 мишева. У терминацији продуктивне и успостављању латентне инфекције учествују Т лимфоцити. CD8⁺ и NK ћелије су независно одговорне за клиренс вируса али су за контролу инфекције задужени CD8⁺ Т лимфоцити. Кључна карактеристика инфекције Цитомегаловирусом је одржавање велике популације меморијских вирус специфичних CD8⁺ Т лимфоцита која је са годинама све већа (меморијска инфлација), односно све већи број Т лимфоцита је специфичан за овај вирус чиме се објашњава неадекватан имунски одговор на друге стимулусе у популацији старијих особа (240). Ове меморијске ћелије пролиферишу захваљујући честим субклиничким реактивацијама вируса и задржавају ефекторске функције, експримирају перфорин и гранзим и хемокински рецептор CX3CR1 (241). Акумулирају се у слезини, јетри, плућима и крви. CD8⁺ Т лимфоцити само одређених специфичности континуирано пролиферишу тако да код мишева годину дана по инфекцији 20% свих CD8⁺ Т лимфоцита је специфично за епитоп вируса pp89.

Мишеви којима су моноклонским антителима деплетирани CD8⁺Т лимфоцити развијају имунске ефекторске функције и елиминишу вирус из ткива сличном кинетиком као и нормални мишеви (242, 243). Овај налаз указује да CD4⁺Т лимфоцити могу да преузму контролу над вирусном инфекцијом. Вирус специфичне CD4⁺Т ћелије које настају након инфекције Цитомегаловирусом CD8⁺Т дефицијентних мишева имају протективну улогу и након трансфера у летално инфициране реципијенте (243). У случају уклањања CD8⁺Т лимфоцита и макрофаги учествују у ограничавању ширења вируса, што све заједно указује на способност имунског система да компензује мањак функције ефекторских CD8⁺Т лимфоцита. Међутим неке функције CD4⁺Т лимфоцита не могу да се компензују. Мишеви

којима су уклоњени CD4+T лимфоцити не могу да елиминишу вирус из пљувачних жлезда упркос јаком инфлуксу CD8+T ћелија у жлезде. Код ових мишева је вирус локализован у ацинусаним glandуларним епителним ћелијама и детектује се огромна продукција вируса (244).

Закључује се да су CD4+T лимфоцити есенцијални за ограничавање репликације вируса и превенцију хоризонталне трансмисије инфекције, иако CD8+T лимфоцити имају главну протективну улогу у инфекцији Цитомегаловирусом. Важно је и то да CD4+T лимфоцити не могу да компензују губитак CD8+T лимфоцита ни да превенирају оштећење органа код инфицираних BALB/c мишева у случају сингене трансплантације костне сржи (245, 246).

1.3.4. Имуни одговор у ЦНС-у на инфекцију цитомегаловирусом

Инфекција ЦНС-а Цитомегаловирусом је удружена са снажним инфламацијским одговором којег карактерише активација резидентних ћелија имуног система, регрутовање активираних ћелија са периферије, као и продукција великог броја проинфламацијских цитокина (218, 247-249).

Интракранијална апликација Цитомегаловируса код новорођених мишева стимулише експресију гена за IFN- γ који редукује број ћелија инфицираних вирусом и спречава ћелијску смрт посредовану вирусом (250). Глијалне ћелије одговарају на MCMV инфекцију продукцијом бројних цитокина и хемокина (205). Ћелије микроглије продукују TNF- α и IFN- γ који инхибишу репликацију MCMV-а у астроцитима и то тако што супримирају вирусну транскрипцију (251). Вирусом инфицирани астроцити примарно продукују CCL2, а мање CXCL8, CCL3, CCL5 који регрутују ћелије микроглије на место инфекције (252) (253). Акутни цитокински одговор је регулисан антиинфламацијским цитокином интерлеукином-10 (254). У случају неадекватне продукције IL-10 поремећен је антивирусни одговор, прејак је ефекат IFN- γ , а инфекција MCMV-ом постаје летална (254). HCMV садржи ген који кодира молекул идентичан IL-10 који инхибише продукцију хемокина CXCL10 у ћелијама микроглије што последично инхибише миграцију лимфоцита (253) (255). Такав хомолог није идентификован у геному мишијег Цитомегаловируса, али MCMV индукује снажну продукцију IL-10 у различитим ћелијама имуног система (217, 254).

Продукцији цитокина и хемокина у ЦНС-у претходи инфлуке системских ћелија имунског система. Рани имунски одговор одликује улазак макрофага, неутрофила и НК ћелија у ЦНС (2010, 218, 248). Макрофаги (CD45^{hi}CD11b⁺) који инфилтришу мозак у одговору на инфекцију MCMV, се активирају и повећавају експресију молекула II класе MHC, CD40, CD80 (248). Такође продукују NO који доприноси елиминацији вируса. Познато је да неутрофили поред улоге коју умају у елиминацији бактерија учествују и у антивирусном одговору (256). Инфекција ЦНС-а Цитомегаловирусом је праћена ослобађањем CCL2 из ћелија микроглије што регрутује велики број неутрофила у ЦНС где доприноси елиминацији вируса. Али ако изостане продукција IL-10 накупљени неутрофили могу значајно да оштете ткиво (218, 257).

НК ћелије се појављују у мозгу у исто време када и вирус, а осмог дана по инфекцији вирусом чине више од 20% укупних леукоцита у мозгу, када њихов проценат нагло опадне, а пристижу друге ћелије тако да већ десетог дана од инфекције НК ћелије чине само један проценат тоталних леукоцита (217).

Клиренс вируса из мозга новорођених мишева зависи од стеченог имунског одговора (248), (258). Акутну инфекцију ЦНС-а контролишу CD8+T лимфоцити који уједно спречавају и летални исход. CD8+T лимфоцити чине доминантну популацију моноклеарних ћелија у ЦНС-у (248). Највећи проценат CD8+T лимфоцита у мозгу се уочава 18 дана после инфекције, када чине више од 70% ћелија (CD45^{hi}) које су са периферије инфилтрисале мозак (248). Пораст инфилтришућих CD8+T лимфоцита корелира са смањењем титра вируса што указује на критичну улогу CD8+T лимфоцита у елиминацији MCMV инфекције из ЦНС-а (248). Иначе, у ЦНС-у се највећи број комплетних вируса уочава од 10 до 14 дана после инфекције, али већ од 21. дана се више не детектују. У време максималног инфлука CD8+T лимфоцита 10% ових ћелија је специфично за епитоп вируса IE1 (248). CD8+T лимфоцити перзистирају у мозгу дуго по резолуцији продуктивне MCMV инфекције и детектују се и после годину дана (217). Ови CD8+T лимфоцити имају ефекторско меморијски фенотип са повећаном експресијом CD44 и одсуством CD62L (2010, 248). Знатан број инфилтришућих CD8+T ћелија експримира CD69, CD49 што указује да су активирани (210, 248).

CD8+T лимфоцити контролишу инфекцију продукцијом перфорина, IFN- γ и TNF- α ; а знатан проценат ових ћелија које секретују IFN- γ нема способност дегранулације што

указује на потенцијалне нецитолитичке механизме којима се вирус елиминише (248). Пошто вирус инфицира различите ћелије (неуроне, прогениторске ћелије, астроците, микроглију) могуће је да клиренс вируса из ЦНС-а укључује више антивирусних ефекторских функција и да зависи од типа ћелије.

Одговор CD4+T лимфоцита у ЦНС-у је релативно константан у поређењу са CD8+T лимфоцитима (248). CD4+T лимфоцити су неопходни за резолуцију продуктивне вирусне инфекције у пљувачним жлездама, али адаптивни трансфер CD4+T ћелија не штити од системске или инфекције ЦНС-а (258-260). Могуће је да у ЦНС-у CD4+T лимфоцити подстичу функције CD8+T ћелија (261, 262).

1.3.5. Модулација имунског одговора цитомегаловирусом

CMV има велики геном који кодира бројне имуномодулаторне молекуле и тако омогућује сопствено преживљавање и латенцију у ћелијама домаћина, при чему вирус избегава уништење.

CMV кодира молекуле којима блокира приказивање антигена у склопу I класе МНС. Блокадом приказивања вирусних антигена вирус остаје сакривен од ћелија имунског система. Вирус кодира бројне молекуле који имају имуномодулаторне карактеристике. Антиинфламацијско дејство остварује продукцијом IL-10 (263). Синтезом молекула CCL2 привлачи мијелоидне ћелије за које је показано да су у вирусној инфекцији регулаторне односно да атенуишу имунски одговор, али ове ћелије могу да буду и проинфламацијске у зависности од средине (236).

Са друге стране, CMV кодира и молекуле који могу да подстакну имунски одговор, попут хемокина CXCL10 који привлачи Th1 проинфламацијске лимфоците, чиме вирус промовише проинфламацијско стање.

С обзиром да CMV на разне начине утиче на имунски одговор домаћина, могуће је и да утиче на патогенезу MS.

1.4. Могући начини утицаја CMV на патогенезу аутоимунских болести

Постоји неколико механизма који описују улогу вируса у патогенези аутоимунских болести.

1.4.1. Молекулска мимикрија

Микроорганизми који имају епитопе сличне епитопима аутоантигена могу директно да активирају аутореактивне лимфоците (264). Описани су бројни епитопи вируса који унакрсно реагују са протеинима домаћина (264). Скоро четири процента моноклонских антитела специфичних за вирусне антигене реагују и са сопственим протеинима (265). Такође показано је да вирусни пептиди могу да активирају аутореактивне Т лимфоците специфичне за МВР (266). Слично, МВР специфични Т лимфоцити реагују са различитим вирусним и бактеријским протеинима (267). На основу наведеног се закључује да је унакрсни имунски одговор на антигене вируса и домаћина релативно чест.

Описује се и одложена молекулска мимикрија као варијација молекулске мимикрије која настаје када латентна хронична инфекција индукује развој дугоживећих меморијских лимфоцита специфичних за вирус, који онда чине знатан део имунског репертоара. Овакви лимфоцити могу касније да се реактивирају у сусрету са антигенима сличних епитопа који су их активирали, а који могу да буду и аутоантигени који се ослобађају из оштећеног ткива. Скоро свака особа има одређен проценат оваквих (меморијских вирус специфичних) лимфоцита који се у случају оштећења ткива и ослобађања аутоантигена активирају.

1.4.2. Посматрачка активација

Цитокини које продукују ћелије имунског система заражене или активирани вирусом могу да подстакну активацију аутореактивних Т лимфоцита који су се задесили у њиховој близини. Такође оштећење ткива које узрокује вирусна инфекција изазива ослобађање криптичних епитопа који могу бити аутоантигени, а који нису били доступни имунском систему у току процеса сазревања (268, 269). Тако се покреће активација и клонска експанзија аутореактивних Т лимфоцита што резултује настанком аутоимунске болести

(270). Суперантигени микроорганизама могу да изазову поликлонску активацију лимфоцита што може да резултује развојем аутоимунске болести.

Мек Кој је увео теорију која комбинује претходне две хипотезе. Могуће је да вирусни епитопи унакрсно реагују са сопственим антигенима тј. постоји молекулска мимикрија. Тако се на неки начин активира процес код генски осетљивих особа и настају потенцијално аутореактивни лимфоцити. После тога додатни неспецифични имунски стимулус изазове продукцију инфламацијских цитокина који онда процесом посматрачке активације подстакну даљу активацију претходно активираних лимфоцита и развија се аутоимунска болест (271).

1.4.3. Ширење епитопа

После иницијалне реакције имунског система на патогене, из насталих лезија се ослобађају аутоантигени у проинфламацијској средини па је могућа активација аутореактивних Т лимфоцита (272, 273). Временом се ослобађања све више аутоантигена који активирају нове лимфоците што подстиче континуирану инфламацију и настанак хроничне аутоимунске болести (274). Могуће је да се молекулска мимикрија дешава рано у току настанка аутоимунске болести док се посматрачка активација и ширење епитопа касније, чиме се погоршава аутоимунски процес (270).

Фуцинами је у покушају да објасни улогу микроорганизама у развоју аутоимунских болести увео хипотезу тзв. „плодног поља“. Плодно поље формирају активирани аутореактивни Т лимфоцити чија је активација покренута вирусном инфекцијом, а касније инфекције индукцијом инфламацијске средине подстичу реактивацију и експанзију ових ћелија чиме започне оштећење сопственог ткива (275).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога инфекције MCMV-ом у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса изазваног имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅. У складу са овим циљем, испитаће се ефекат претходне непродуктивне инфекције MCMV-ом на развој EAE у резистентним BALB/c мишевима.

Ефекат инфекције MCMV-ом на патогенезу EAE биће евалуиран на основу следећих параметара:

1. Процене клиничког и хистолошког скорa, као и анализе инфилтрата у мозгу и кичменој мождини BALB/c мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ после неонаталне и дуготрајне хроничне непродуктивне инфекције MCMV-ом.
2. Анализе продукције инфламацијских цитокина и експресије Th1/Th17 транскрипционих фактора и хемокинских рецептора у Т лимфоцитима који инфилтришу ткиво централног нервног система.
3. Анализе фенотипских карактеристика CD8⁺T лимфоцита у инфилтратима ткива централног нервног система.
4. Детекције лимфоцита специфичних за MOG₃₅₋₅₅ у ЦНС-у мишева који су развили клиничке и хистолошке карактеристике EAE после инфекције вирусом и имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅.
5. Анализе фенотипских карактеристика CD4⁺ и CD8⁺T лимфоцита у ингвиналним лимфним чворовима.
6. Анализе мембранских и функционалних маркера ћелија које приказују антигене у ЦНС-у и регионалном лимфном чвору.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Експерименталне животиње

У овом истраживању као експерименталне животиње коришћени су мишеви чистог соја BALB/с женског пола, новорођени мишеви, мишеви старости од 8 до 10 недеља као и мишеви чистог соја C57BL/6 (енгл. *wild type*, WT) старости 8 до 10 недеља. Животиње су узгајане у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

3.2. Инфекција МСМV-ом

Мишеви су, у неонаталном моделу инфекције, инфицирани 6-12 сати по рођењу интраперитонеалном апликацијом 200PFU (*Plaque-Forming Units*) мишјег соја CMV, (MW97. 01) док је контролној групи апликовано 200 μ l фосфатног пуфера (PBS). У адултном моделу инфекције мишевима старим 8-10 недеља је субкутано у шапу апликовано 10⁵PFU истог соја вируса.

3.3. Индукција ЕАЕ

За индукцију ЕАЕ као антиген је коришћен хумани пептид MOG₃₅₋₅₅ (*Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States*). Пептид MOG₃₅₋₅₅ (секванца Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys) је растворен у PBS-у (енг. *Phosphate Buffered Saline*) у концентрацији 5mg/ml. Раствор је чуван на -20° C. За имунизацију је коришћена суспензија која се састоји од мешавине пептида MOG₃₅₋₅₅ и комплетног Фројндовога адјуванса, CFA (*Complete Freund Adjuvant; Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States*) у односу 1:1, добијена мешањем MOG₃₅₋₅₅ пептида са адјувансом. Сваки миш је примио 300 μ g пептида MOG₃₅₋₅₅ у 100 μ l PBS-а и 100 μ l CFA са 700 μ g *Mycobacterium tuberculosis* (сој H37 RA; *Difco Laboratories, Detroit, MI*), укупно 200 μ l суспензије, која је апликована субкутано у пределу бокова. Мишевима је истога дана интраперитонеално апликовано 300ng токсина пертусиса (*List Biological Laboratories, Inc.® Campbell,*

California, United States) раствореног у 100µl дестиловане воде. Токсин пертусиса је чуван у раствору 50µg/ml у дестилованој води на температури од +4° С. Након 48 сати од прве апликације токсина пертусиса, мишеви су интраперитонеално добили још једну дозу токсина пертусиса.

3.4. Праћење клиничког тока ЕАЕ

Животиње су посматране свакодневно, а дан када се испољила парцијална парализа репа означен је клиничким почетком болести. У процени клиничких знакова ЕАЕ коришћени су следећи критеријуми: 0-одсуство клиничких манифестација болести; 0.5-парцијална парализа репа; 1-парализа репа; 2-атаксија или пареза задњих екстремитета; 2.5-једна задња нога парализована; 3-обе задње ноге парализоване; 3.5 парализа задњих ногу и пареза предњих ногу, или парализа 3 екстремитета; 4-парализа сва 4 екстремитета; 5-смрт. За процену клиничког скорa је коришћена класификација приказана на табели 1.

3.5. Хистопатолошка анализа ткива мозга и кичмене мождине

Мишеви су жртвовани, у време максималног клиничког испољавања болести, цервикалном дислокацијом, а за хистопатолошку анализу су коришћена ткива мозга и кичмене мождине од којих су направљени парафински исечци.

3.5.1. Фиксација ткива

Фиксацијом ткива се зауставља ензимска разградња ткива коју изазивају аминоксидазе, карбоксипептидазе и други протеолитички ћелијски ензими и путрификација коју изазивају ензими сапрофитских бактерија. Циљ фиксације је, поред очувања стабилизације структурних протеина ћелије, и очување величине и морфологије ћелије, одржање локализације хемијских супстанци у ћелији у стању које је слично природном као и спречавање раста микроорганизама. Фиксацијом ткива се инактивишу ензими лизозома, спречава њихова дифузија, мења пропустљивост ћелијске мембране и тако утиче на функционално стање ћелије.

За фиксацију ткива за светлосну микроскопију најчешће се примењује хемијска фиксација употребом 4% неутралног пуферисаног формалдехида (формалина) или Буеновог фиксатива са пикринском киселином. У урађеним експериментима је за хистолошку

анализу коришћена техника парафинских резова. По уклањању мозга и кичмене мождине ткиво је фиксирано у 4% параформалдехиду који се прави од фабричког *Formaldehydum sol.* (НСНО 37-40% конц.). Фиксацијом ткива се мења конформација протеина, настају метиленски мостови између карбонилне групе формалдехида и амино група бочних ланаца протеина. Сваки узорак ткива се потапа у фиксатив на собној температури у трајању од најмање 24 сата.

3.5.2. Обрада ткива

Након фиксације ткива у формалину, ткиво се испира у води а потом дехидратише. Дехидратација је процес уклањања воде из ткива да би парафин могао да продре у ткиво. Како се ткиво не би оштетило, неопходно је да поступак дехидратације буде поступан што подразумева процес преношења ткива кроз растуће концентрације етанола; 70%, 96% и 100% . Ткиво се пре урањања у алкохол испира текућом водом.

3.5.3. Просветљавање ткива

Пошто је парафин који се користи за калупљење препарата нерастворљив у води и алкохолу, ткиво мора да се изложи универзалном растварачу који се меша са парафином и алкохолом и омогућава улазак парафина у ткиво и истискивање етил алкохола из ткива. Овде је употребљаван ксилол, који има особину да учини ткиво прозирним па се отуда ова фаза у припреми ткива назива „просветљавање“.

Табела 1

Оцена	Клинички знак	Метода за детекцију	Опис
0	Нема клиничких знакова	Ухватити миша за базу репа и дотаћи врх репа цилиндричним предметом; посматрати ход	Задње ноге су у екстензији, реп се покреће; реп се уврће око цилиндричног предмета, нормалан ход
0,5	Парцијална парализа репа	Ухватити миша за базу репа и дотаћи врх репа цилиндричним предметом; посматрати ход	Задње ноге су у екстензији, врх репа пада и/или се реп не уврће око цилиндричног предмета, нормалан ход
1	Парализа репа	Ухватити миша за базу репа и дотаћи врх репа цилиндричним предметом; посматрати ход	Задње ноге су у екстензији, реп пада и не уврће се око цилиндричног предмета, нормалан ход
2	Губитак координисаних покрета, пареза задњих екстремитета	Ухватити миша за базу репа; посматрати ход, испитати плантарне рефлексе	Задње ноге се контрахују када се миш ухвати за базу репа, покрети при ходању су некоординисани, јављају се рефлекси када се шапе дотакну предметом, парализа репа
2,5	Парализа једног задњег екстремитета	Ухватити миша за базу репа; посматрати ход, испитати плантарне рефлексе	Миш вуче једну задњу ногу, не јавља се плантарни рефлекс једне шапе, парализа репа
3	Обе задње ноге парализоване	Ухватити миша за базу репа; посматрати ход, испитати плантарне рефлексе	Миш вуче обе задње ноге, не јављају се плантарни рефлекс на обе шапе, парализа репа
3,5	Парализа обе задње ноге, слабост предњих ногу	Ухватити миша за базу репа; посматрати ход, испитати плантарне рефлексе	Миш вуче обе задње ноге, слабо користи предње ноге приликом кретања, предње шапе имају позитивне плантарне рефлексе, парализа репа
4	Предње ноге су парализоване	Ухватити миша за базу репа; посматрати ход, испитати плантарне рефлексе	Миш не може да се покреће, одсутни су плантарни рефлекс и на предњим шапама, парализа репа
5	Смрт		Нема покретања, хладан је на додир, нема дисања

3.5.4. Калупљење ткива

Како би ткиво могло да се изреже, треба га прожети парафином. Парафин се топи на 58-60 степени целзијуса, док је на собној температури чврст и кристалан. Течни парафин прожима ткиво без топлотног и хемијског оштећења. Стога је ткиво калупљено у парафину потапањем у растуће концентрације парафина (3 пута по 1 сат) на температури око 60°C у термостату. На тај начин се ксилол у ткиву поступно замењује парафином. Парафином импрегнирано ткиво је калупљено у парафински блок за који је коришћена пластична касета у којој је ткиво било дехидрирано. Ткиво је утиснуто на дно металне кадице напуњене мешавином воска и парафина и потом поклопљено пластичном касетом.

Калупи су сечени микротомом на резове дебљине 5µм. Изрезани пресек је узиман четкицом и стављан у топло водено купатило на 45°C. Температура воде омекша парафин тако да се пресеци изравнају. Исечци су са површине воде скупљани предметним стаклима, која су се затим сушила 12 сати у термостату на 56°C.

3.5.5. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

По загревању парафинских исечака у термостату на 56°C које је трајало 45 минута, како би се уклонио парафин исечци су потопљени у ксилол. Потом је урађена рехидратација ткива процесом испирања у опадајућим концентрацијама етил алкохола и то: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу; 5 минута у 96% алкохолу; 5 минута у 90% алкохолу; 5 минута у 70% алкохолу; 5 минута у дестилованој води. Након тога препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у трајању од 10 минута, а потом испрани прво дестилованом па текућом водом 5 минута. Потом је урађено бојење алкохолним еозином (*Sigma Aldrich*) у трајању од два минута. Након бојења исечци су дехидрирани тако што су потапани у серију растућих концентрација етил алкохола и то следећим редом: најпре 5 минута у 70%-тном алкохолу, затим 5 минута у 90%-тном алкохолу и на крају два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидрације, уследио је поступак просветљавања потапањем у мешавину ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1 у трајању од једног минута, а затим два пута по један минут само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (*Centrohem, Србија*) и препарати су прекривени покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су

након 24-часовног сушења анализирани светлосном микроскопијом (увеличање 10x и 40x, *BX51, Olympus, Japan*).

3.6. Процена хистолошког скорa

Вредност хистолошког скорa је анализирана према следећим критеријумима: 0, нема инфилтришућих ћелија; 1, неколико разбацаних инфилтришућих ћелија; 2, периваскуларно груписање инфилтришућих ћелија; 3, интензивна периваскуларна инфилтрација са ширењем у субарахноидални простор или паренхим ЦНС-а; 4, интензивна периваскуларна инфилтрација са интензивним субарахноидалним или паренхимским инфилтратом.

3.7. Изолација леукоцита из ЦНС-а

Ткиво мозга и кичмене мождине је екстирпитано, исецкано и хомогенизовано ензимском дигестијом, једночасовном инкубацијом на 37°C у 5ml RPMI 1640 медијуму са 10% FBS-а и 1mg/ml колагеназе тип I и 1mg/ml DNA-зе, све *Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States*. У току инкубације ткиво је, да би се хомогенизовало, више пута провучено кроз шприц са иглом дебљине 18G. Након инкубације хомогенизовано ткиво је пропуштено кроз ћелијско сито са порама величине 40µm (cell strainer, 40 µm, BD Pharmingen, USA), и сито је испрано са још 5ml медијума. Тако добијена суспензија је центрифугирана 10 минута на 400G и талог је ресуспендован у 10ml 30% перкола (*Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States*), који је пребачен на 5ml 70% перкола и центрифугиран на 390G 20 минута. По завршеној инкубацији је са врха уклоњен слој издвојеног мијелина и Пастеровом пипетом су покупљене моноклеарне ћелије које се налазе у интерфази. Прикупљене ћелије су опране два пута у PBS-у и на крају ресуспендоване у комплетном медијуму. Након изолације је приликом бројања одређивана вијабилност ћелија помоћу бојења трипан плавим.

3.8. Изолација леукоцита из лимфног чвора

BALB/c мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом и ингвинални лимфни чворови су екстирпирани и неколико пута испрани медијумом како би се уклонио CFA. Тако испрани лимфни чворови су пропуштени клипом шприца кроз ћелијско сито (cell strainer, 40 µm, BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50ml уз додавање 10ml медијума (RPMI-1640; Sigma-Aldrich, Germany) са додатком 10% FBS-а (Sigma-Aldrich, Germany), 100U/mL

пеницилина (Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States), 100µg/mL стрептоцимина (Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States), 4mM L-глутамина (Invitrogen Saint Aubin, France) и 50µM 2-меркаптоетанола (Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States). Овако раздвојене појединачне ћелије су центрифугиране 5 минута на 400G. Супернатант је одливен, а ћелијски талог је ресуспендован у комплетном медијуму RPMI 1640 са 10% FBS.

3.9. Анализа популација моноклеарних ћелија ЦНС-а и дренирајућег лимфног чвора проточном цитометријом

Инфилтрати изоловани из мозга и кичмене мождине и моноклеарне суспензије изоловане из дренирајућих ингвиналних лимфних чворова су анализирани проточном цитометријом. Анализирана је процентуална заступљеност појединих популација ћелија и функционални фенотип Т лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија.

3.9.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација моноклеарних ћелија лимфног чвора и инфилтрата ЦНС-а коришћена су анти-мишја моноклонска антитела специфична за различите мембранске и интрацелуларне молекуле, обележена различитим флуоресцентним бојама. У свакој од анализа је коришћено 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; *BD Biosciences*) и додата је одговарајућа количина моноклонских антитела примарно обележених различитим флуоресцентним бојама. Испитиване моноклеарне суспензије су такође инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама.

Антитела коришћена за површинско бојење, као и изотипске контроле, били су у концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији буду 1:200. Талог ћелија са антителима је краткотрајно вортексован и потом инкубиран у мраку на температури од +4°C у трајању 20 минута. По истеку инкубације, додавањем два ml хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, *BD*) ћелије су "опране" и центрифугиране 5 минута на 400G. Затим је супернатант одливен и талог ћелија је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur* (BD). За цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у

FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo (Tree Star Ashland, OR, USA)* софтвера.

3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина

Бојење интрацелуларних цитокина урађено је по BD *Cytofix/Cytoperm*TM методи. да би се детектовале ћелија које продукују цитокине, коришћене су различите *in vitro* методе за стимулацију ћелија. Од поликлонских активатора се користе: конканавалин А (Con-A), стафилококни ентеротоксин β, липополисахарид (LPS), фитохемаглутинин, моноклонска антитела специфична за TCR/CD3 комплекс (са или без антитела на костимулаторне рецепторе, као што је CD28) и естри форбола са калцијум јонофором (енгл. *phorbol esters plus calcium ionophore*). Ћелије су у овом истраживању стимулисане форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma*) и јономицином (енгл. *Ionomycin; Sigma*), који покрећу активност протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C, PKC*) као и инфлукс јона калцијума у ћелију, индукујући експресију цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима. Инкубација у трајању од четири до 6 сати је оптимално време за већину цитокина, пошто је продужена инкубација удружена са појавом цитотоксичких ефеката поменутих активатора. BD *GolgyStop*TM (садржи моненсин) и BD *GolgyPlug*TM (садржи брефелдин А), као инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, су коришћени за *in vitro* стимулацију ћелија. Блокада транспорта у ћелији поменутих инхибиторима резултује акумулацијом већине цитокина у ендоплазматичном ретикулуму или Голџи апарату, што повећава могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Моненсин и брефелдин А су карактеристични по томе што имају дозно и временски зависан цитотоксички ефекат, па излагање ћелија овим агенсима мора да буде ограничено. Показано је да је инкубација дужа од 12 часова токсична за ћелије.

3.9.2.1. Стимулација ћелија

Суспензија појединачних моноклелера изолованих из мозга, кичмене мождине и регионалног лимфног чвора ($1 \times 10^6/\text{ml}$) припремљена у комплетном медијуму (RPMI 1640) је стимулирана инкубацијом на 37°C (5%CO₂) у присуству PMA (*Sigma*; 50ng/ml) и јонофора (*Ionomycin, Sigma*; 500ng/ml). У суспензију је додат и BD *GolgyStop*TM (0,7μl/ml) који блокира секрецију цитокина и повећава њихову интрацелуларну акумулацију. После 4 сата

инкубације, ћелије су опране и ресуспендоване у комплетном медијуму, а потом пребачене у пластичне епрувете (*FALCON round-bottom test tubes*, BD) за имунофлуоресцентно бојење. Даље процедуре су обављане на +4°C.

3.9.2.2. Бојење површинских антигена

Епитопи површинских маркера могу да се оштете фиксацијом и пермеабилитацијом, па се површинско бојење обавља пре фиксације ћелија. Тако је на 1×10^6 моноклеара ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додавана одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене. Ћелије су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела за површинско бојење коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења, у суспензији ћелија буду 1:200. Ћелије су инкубирани 30 минута на +4°C, у мраку.

3.9.2.3. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране.

Након инкубације са примарно конјугованим антителима за површинске антигене, моноклеари су опрани два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPermTM* раствора (BD *Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на +4°C. Затим су ћелије опране два пута у *Perm/WashTM* пуферу (BD *Pharmingen*; 1ml/епрувети; 300G).

3.9.2.4. Бојење интрацелуларних цитокина.

Ћелијски талог је ресуспендован у 50µl *Perm/WashTM* пуфера и додата су примарно конјугована моноклонска антитела специфична за цитокине. Сва антитела коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:200. Ћелије су инкубирани 30 минута на +4°C, у мраку. Након инкубације, ћелије су опране у *Perm/WashTM* пуферу (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo (Tree Star)* софтвера.

3.9.2.5. Интрацелуларно бојење транскрипционих фактора T-bet и RoRyt

Први корак у овој процедури је површинско бојење CD4 маркера: на 1×10^6 ћелија изолованих из испитиваног органа, ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, BD Pharmingen), додата је одговарајућа количина примарно обележеног анти-CD4 и анти-CD8 антитела у таквој концентрацији да је финално разблажење антитела у суспензији било 1:200. Ћелије су инкубирани 20 минута у мраку на температури од +4°C са поменутиим антителима, а такође и са одговарајућом изотипском контролом. Након инкубације ћелије су опране два пута у пуферу за бојење (2 ml/епрувети; 250G), а ћелијски талог је ресуспендован у 2ml хладног пуфера за фиксацију (енгл. *mouse Foxp3 Fixation Buffer*, BD Pharmingen) и инкубиран 30 минута на +4°C у мраку. Затим су ћелије опране два пута у пуферу за пермеабилizацију (енг. *mouse Foxp3 Permeabilization buffer*, BD Pharmingen), загрејаном до собне температуре (2ml/епрувети; 300G). Након уклањања супернатанта уследила је пермеабилizација ћелија у 2ml пуфера за пермеабилizацију, 30 минута у мраку на температури 37°C. По завршеној инкубацији ћелије су опране у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 300G). На крају је уследила инкубација са антителима за транскрипционе факторе која су претходно разблажена у пуферу за бојење да финално разблажење у суспензији ћелија буде 1:200. Након инкубације (20 минута у мраку на собној температури) ћелије су опране у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR*) софтвера.

3.10. Бојење тетрамерима

Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а према протоколу који је претходно описан и инкубирани са Н-2L(d)/IE-1/pp89 (168-176 YPHFMPTNL) и Н-2D(d)/m164 (257-265 AGPPRYSRI) тетрамерима (НИН) и анти-CD8 и анти-CD3 антителима у таквој концентрацији да је финално разблажење антитела у суспензији било 1:200. Ћелије су инкубирани 20 минута у мраку на собној температури. После 30 минута инкубације ћелије су опране у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Регистровано је најмање 20.000

догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR*) софтвера.

3.11. IFN- γ есеј (одређивање специфичности лимфоцита за пептид MOG₃₅₋₅₅)

Мононуклеарне ћелије изоловане из CNS-а (10^5 у $100\mu\text{L}$ комплетног медијума по отвору микротитар плоче) су *in vitro* стимулисане пептидом MOG₃₅₋₅₅ ($1\mu\text{g}$ по отвору) или вирусним пептидом pp89 и m164 у истој концентрацији. Након једночасовне инкубације са пептидима на 37°C , ћелијама је додато $0,2\mu\text{L}$ брефелдина А и инкубација је настављена на 37°C још 4 сата. Ћелије су након истека инкубације опране у пуферу за бојење и бојене анти-CD8 и анти-CD4 антителима на $+4^\circ\text{C}$ 15 минута. Након прања ћелије су фиксирани и пермабилозавани у Cytotfix/Cytoperm пуферу 30 минута на леду, опране два пута у пуферу за бојење и инкубирани са анти-IFN- γ и анти-IL-17 антителом раствореним у *Perm wash* пуферу 30 минута. Након инкубације ћелије су опране у пуферу за бојење, ћелијски талог је ресуспендован у $350\mu\text{l}$ пуфера и анализиран на проточном цитометру. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR*) софтвера. Анализиран је проценат CD4+IFN- γ +, CD8+IFN- γ +, CD4+IL-17+ и CD8+IL-17+ ћелија.

3.12. Имунохистохемија ткивних исечака кичмене мождине

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака кичмене мождине урађено је коришћењем мишијег специфичног конјугата (*Expose Rat-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) за бојење CD3 (*Abcam*). Депарафинизовани парафински исечци ткива кичмене мождине дебљине $5\mu\text{m}$ након рехидратације ткива, су најпре кувани 21 минут у 10mM Na-цитрату, а након хлађења интензивно испрани три пута у PBS-у. На ткивне исечке је потом додато 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block*-а са циљем да се инактивишу ендogene пероксидазе и након инкубације 10 минута на собној температури, препарати су два пута опрани у PBS-у. Затим је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block*-а који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS-у. На ткивне исечке су потом додато $150\mu\text{l}$ примарног антитела, пацовског анти-мишијег CD3 (*Abcam*). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Након једносатне инкубације са примарним антителима у влажној комори на собној температури, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у, ткивни исечци су инкубирани 30 минута на собној температури у присуству

биотинизованог секундарног антитета. Након инкубације, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у и на ткивне исечке је апликована *Streptavidin Peroxidase*-а. Након 10 минута инкубације са пероксидазом на собној температури исечци су испрани три пута по 5 минута у PBS-у и на њих је апликовано 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20 μ l DAB хромагена у 1ml DAB супстрат пуфера. Након развијања боје препарати су испрани три пута у дестилованој води и обојени хематоксилином по Mayer-у два минута, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени воденим медијумом за покривање и покровном лџуспицом. Хистолошки пресеци јетре визуелизовани су коришћењем и фотографисано је дигиталном камером на светлосном микроскопу (Olympus BX5).

3.13. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитана правилност расподеле добијених вредности. Уколико вредности имају правилну расподелу користили смо параметарски *Student's t* тест, док се неправилна расподела поредила коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста. Резултати експеримента су изражени као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

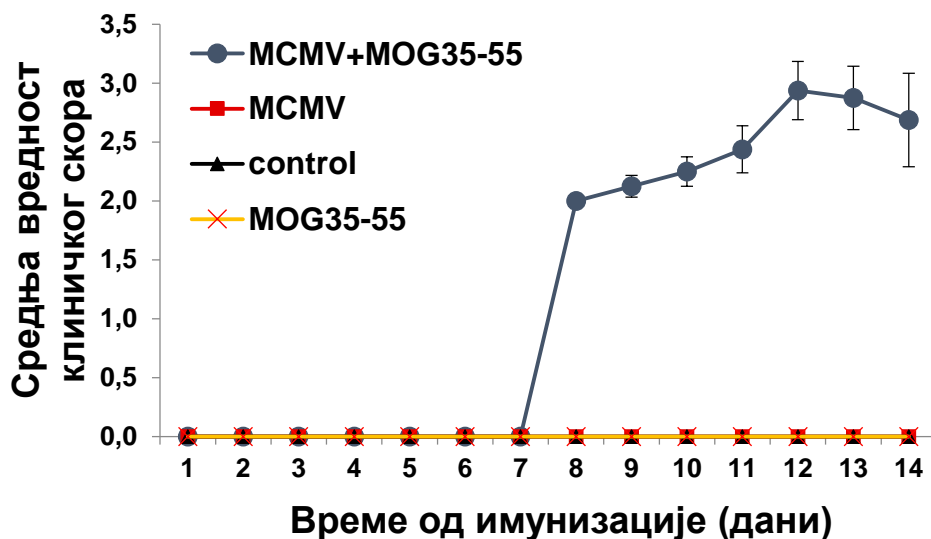
4.1. Инфекција МСМV-ом у неонаталном периоду повећава осетљивост BALB/c мишева на развој ЕАЕ

Интраутерусна инфекција хуманим CMV-ом се региструје у 0,4 до 2,3% живорођене деце (276). Око 25% овакве деце након 5 година испољава неки од неуролошких поремећаја, а десетак процената деце са доказаном интраутерусном инфекцијом цитомегаловирусом има тешке дуготрајне неуролошке секвеле психомоторне и когнитивне (277), што указује да релативно велики број деце са конгениталном CMV инфекцијом нема видљиве неуролошке поремећаје.

Енцефалитиси изазвани вирусом у неонаталном периоду су последица како директног цитопатогеног ефекта вируса тако и имунског оговора на вирусну инфекцију (278). Из јасних разлога већина закључака о утицају ове инфекције на мозак у развоју изведена је на основу проучавања експерименталних модела. Инфицирање мишева МСМV-ом првог дана живота користи се као модел перинаталне инфекције ЦНС-а код људи. Овако инфицирани мишеви развијају виремију и продуктивну инфекцију више органа коју прати јак инфламацијски одговор. Продуктивну инфекцију централног нервног система МСМV-ом карактерише мултифокални ненекротизујући енцефалитис са значајним развојем инфламације и поремећејем у развоју церебелума, али без видљивих неуролошких поремећаја у одраслом добу.

Како би се испитао могући утицај неонаталне инфламације, услед инфекције ЦНС-а цитомегаловирусом, на развој аутоимунске неуроинфламације коришћени су BALB/c мишеви. Овај сој мишева је резистентан на индукцију ЕАЕ пептидом MOG₃₅₋₅₅. Животиње су инфициране МСМV-ом у прва 24 сата по рођењу, а у 8. недељи живота имунизоване пептидом MOG₃₅₋₅₅ у комплетном адјувансу. Ова група мишева (МСМV+MOG₃₅₋₅₅) је развила клиничке знаке болести (Графикон 1), слично скору који се виђа код C57BL/6 соја мишева који су иначе осетљиви на индукцију ЕАЕ. Као контролне животиње су коришћени BALB/c мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ али без претходне инфекције вирусом, као и мишеви инфицирани вирусом и нетретиране животиње. Ниједна од контролних група мишева није развила болест (Графикон 1).

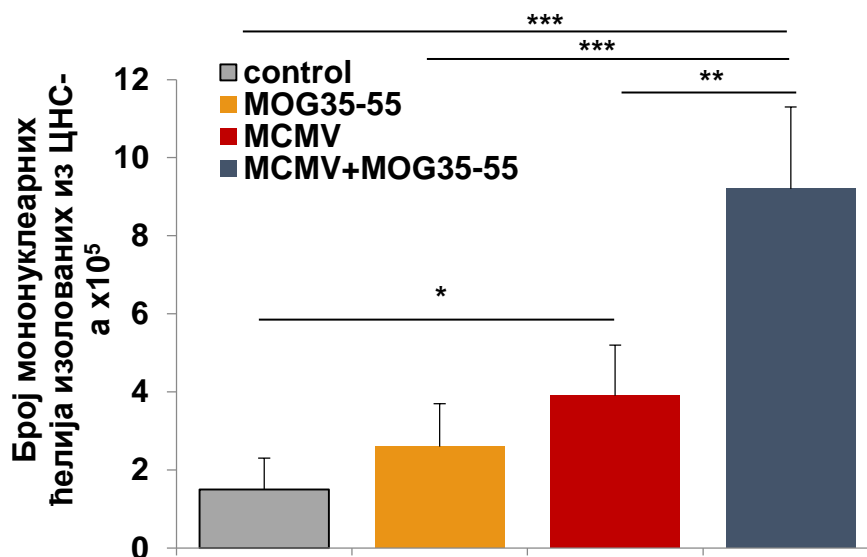
Графикон 1



Графикон 1. Неонатална MCMV инфекција повећава осетљивост BALB/c мишева на индукцију EAE имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅. BALB/c мишеви су инфицирани интраперитонеалним апликовањем 200 PFU MCMV-а у шапу и и осам недеља касније имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у CFA и пертусис токсиним (MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Контролне групе су биле: нетретирани мишеви, мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ али без претходне вирусне инфекције и мишеви са неонаталном MCMV инфекцијом без MOG₃₅₋₅₅ имунизације (MCMV). (A) Клинички скор је приказан као средња вредност + SE два независна експеримента са укупно 13 мишева по групи.

Анализа броја мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а испитиваних група мишева је потврдила налазе клиничког скорa. Број мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а обе групе вирусом инфицираних мишева је значајно већи у поређењу са бројем ћелија изолованих из ЦНС-а нетретираних мишева. Нема разлике у броју изолованих ћелија између групе нетретираних мишева и мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 2). Статистички значајно већи број мононуклеарних ћелија изолован је из групе мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (MCMV+MOG₃₅₋₅₅), него из ЦНС-а нетретираних, имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ ($p < 0.001$) и само инфицираних MCMV мишева ($p < 0.05$) (Графикон 2).

Графикон 2

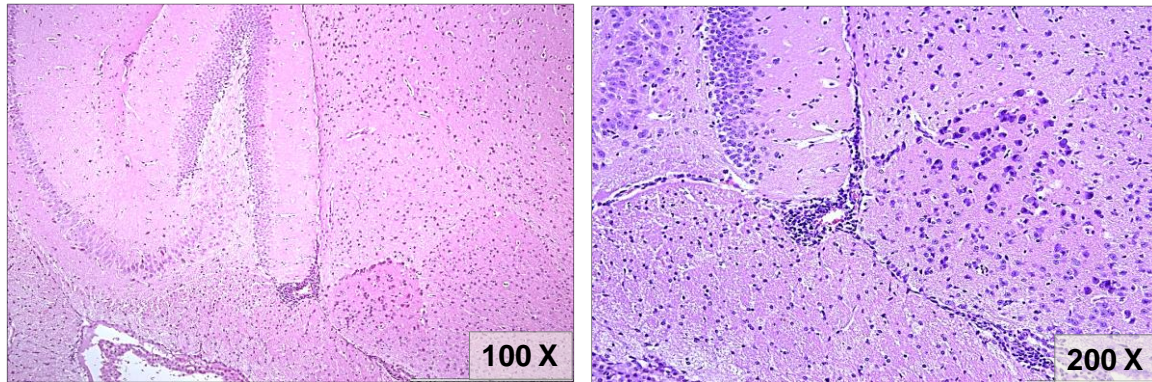


Графикон 2. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду и касније имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан број мононуклеарних ћелија. BALB/c мишеви су инфицирани интраперитонеалним апликовањем 200 PFU MCMV-а у шапу и и осам недеља касније имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у CFA и пертусис токсиним (MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Контролне групе су биле: нетретирани мишеви, мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ без претходне вирусне инфекције и мишеви са неонаталном инфекцијом MCMV без MOG₃₅₋₅₅ имунизације (MCMV). Приказана је средња вредност броја мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ (репрезентативни експеримент, n = 8/групи). Статистичка значајност разлике броја изолованих ћелија између наведених група мишева је одређена Student-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.005 и ***P<0.001.

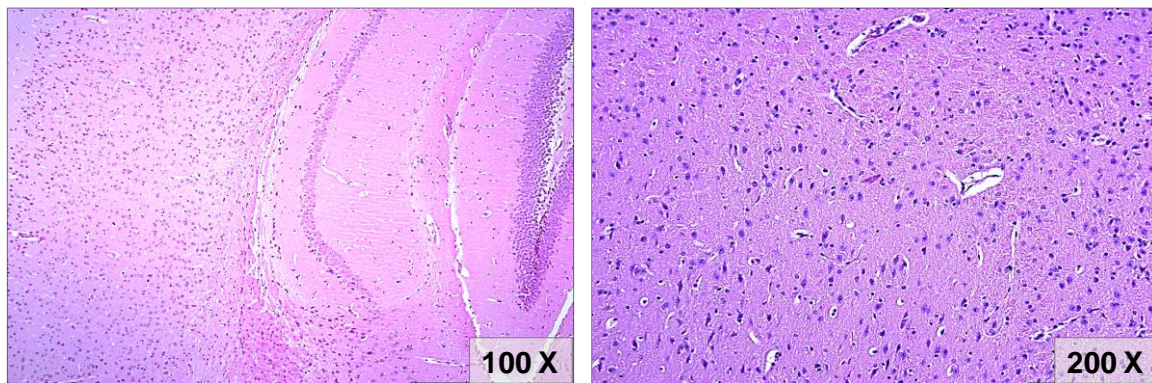
Хистолошка анализа препарата мозга експерименталних животиња показује да су у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева присутни веома изражени периваскуларни инфилтрати са ширењем у паренхим док су у групи MOG₃₅₋₅₅ мишева присутни само појединачни расути лимфоцити (Слика 1).

Слика 1

MCMV+MOG₃₅₋₅₅



MCMV

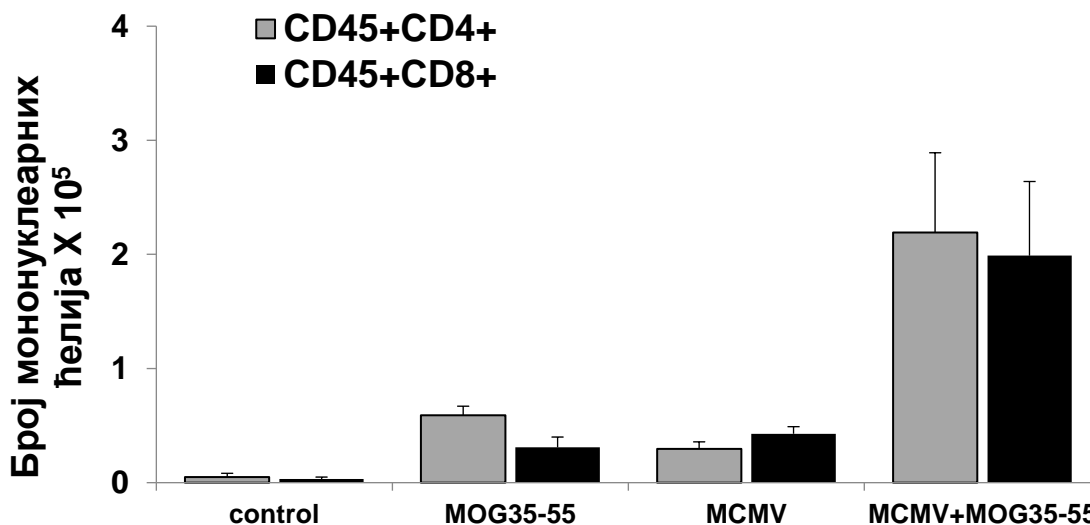


Слика 1. Интензивни периваскуларни инфилтрати са ширењем у паренхим мозга у групи BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду и касније имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Приказани су репрезентативни примери хистологије паренхима мозга групе MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и MOG₃₅₋₅₅ мишева. Ткиво мозга је екстирпирано 15 дана после имунизације MOG₃₅₋₅₅ пептидом и исечци дебљине 5 μ m су обојени техником хематоксилин-еозин.

4.1.1. BALB/c мишеви инфицирани неонатално MCMV-ом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у адултном добу развијају инфилtrate у ЦНС-у у којима су подједнако заступљени CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити

У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних неонатално MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ детектован је приближно исти број CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, што је различито од односа ове две популације ћелија у групи мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ где су CD4⁺ Т лимфоцити заступљени у двоструко већем броју, а из литературе је познато да је овакав однос 2:1 у корист CD4⁺ Т лимфоцита присутан и у ЦНС-у C57BL/6 мишева имунизованих енцефалитогеном. У ЦНС-у мишева само инфицираних MCMV-ом, у неонаталном добу, провлађују CD8⁺ лимфоцити (Графикон 3).

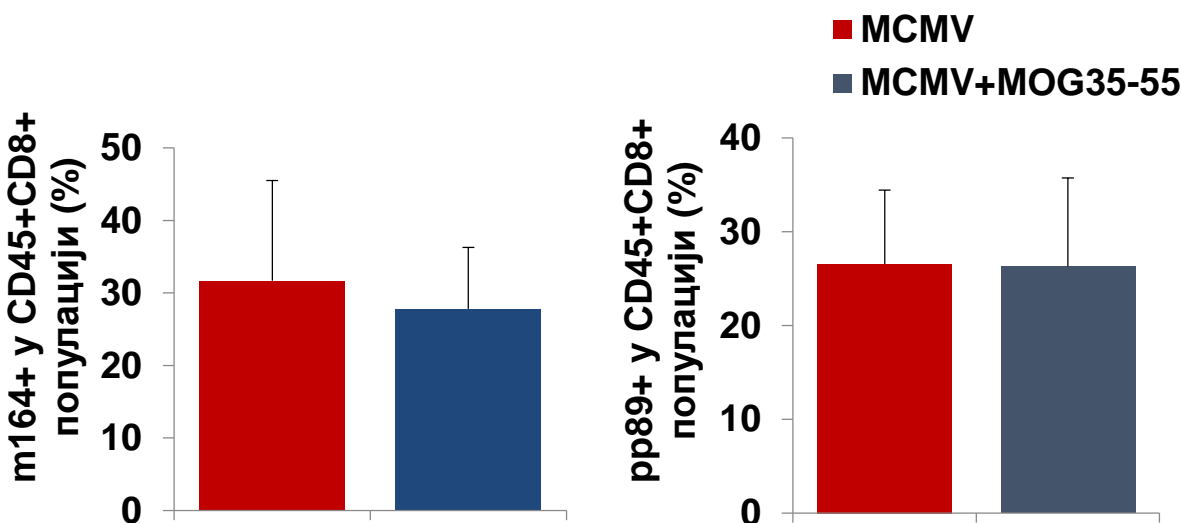
Графикон 3



Графикон 3. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом, у неонаталном периоду, и касније имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је присутан приближно једнак број CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита. Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а BALB/c мишева неонатално инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (MCMV+MOG₃₅₋₅₅), само неонатално инфицираних (MCMV), само имунизованих (MOG₃₅₋₅₅) и нетретираних, а проточном цитометријом је анализирана заступљеност CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита. Приказана је средња вредност броја анализираних ћелија + SE апсолутног броја CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у ЦНС-у из репрезентативног експеримента са укупно 8 мишева по групи.

Обзиром да је у ЦНС-у мишева неонатално инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ уочен значајан пораст броја CD8⁺ Т лимфоцита, даље је анализирано да ли је ова појава последица реактивације вируса у ЦНС-у коју прати и пораст CD8⁺ Т лимфоцита. Проточном цитометријом су међу мононуклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а неонатално инфицираних мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ и из одраслих мишева који су само инфицирани вирусом детектоване CD8⁺ ћелије специфичне за вирусне епитопе pp89 и m164 (Графикон 4).

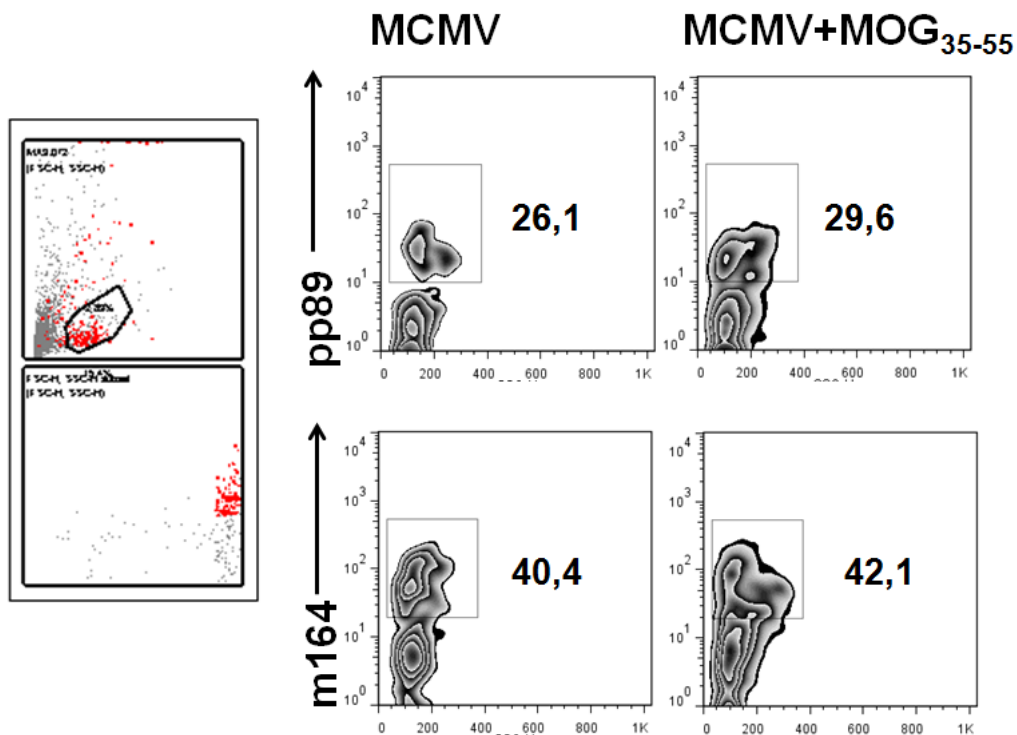
Графикон 4



Графикон 4. Имунизација MOG₃₅₋₅₅ пептидом не утиче на повећање процента вирус специфичних ћелија у ЦНС-у мишева инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду. Приказане су средње вредности + SE процента pp89⁺ и m164⁺ ћелија у CD45⁺CD8⁺ популацији лимфоцита у групама животиња MCMV и MCMV+MOG₃₅₋₅₅. (репрезентативни експеримент, 8 мишева по групи)

На графикону 4 и слици 2 се јасно уочава да након имунизације енцефалитогеном у ЦНС-у нема повећања броја CD8⁺ лимфоцита специфичних за вирус. Нема значајне разлике између MCMV и MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева у проценту pp89⁺ и m164⁺ ћелија детектованих у популацији CD45⁺CD8⁺ ћелија међу мононуклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а.

Слика 2



Слика 2. Репрезантативни плотови који приказују проценат лимфоцита специфичних за вирус у оквиру CD45+CD8+ популације ћелија у ЦНС-у у групама MCMV и MCMV+MOG₃₅₋₅₅.

4.1.2. Имунизација мишева, неонатално инфицираних MCMV-ом, пептидом MOG₃₅₋₅₅ покреће значајан инфлукс проинфламацијских Th1, Th17, и Tc17 лимфоцита у ЦНС

Како би се детаљније карактерисали CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцити детектовани у инфилтратима ЦНС-а инфицираних и имунизованих мишева, анализиран је цитокински профил ових ћелија као и експресија транскрипционих фактора и хемокинских рецептора који су укључени у привлачење ефекторских ћелија у ЦНС. Апсолутни број CD4⁺T лимфоцита изолованих из ткива ЦНС-а, и то како Th1 које експримирају IFN- γ и TNF- α , тако и Th17 који експримирају IL-17 (Графикон 5) је значајно већи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са осталим групама мишева, MCMV и нетретираним. Исти резултати су добијени

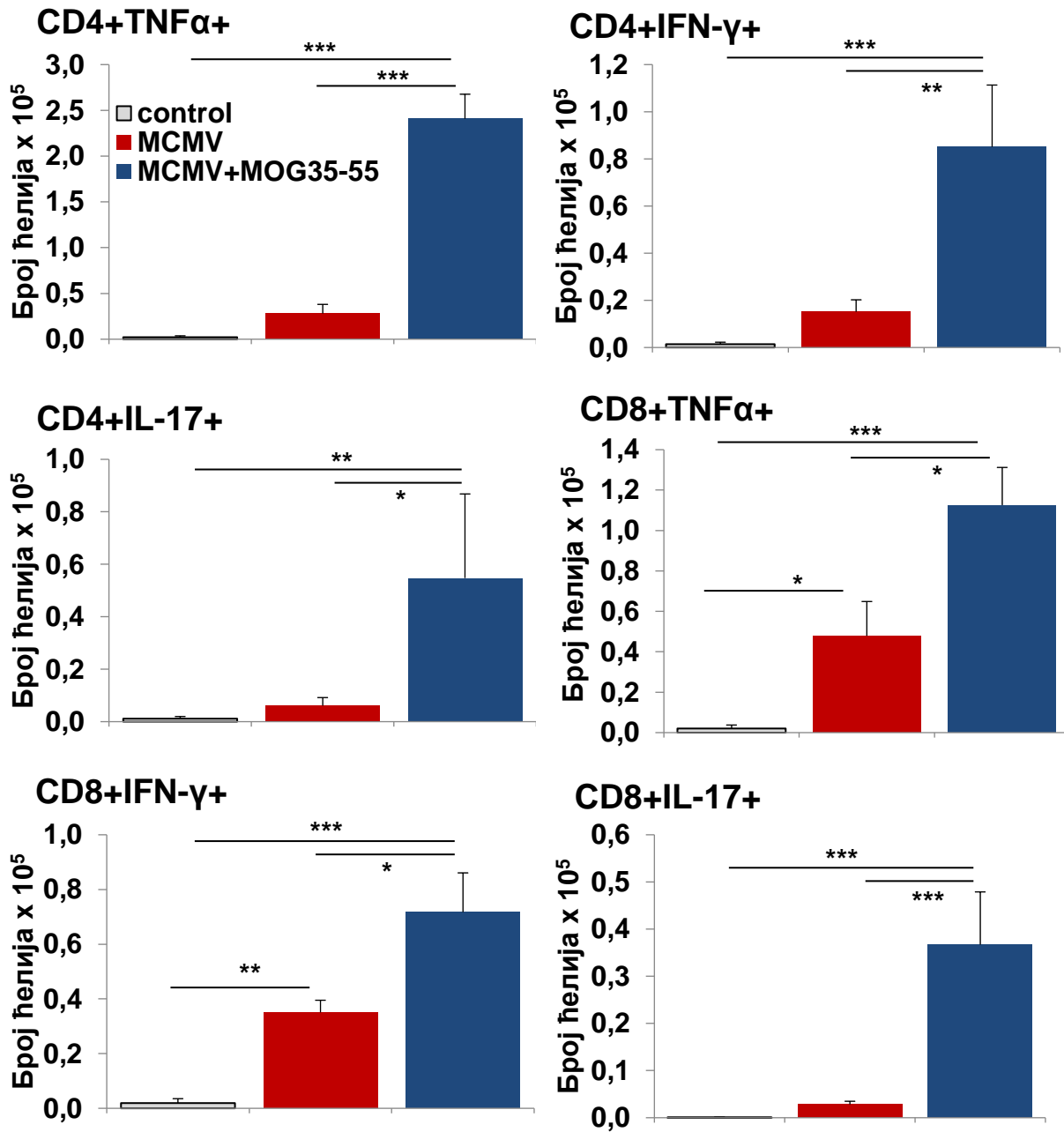
и анализом инфламацијских CD8+T лимфоцита у ЦНС-у. Број Tc1 ћелија које експримирају IFN- γ и TNF- α , као и Tc17 ћелија које експримирају IL-17 је такође значајно већи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c у поређењу са осталим групама мишева.

Сличан налаз је добијен и анализом CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају транскрипционе факторе Tbet и RoR γ t међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а 15 дана после имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅. Апсолутни број CD4+ и CD8+ лимфоцита које експримирају маркер T1 имунског одговора- Tbet, као и апсолутни број ових ћелија које експримирају маркер T17 имунског одговора- RoR γ t је статистички значајно већи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са осталим групама мишева (Графикон 6).

У ЦНС-у MCMV групе мишева се уочава повећање апсолутног броја CD8+ лимфоцита које експримирају Tbet и RoR γ t у поређењу са групом нетретираних мишева, али се број оваквих CD8+ лимфоцита додатно значајно повећава имунизацијом енцефалитогеном. Са друге стране у ЦНС-у MCMV мишева скоро и да нема CD4+ лимфоцита које експримирају испитиване транскрипционе факторе па је значајно присуство ових ћелија у ЦНС-у у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ вероватно последица само имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅.

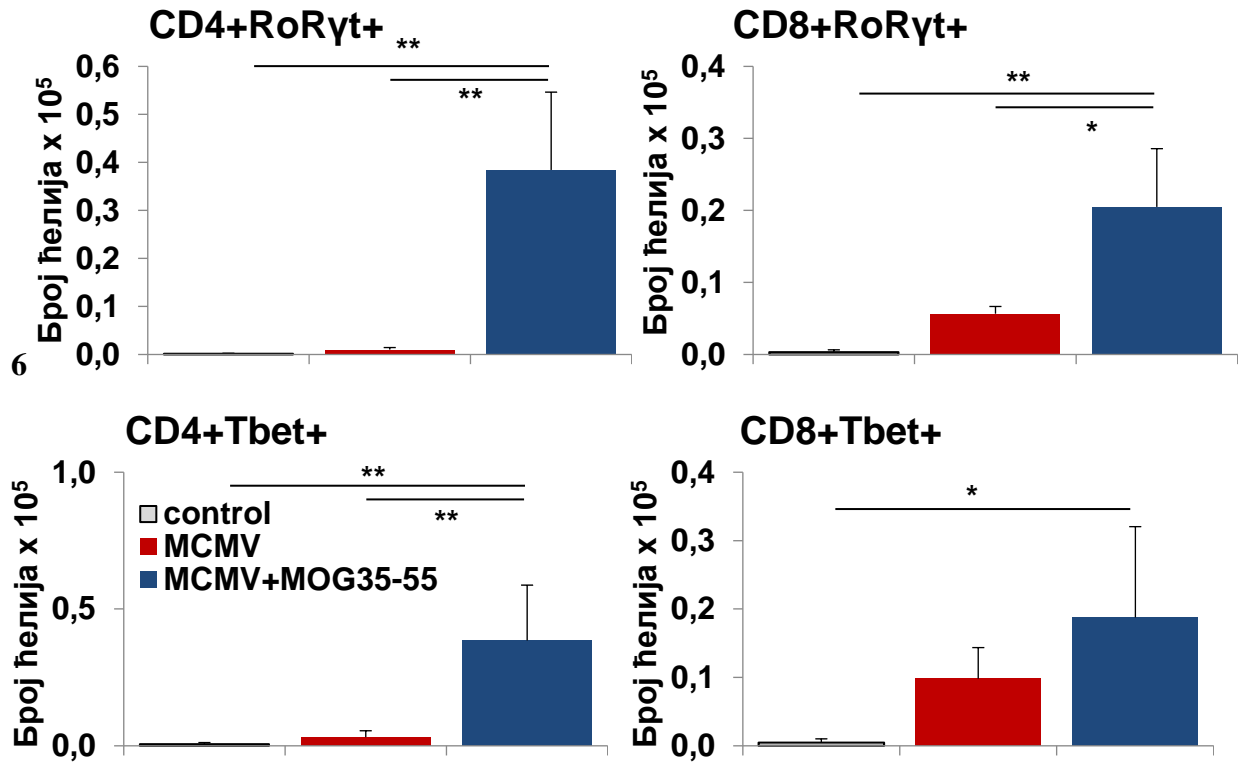
Статистички значајно већи број CD4+ лимфоцита који експримирају хемокинске рецепторе CXCR3 и CCR6 забележен је међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева у поређењу са бројем ових ћелија међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а нетретираних и само вирусом инфицираних мишева (Графикон 7). Апсолутни број CD8+ лимфоцита које експримирају испитиване хемокинске рецепторе међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а је статистички значајно већи у групи неонатално инфицираних и касније енцефалитогеном имунизованих мишева у поређењу са нетретираним мишевима, док у поређењу са само вирусом инфицираним мишевима нема статистички значајне разлике (Графикон 7).

Графикон 5



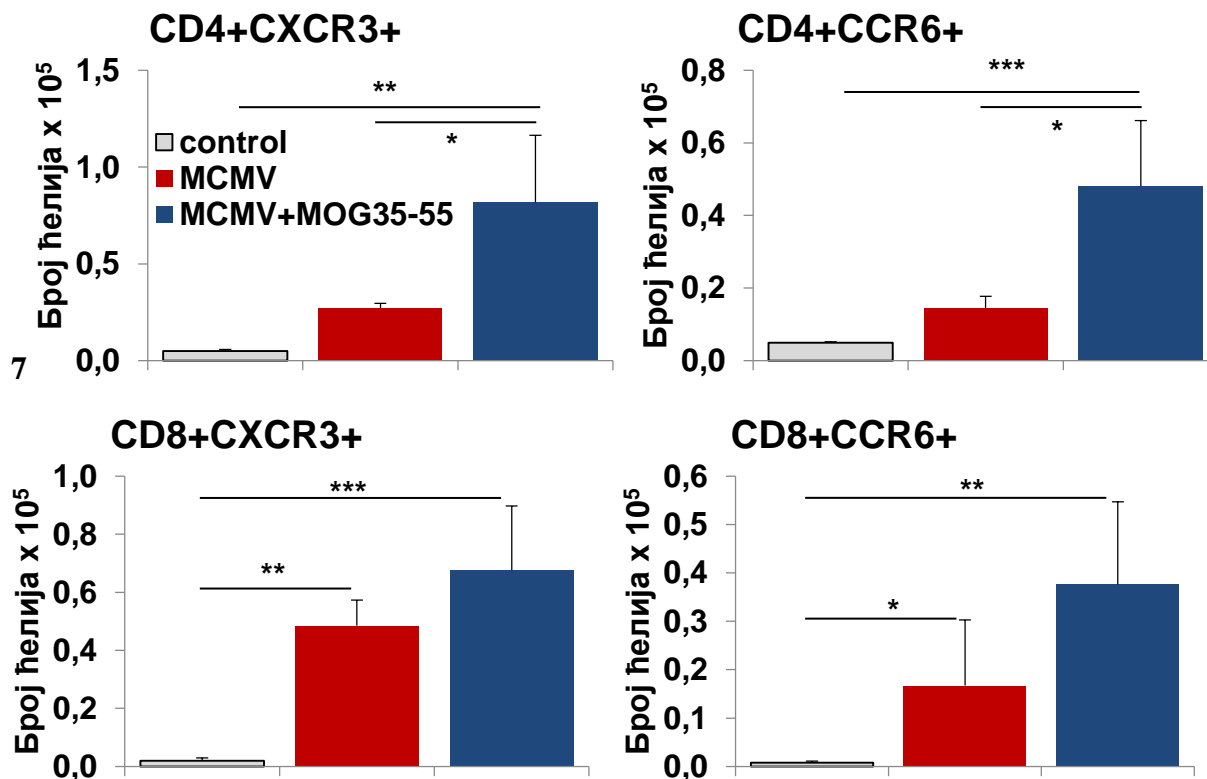
Графикон 5. Развој ЕАЕ код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду и имунизованих енцефалитогеном је удружен са значајним инфлуksom Th1, Th17 и Tc17 лимфоцита у ЦНС. Приказана је средња вредност апсолутног броја + SE CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају проинфламацијске цитокине TNF- α , IFN- γ и IL-17 у популацији мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а BALB/c мишева 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ претходно инфицираних MCMV-ом (MCMV+MOG₃₅₋₅₅), мишева који су инфицирани MCMV-ом у неонаталном периоду а да касније имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (MCMV) и нетретираних мишева. Статистичка значајност разлике у броју изолованих ћелија међу наведеним групама мишева је одређена Student-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Графикон 6



Графикон 6. Развој ЕАЕ код BALB/c мишева инфицираних МСМV-ом у неонаталном периоду и имунизованих енцефалитогеном је удружен са значајним повећањем лимфоцита који експримирају транскрипционе факторе маркере T1 и T17 имунског одговора у ЦНС-у. Приказан је апсолутни број + SE CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају транскрипционе факторе Tbet и RoRγt, у популацији мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а BALB/c мишева 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ претходно инфицираних МСМV-ом у неонаталном периоду (MCMV+MOG₃₅₋₅₅), мишева који су инфицирани МСМV-ом у неонаталном периоду а да касније нису имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (MCMV) и нетретираних мишева. Статистичка значајност разлике у броју испитиваних ћелија међу наведеним групама мишева је одређена *Student*-овим *t* тестом; *P<0.05, **P<0.01. Приказани су резултати из репрезентативног експеримента од по 8 мишева по групи.

Графикон 7



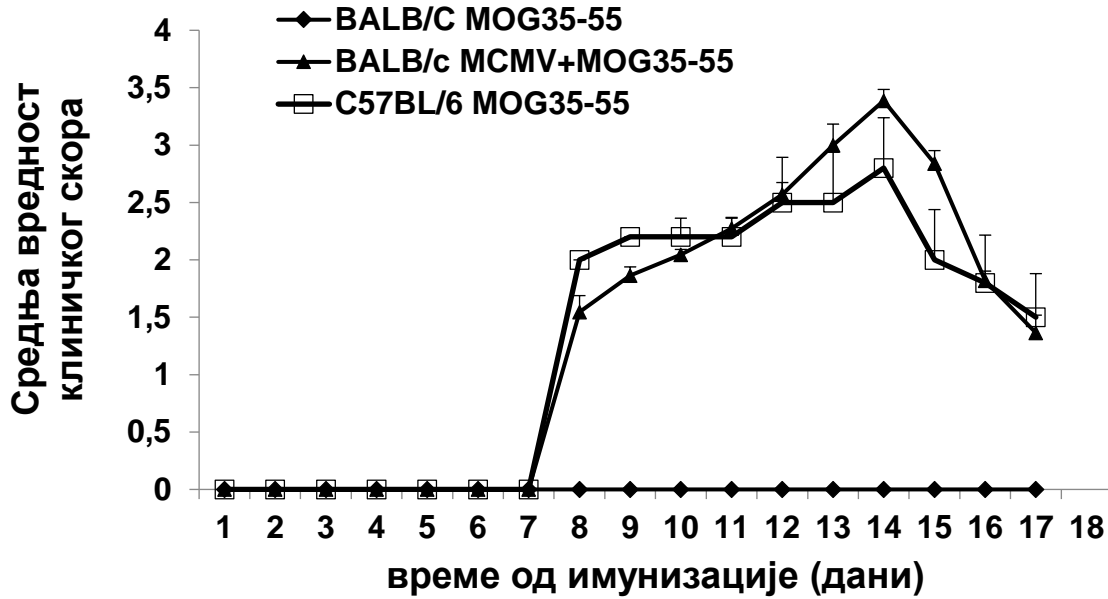
Графикон 7. Развој ЕАЕ код BALB/c мишева инфицираних МСМV-ом у неонаталном периоду и имунизованих енцефалитогеном је удружен са значајним повећањем броја лимфоцита који експримирају T1/T17 хемокинске рецепторе у ЦНС-у. Приказани су апсолутни бројеви + SE CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају хемокинске рецепторе CXCR3 и CCR6 у популацији мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а BALB/c мишева 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ који су претходно инфицирани МСМV-ом у неонаталном периоду (МСМV+MOG₃₅₋₅₅), мишева који су инфицирани МСМV-ом у неонаталном периоду а да касније нису имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (МСМV) и нетретираних мишева. Статистичка значајност разлике у броју изолованих ћелија међу наведеним групама мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005. Приказани су резултати из репрезентативног експеримента од по 8 мишева по групи.

4.2. Инфекција BALB/c мишева MCMV-ом у адултном добу прекида резистенцију на развој ЕАЕ изазваног пептидом MOG₃₅₋₅₅

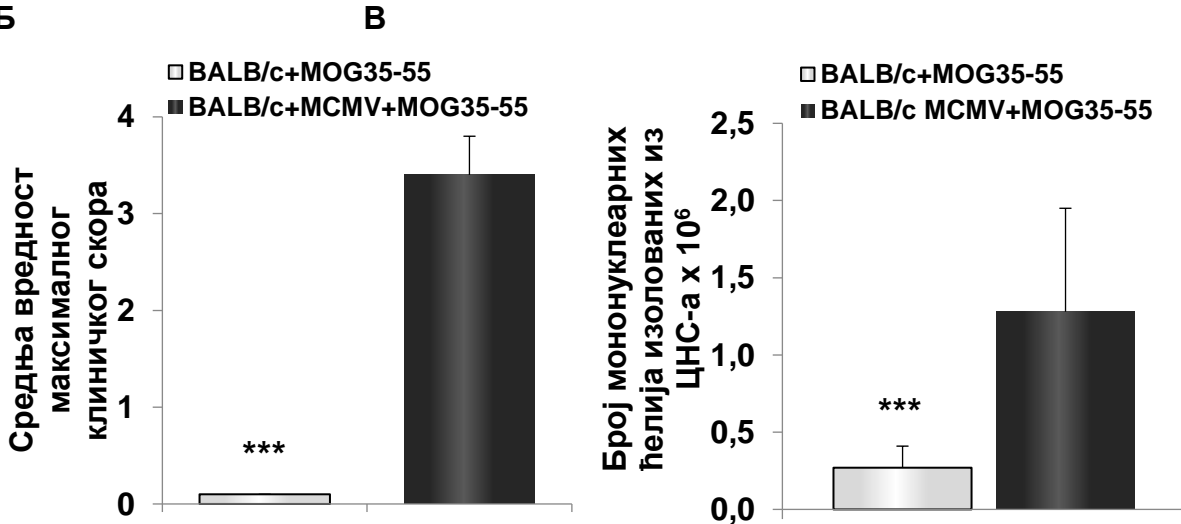
Како је показано да инфекција MCMV-ом у неонаталном добу омогућава развој ЕАЕ код мишева иначе резистентних на индукцију ове болести пептидом MOG₃₅₋₅₅, а како је у општој популацији инфекција CMV-ом много чешћа у адултном добу, желели смо да испитамо и утицај такве инфекције на осетљивост BALB/c мишева на индукцију ЕАЕ. Да бисмо испитали могућу улогу инфекције CMV-ом у адултном добу у патогенези ЕАЕ, BALB/c мишеве смо имунизовали пептидом MOG₃₅₋₅₅ 10 дана после инфекције вирусом. За процену развоја болести као контролне животиње коришћени су претходно неинфицирани C57BL/6 мишеви, иначе осетљиви на развој ЕАЕ након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ као и неинфицирани BALB/c мишеви. Развој ЕАЕ је евакуиран свакодневним праћењем клиничких знакова болести. Анализом клиничког скорa показано је да BALB/c мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ не развијају клиничке знаке болести, док BALB/c мишеви инфицирани вирусом развијају типичне клиничке знаке ЕАЕ који се не разликују од болести која се развија код осетљивих C57BL/6 мишева (Графикон 8А). Мишеви инфицирани вирусом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ су као и C57BL/6 мишеви постепено развили парезу и парализу задњих, затим и предњих екстремитета са кулминацијом 14. дана од имунизације после чега се постепено опорављају. Средња вредност максималног клиничког скорa указује да су инфицирани BALB/c мишеви развили јаку болест (Графикон 8Б). Веома изражена болест коју су развили инфицирани BALB/c мишеви се огледа и у укупном броју моноклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а који је статистички значајно већи у поређењу са бројем ћелија изолованих из ЦНС-а BALB/c мишева који су једино имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом. На Графикону 8В који приказује укупан број моноклеарних ћелија изолованих из ткива мозга и кичмене мождине, јасно се уочава да је у централном нервном систему мишева који су развили клиничке знаке ЕАЕ (BALB/c MCMV+MOG) број моноклеарних ћелија око 5 пута већи него у ЦНС-у неинфицираних BALB/c мишева.

Графикон 8

А



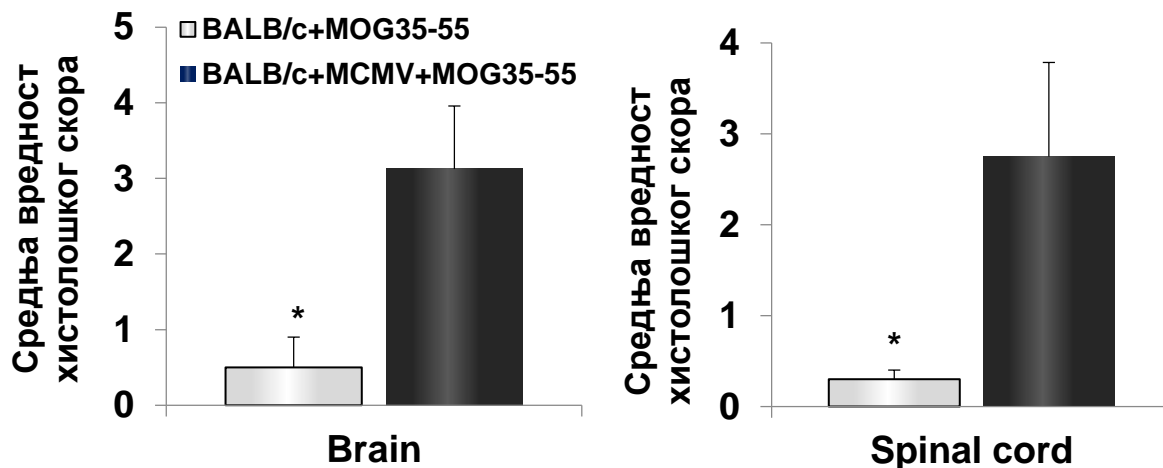
Б



Графикон 8. BALB/c мишеви инфицирани MCMV и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају ЕАЕ. Осам недеља стари BALB/c мишеви су инфицирани вирусом апликацијом 10⁵ MCMV-а у шапу и за десет дана имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у комплетном адјувансу (BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Контролне групе мишева C57BL/6 и BALB/c су имунизоване пептидом MOG₃₅₋₅₅ у адјувансу без претходне инфекције (C57BL/6 MOG₃₅₋₅₅ и BALB/c MOG₃₅₋₅₅); А) Клинички скор је приказан као средња вредност + SE четири независна експеримента са укупно 29 мишева по групи; Б) Средња вредност максималног клиничког сора 15 дана по индукцији ЕАЕ (четири различита експеримента, 29 мишева по групи); В) Средња вредност броја мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (три независна експеримента, 24 миша по групи). Статистичка значајност разлике средње вредности максималног клиничког сора и броја мононуклеарних ћелија је одређена *Student*-овим t тестом; ***P<0.001.

Хистолошка анализа. У исечцима ткива мозга и кичмене мождине BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ су уочени изражени мононуклеарни инфилтрати. Средња вредност хистолошког скорa у мозгу и кичменој мождини је статистички значајно већа ($p < 0.05$) у групи инфицираних и имунизованих BALB/c мишева у поређењу са вредностима у групи мишева који су само имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 9).

Графикон 9

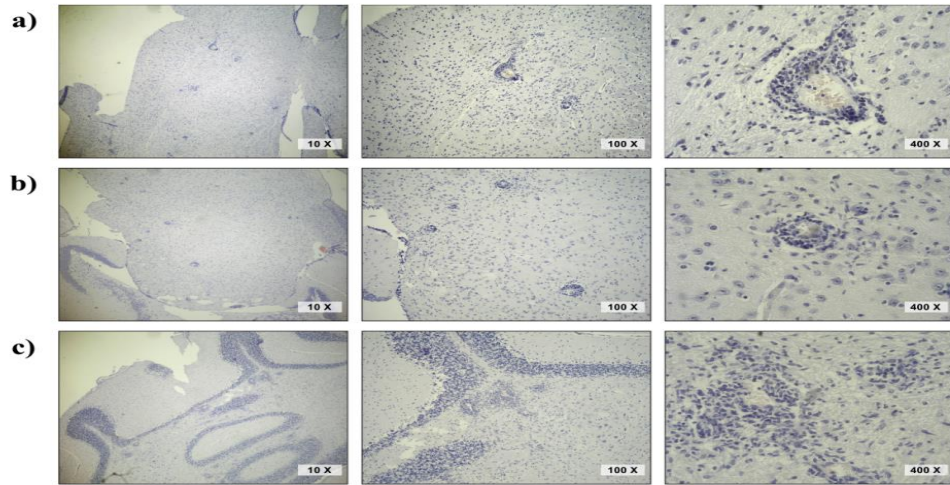


Графикон 9. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је присутан значајан инфламацијски инфилтрат. Ткиво мозга и кичмене мождине BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева је екстирпирано 15 дана после имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅, исечци дебљине 5 μm су обојени техником хематоксилин-еозин, а анализирано је 5 исечака по животињи. Приказан је хистолошки скор (средња вредност + SE) из два независна експеримента са укупно 8 мишева по групи. Статистичка значајност разлике хистолошких карактеристика болести између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева је одређена Student-овим t тестом; * $P < 0.05$.

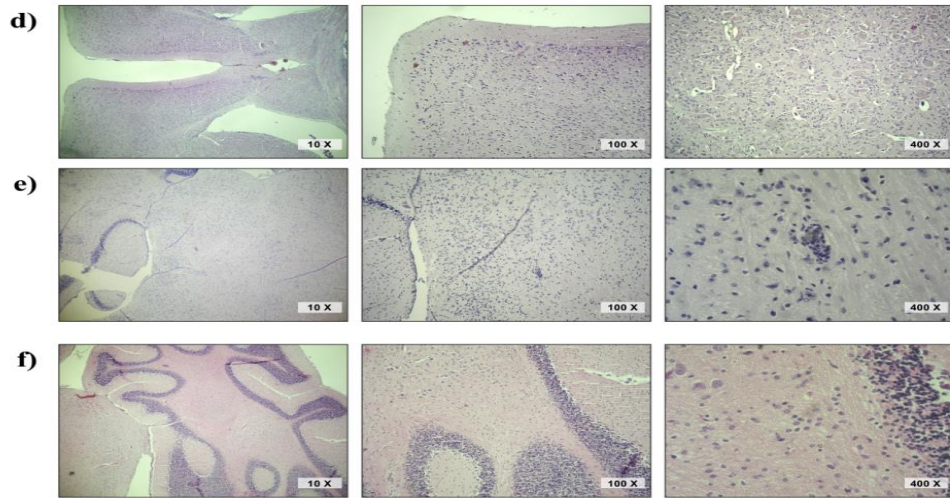
У мозгу и кичменој мождини BALB/c мишева који су само имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ детектоване су само појединачне мононуклеарне ћелије (Слика 3 и 4). У групи BALB/c мишева само инфицираних вирусом су уочени умерени периваскуларни инфилтрати само у можданом стаблу. Међутим BALB/c мишеви који су инфицирани MCMV-ом 10 дана пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ су развили субарахноидне и периваскуларне инфилтрате у кортексу мозга, у можданом стаблу и церебелуму са ширењем у паренхим (Слика 3) и инфилтрате у белој маси кичмене мождине (Слика 4).

Слика 3

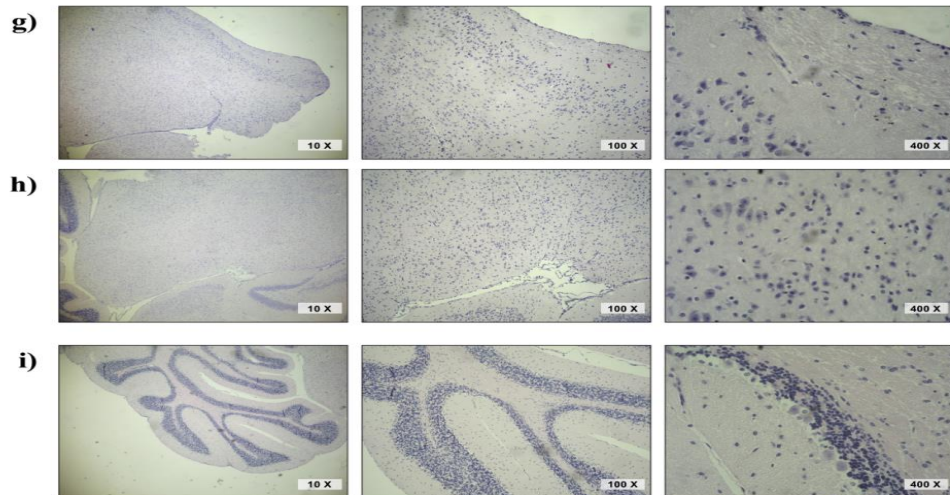
MCMV+MOG₃₅₋₅₅



MCMV



MOG₃₅₋₅₅

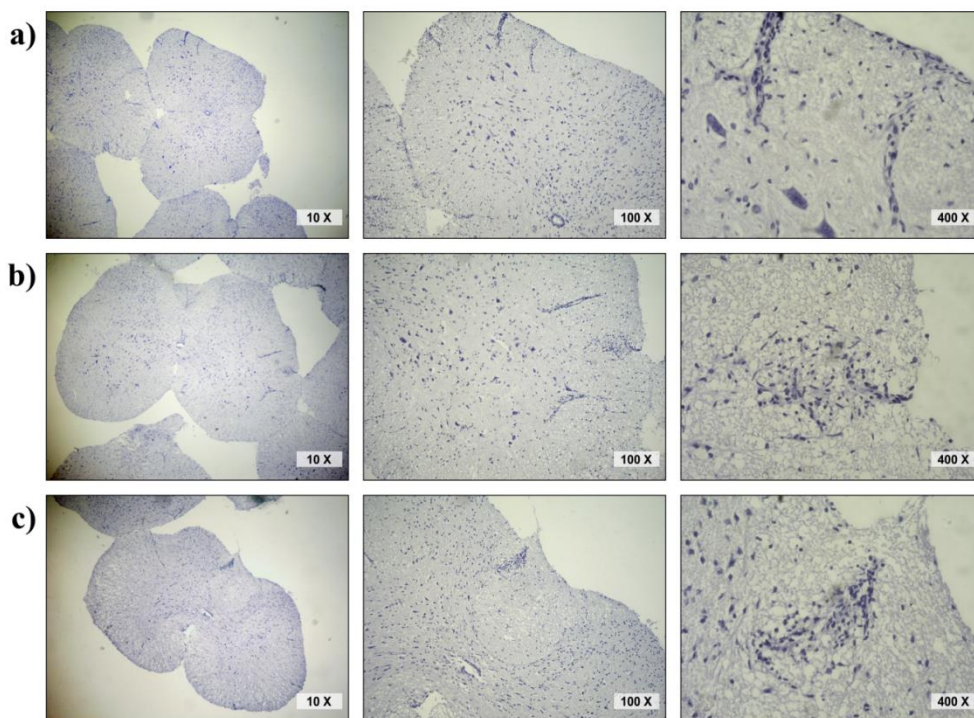


Слика 3: Хистологија кортекса мозга, можданог стабла и церебелума 15 дана од имунизације MOG₃₅₋₅₅ пептидом BALB/с мишева инфицираних вирусом 10 дана пре имунизације (BALB/с MCMV+MOG₃₅₋₅₅), BALB/с мишева само инфицираних вирусом (BALB/с MCMV) и BALB/с мишева само имунизованих енцефалитогеном (BALB/с MOG). Ткиво мозга је екстирпирано 15 дана после имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅, односно 25 дана од инфекције вирусом и исечци дебљине 5 µm су обојени техником хематоксилин-еозин. Приказани су репрезентативни исечци: кортекс мозга (а), мождано стабло (б), церебелум (ц) BALB/с MCMV+MOG₃₅₋₅₅; кортекс мозга (д), мождано стабло (е), церебелум (ф) BALB/с MCMV инфицираних мишева (BALB/с MCMV); кортекс мозга (г), мождано стабло (х), церебелум (и) BALB/с MOG₃₅₋₅₅ мишева.

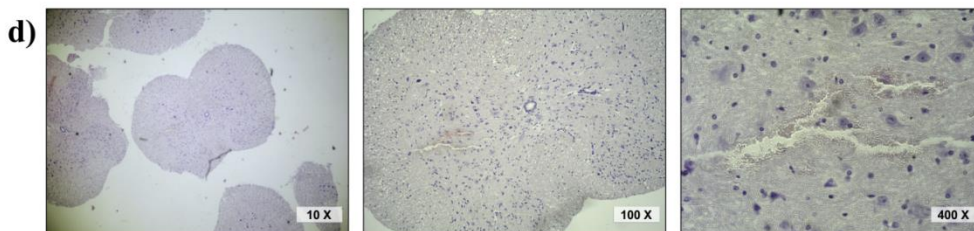
Имунохистохемијско бојење исечака ЦНС-а указује на присуство CD3⁺ позитивних лимфоцита у инфилтратима мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅, чиме је потврђена инфламацијска природа инфилтрата, а репрезентативни исечци кичмене мождине су приказани на Слици 5. У исечцима кичмене мождине мишева само инфицираних вирусом и мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ су присутне ретки појединачни CD3 позитивне ћелије.

Слика 4

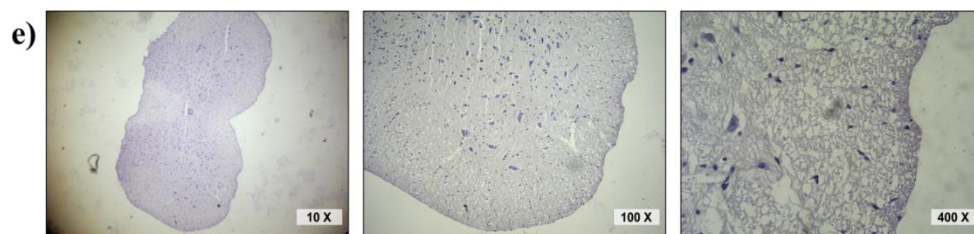
MCMV+MOG₃₅₋₅₅



MCMV



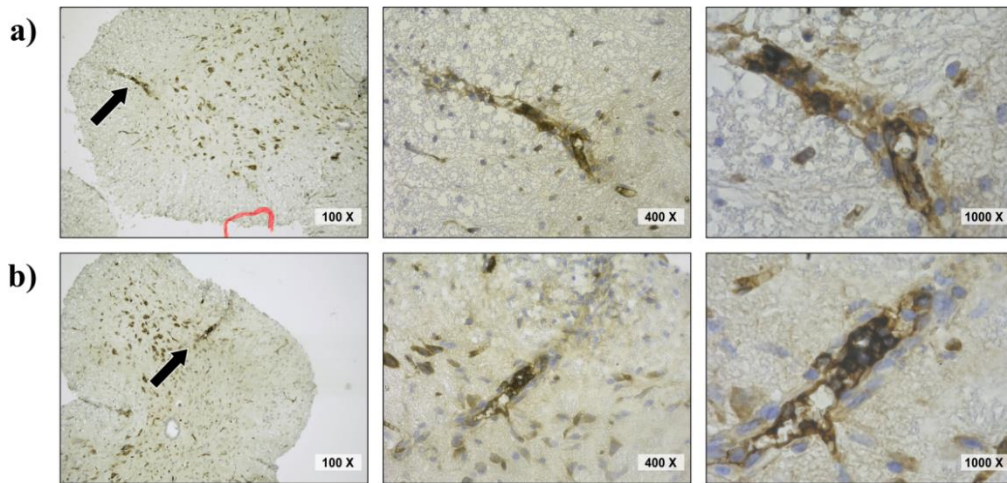
MOG₃₅₋₅₅



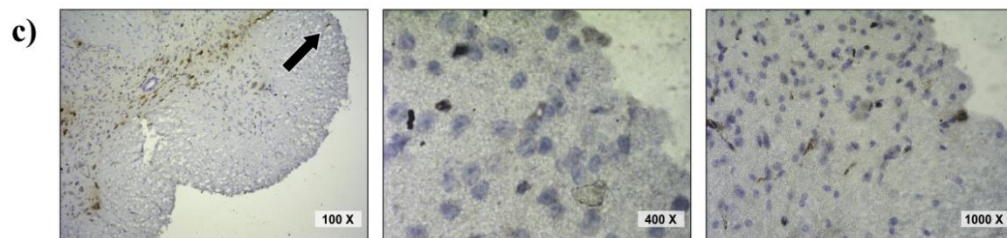
Слика 4: Хистологија кичмене мождине 15 дана од имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева инфицираних вирусом 10 дана пре имунизације (BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅), BALB/c мишева само инфицираних вирусом (BALB/c MCMV) и BALB/c мишева само имунизованих енцефалитогеном (BALB/c MOG). Ткиво кичмене мождине је екстирпирано 15 дана после имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅, односно 25 дана од инфекције вирусом и исечци дебљине 5 μm су обојени техником хематоксилин-еозин. Приказани су репрезентативни примери кичмене мождине BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (a-c); BALB/c MCMV (d) и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (e).

Слика 5

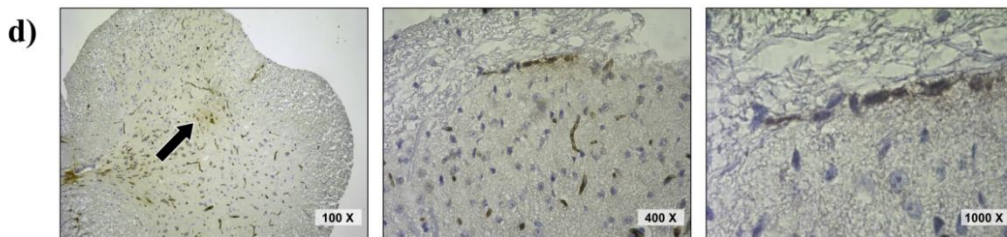
MCMV+MOG₃₅₋₅₅



MCMV



MOG₃₅₋₅₅

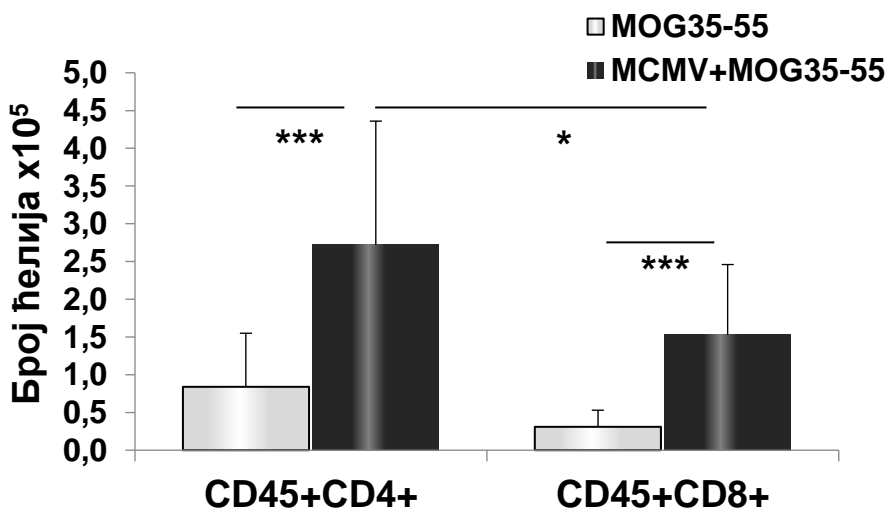


Слика 5. Имунохистохемијско бојење препарата кичмене кождине. CD3⁺ ћелије су присутне у инфилтратима у кичменој моздини BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева 15 дана после имунизације. Стрелице на сликама лево означавају подручје које је под већим увеличањем приказано десно.

4.3. Постоји значајна разлика у заступљености субпопулација мононуклеарних ћелија у ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ и мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Анализе исечака мозга и кичмене мождине указују на постојање инфилтрата у ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Слика 3), што је потврђено и анализирањем укупног броја мононуклеарних ћелија изолованих из мозга и кичмене мождине (Графикон 8В). Даљом анализом је испитан ћелијски састав инфилтрата. Фенотипска карактеризација инфилтришућих ћелија у мозгу је показала постојање статистички значајне разлике ($p < 0.001$) у броју CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита између MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и MOG₃₅₋₅₅ групе BALB/c мишева. Слично типичном ЕАЕ код C57BL/6 мишева, у ЦНС-у у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева, број CD4⁺ Т лимфоцита је статистички значајно већи ($p < 0.001$) него број CD8⁺ Т лимфоцита, у поређењу са групом MOG₃₅₋₅₅ мишева (Графикон 10).

Графикон 10



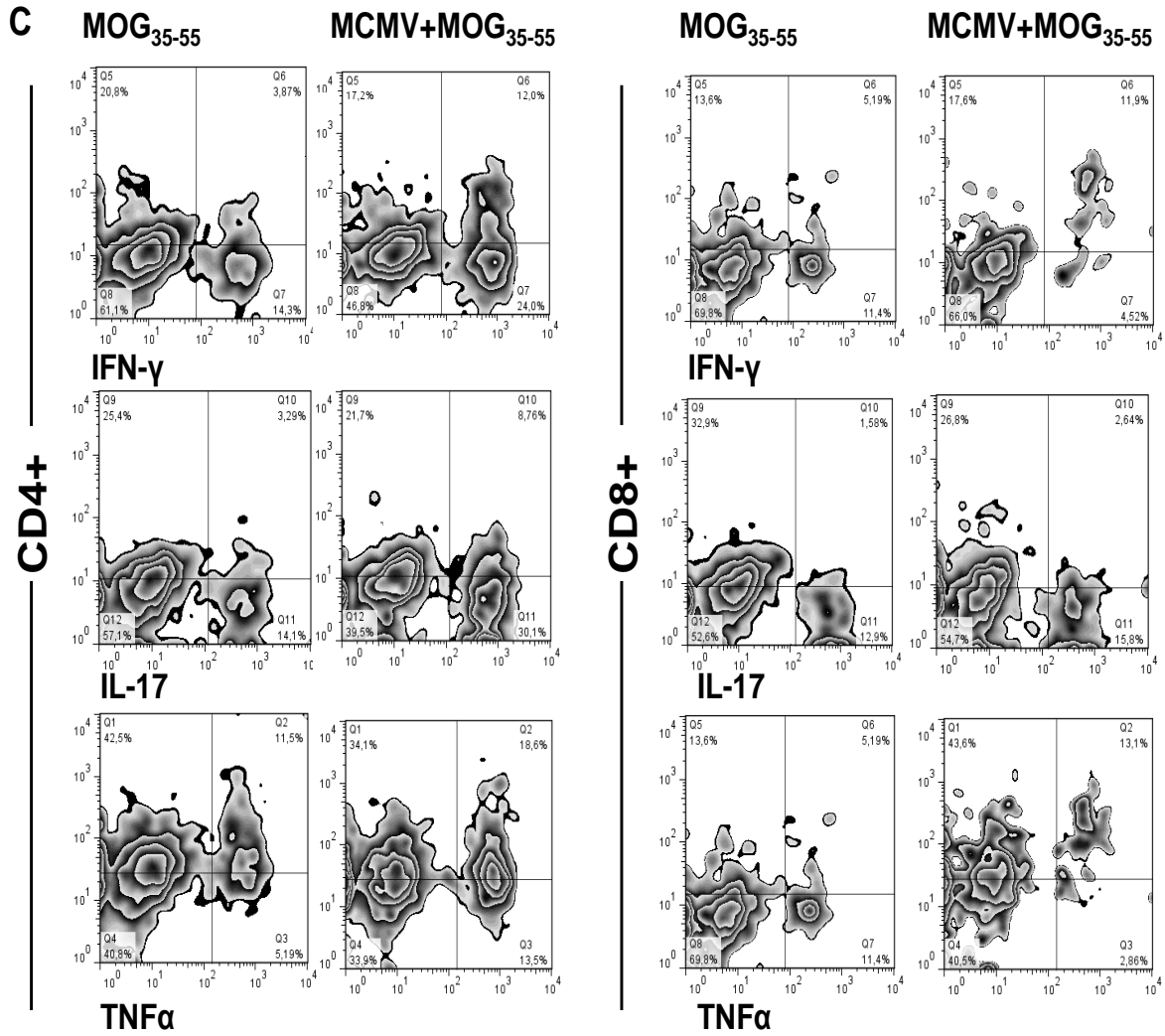
Графикон 10. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан број CD4⁺Т и CD8⁺Т лимфоцита. Осам недеља стари BALB/c мишеви су инфицирани MCMV-ом и две недеље касније имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅. За 15 дана је урађена перфузија, а по уклањању мозга и кичмене мождине су изоловане мононуклеарне ћелије из ткива ЦНС-а. Приказан је укупан број CD45+CD4⁺, CD45+CD8⁺ ћелија из три независна експеримента са укупно 22 миша по групи. Статистичка значајност разлике броја изолованих ћелија између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева је одређена Student-овим t тестом; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

4.4. У ЦНС-у мишева инфицираних вирусом који развијају ЕАЕ су присутни Т1/Т17 CD4+ и CD8+ Т лимфоцити

Даље је испитано да ли у ЦНС-у MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева у време максималног испољавања болести постоје евентуалне разлике у процентуалној заступљености и броју појединих ћелијских популација које имају улогу у патогенези ЕАЕ у поређењу са групом MOG₃₅₋₅₅ мишева. ЕАЕ код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и касније имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом удружен је са инфлуксом Th1, Th17, Tc17 лимфоцита у ЦНС. Међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева је у поређењу са ћелијама изолованим из ЦНС-а групе MOG₃₅₋₅₅ мишева детектован већи проценат (Слика 6) и статистички значајно већи број (Графикон 11) Th1 и Th17 ћелија, као и Tc1 и Tc17 ћелија, тј CD4+ и CD8+ Т лимфоцита који интрацелуларно експримирају проинфламацијске цитокине TNF- α , IFN- γ , IL-17.

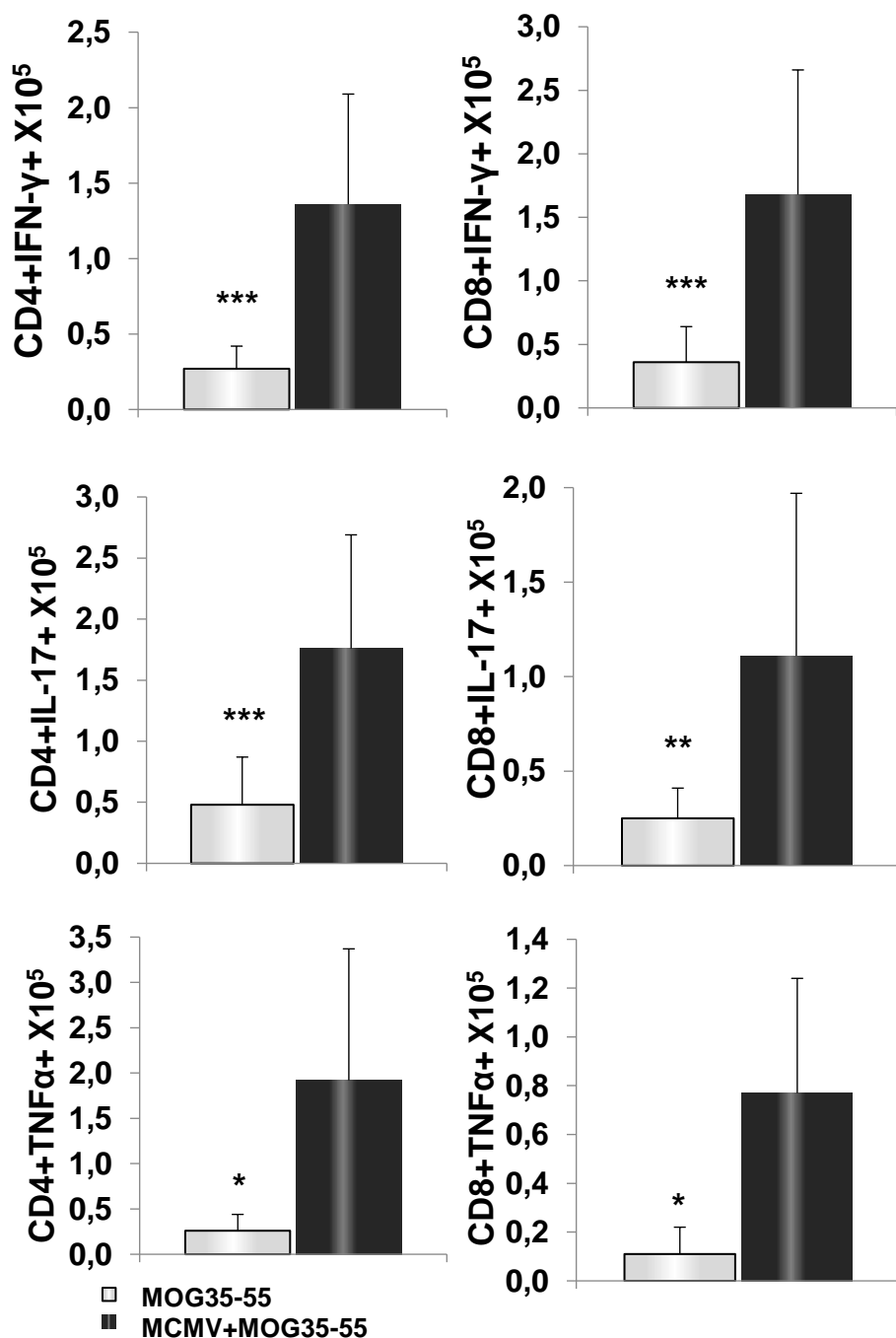
Сличне резултате показује и анализа експресије транскрипционих фактора и хемокинских рецептора, маркера Т1 и Т17 одговора, у моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и MOG₃₅₋₅₅ мишева. Тако је детектован статистички значајно већи ($p < 0.01$) број CD4+ и CD8+ лимфоцита које експримирају транскрипционе факторе, Tbet и ROR γ t (Графикон 12) и хемокинске рецепторе CXCR3 и CCR6 (Графикон 13) у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева у поређењу са групом MOG₃₅₋₅₅ мишева.

Слика 6



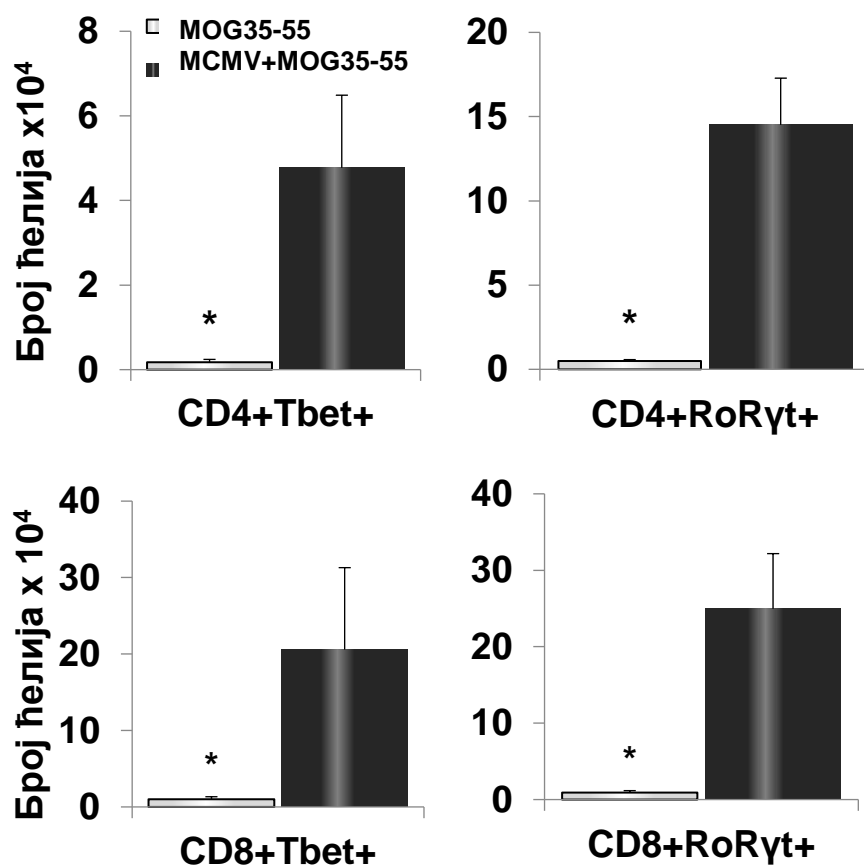
Слика 6. У ЦНС-у BALB/с мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан проценат CD4+и CD8+Т лимфоцита који продукују T1/T17 цитокине. Приказани су репрезентативни FACS плотови који приказују проценат CD4+ IFN- γ +, CD4+TNF- α +, CD4+IL-17+, CD8+ IFN- γ +, CD8+TNF- α + и CD8+IL-17+ ћелија из три независна експеримента са укупно 22 миша по групи.

Графикон 11



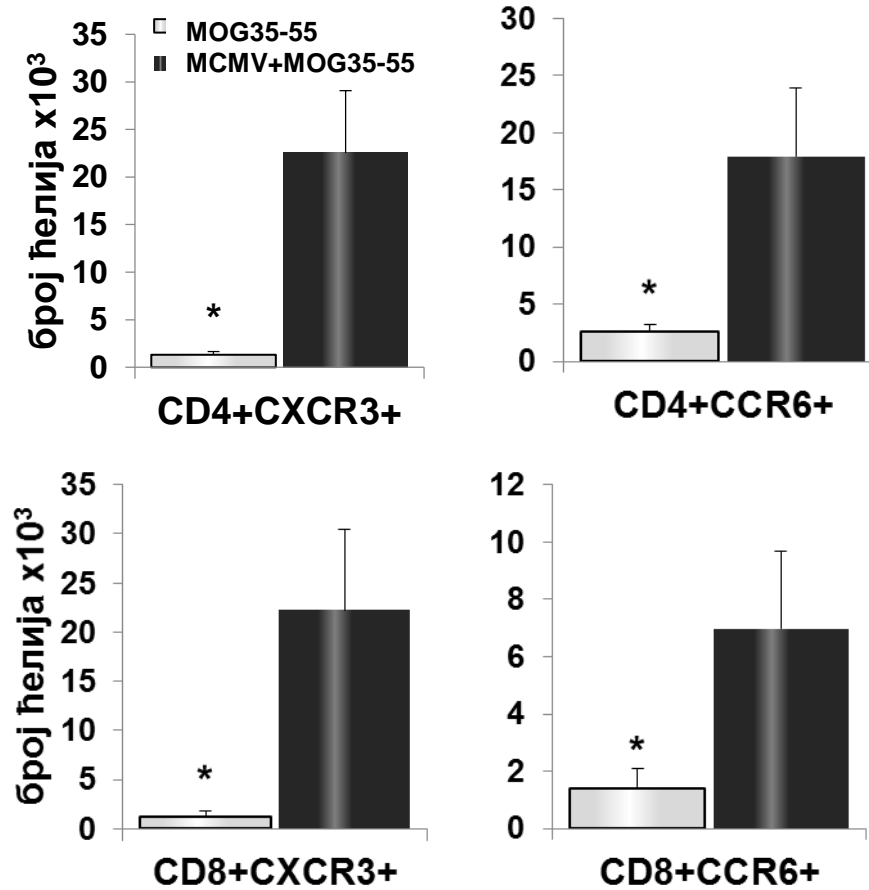
Графикон 11. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан број CD4+и CD8+T лимфоцита који продукују T1/T17 цитокине. Изоловане мононуклеарне ћелије су рестимулисане *ex vivo* PMA и јономицином пре интрацелуларног бојења и анализе проточном цитометријом. Приказан је апсолутни број (средња вредност+SE) CD4+ IFN- γ +, CD4+TNF- α +, CD4+IL-17+, CD8+ IFN- γ +, CD8+TNF- α + и CD8+IL-17+ ћелија из три независна експеримента са укупно 22 миша по групи. Статистичка значајност разлике броја изолованих ћелија између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Графикон 12



Графикон 12. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан број CD4+и CD8+Т лимфоцита који експримирају T1/T17 транскрипционе факторе. Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а и анализирани проточном цитометријом. Приказан је укупан број CD8+ и CD4+ ћелија које експримирају транскрипционе факторе Tbet и ROR γ t из три независна експеримента са укупно 22 миша по групи. Статистичка значајност разлике броја изолованих ћелија између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева мишева је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05.

Графикон 13

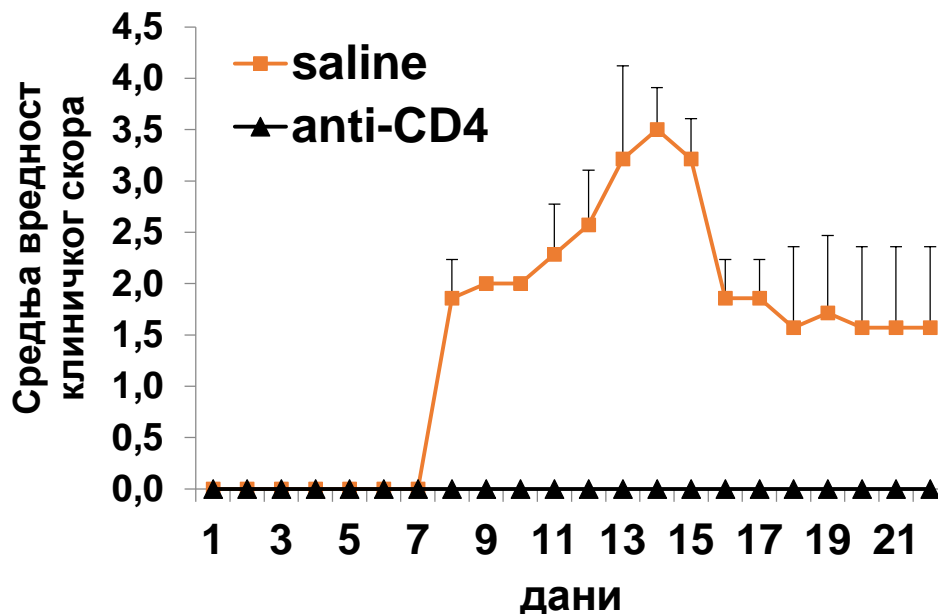


Графикон 13. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутан је значајан број CD4+и CD8+Т лимфоцита који експримирају T1/T17 хемокинске рецепторе. Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а и анализирани проточном цитометријом. Приказан је апсолутни број CD8+ и CD4+ ћелија које експримирају хемокинске рецепторе CXCR3 и CCR6 из три независна експеримента са укупно 22 миша по групи. Статистичка значајност разлике броја изолованих ћелија између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева мишева је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05.

4.5. Присуство CD4+ лимфоцита је неопходно за развој неуроинфламације у групи BALB/с мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Како би потврдили да је болест коју добијају BALB/с мишеви инфицирани вирусом и имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом аутоимунска, тј да развој саме болести зависи од присуства CD4+T лимфоцита, праћен је развој болести код мишева инфицираних вирусом којима су дан пре и пет дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом применом моноклонског антитела уклоњени CD4+T лимфоцити. Контролној групи мишева је по инфекцији MCMV-ом, пре и по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом апликован физиолошки раствор уместо деплетирајућег анти-CD4 антитела. Свакодневним праћењем клиничких манифестација болести јасно је уочено да једино мишеви инфицирани MCMV-ом и имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом без претходне деплеције CD4+T лимфоцита развијају болест, односно да деплеција CD4+ ћелија код MCMV инфицираних мишева укида осетљивост на болест индуковану MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 14), и да ови мишеви не развијају клиничке манифестације болести. Овај налаз указује да без CD4+T лимфоцита нема развоја болести што указује на аутоимунску природу болести коју добијају BALB/с мишеви инфицирани вирусом и имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

Графикон 14

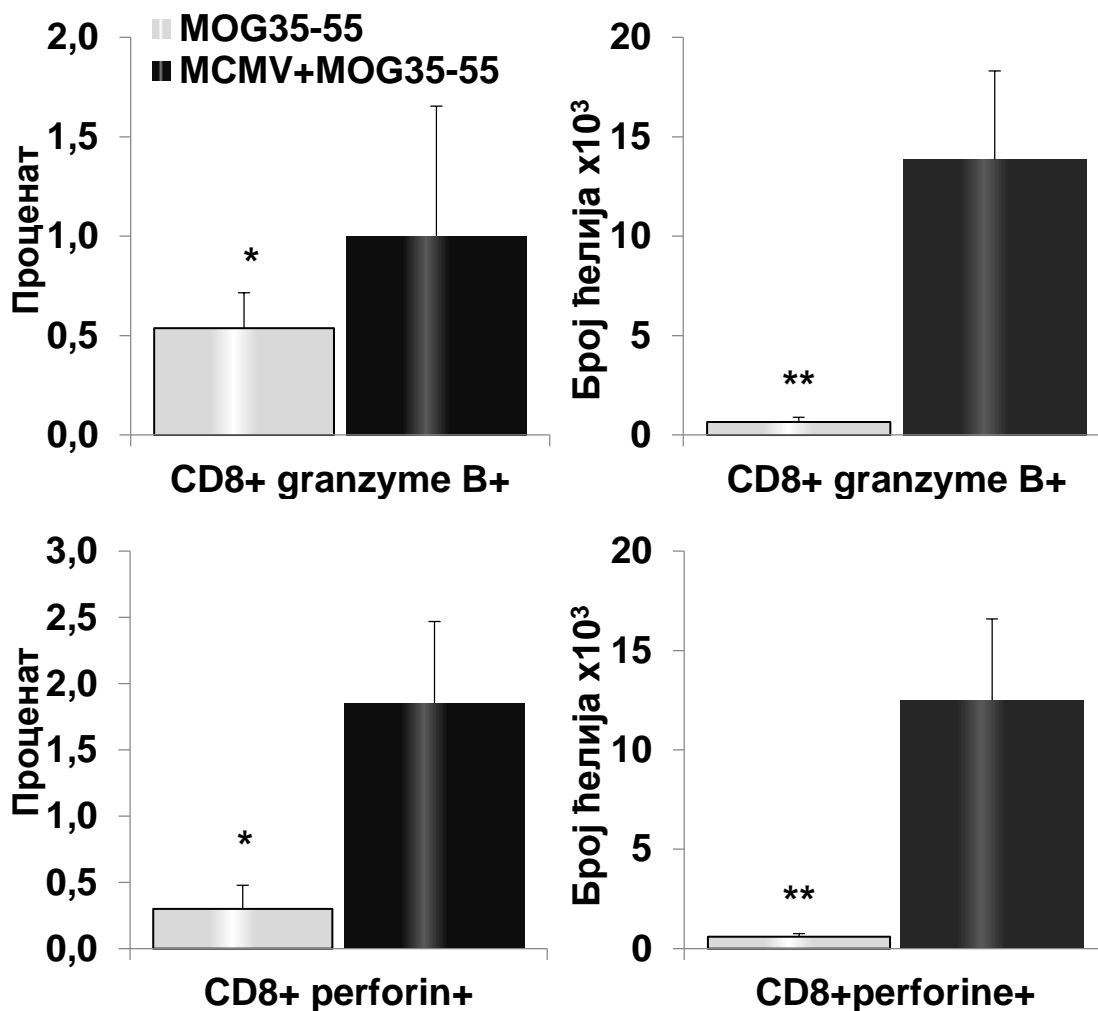


Графикон 14. Развој болести коју добијају BALB/c мишеви инфицирани вирусом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у потпуности зависи од присуства CD4⁺ лимфоцита. CD4⁺ лимфоцити су деплетирани девет дана по MCMV инфекцији (дан пре имунизације MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и пет дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом (анти-CD4 антитела). Контролни мишеви су инфицирани и имунизовани али су примили физиолошки раствор уместо деплетирајућег антитела. Приказани су EAE скорови до 22 дана по индукцији EAE код групе животиња са анти-CD4 деплетирајућим антителима и групе која је примила физиолошки раствор. Клинички скор је приказан као средња вредност + SE једног експеримента са укупно 5 мишева по групи

4.6. CD8⁺ ћелије играју улогу у развоју аутоимунске неуроинфламације код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Пошто је уочено да је у ЦНС-у BALB/c мишева који развијају EAE (инфицирани MCMV-ом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅) присутан значајан број инфламацијских CD8⁺ лимфоцита, нарочито оних који експримирају маркере T1 имунског одговора (IFN- γ , CXCR3, Tbet), даље је детаљније испитана улога CD8⁺T лимфоцита у патогенези ове болести.

Графикон 15

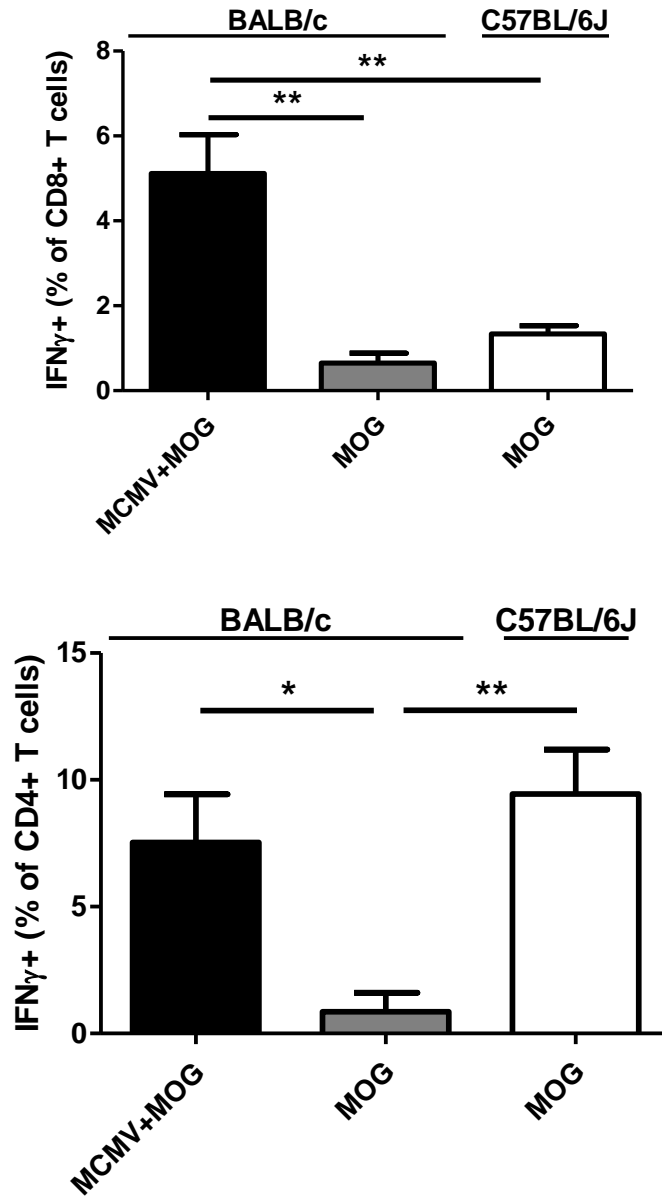


Графикон 15. У ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је присутан значајан број CD8+Т лимфоцита који експримирају маркере цитолитичке активности. Приказани су проценат и број CD8+ гранзим B+ и CD8+ перфорин+ лимфоцита међу монуклеарима изолованим из ЦНС-а 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ из групе BALB/c мишева који су инфицирани MCMV-ом десет дана пре имунизације (MCMV+MOG₃₅₋₅₅) и групе само имунизованих BALB/c мишева (MOG₃₅₋₅₅). Процент и број изолованих ћелија је приказан као средња вредност + SE из два одвојена независна експеримента са укупно 14 мишева по групи. Статистичка значајност разлике процента и броја перфорин и гранзим B+ изолованих цитотоксичких ћелија између BALB/c MCMV+MOG и BALB/c MOG мишева је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05, **p<0.005.

Анализа експресије маркера цитолитичке активности CD8+ лимфоцита међу моноклеарним ћелијама изолованим из ЦНС-а, гранзима В и перфорина, показује да је значајно већи проценат и број изолованих цитотоксичких CD8+ ћелија у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева у поређењу са MOG₃₅₋₅₅ мишевима (Графикон 15).

Како би се испитало да ли у ЦНС-у мишева који су развили неуроинфламацију има ћелија специфичних за MOG₃₅₋₅₅ и индиректно одредио проценат MOG₃₅₋₅₅ специфичних CD4+ и CD8+ лимфоцита, урађен је IFN- γ есеј. Моноклеарне ћелије изоловане из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c, MOG₃₅₋₅₅ BALB/c и MOG₃₅₋₅₅ C57BL/6 мишева су *ex vivo* рестимулисани пептидом MOG₃₅₋₅₅ па је одређен је проценат CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају IFN- γ . Значајно већи проценат CD4+ ($p < 0.01$) и CD8+ ($p < 0.05$) лимфоцита изолованих из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева, у поређењу са BALB/c мишевима, је одговорио на *ex vivo* рестимулацију пептидом MOG₃₅₋₅₅ експресијом проинфламацијског цитокина IFN- γ , што указује да је у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева присутно значајно више лимфоцита специфичних за MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 16). Код MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева готово да нема одговора на рестимулацију MOG₃₅₋₅₅ пептидом. У групи C57BL/6J мишева, иначе осетљивих на развој ЕАЕ по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом, на *ex vivo* рестимулацију MOG₃₅₋₅₅ пептидом постоји одговор само CD4+ лимфоцита што значи да код C57BL/6J мишева са развијеним ЕАЕ у ЦНС-у скоро да нема CD8+Т лимфоцита специфичних за MOG₃₅₋₅₅, односно да нема одговора CD8+Т лимфоцита на рестимулацију MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Нема разлике у проценту CD4+ лимфоцита који експримирају IFN- γ после рестимулације MOG₃₅₋₅₅ пептидом између групе MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c и MOG₃₅₋₅₅ C57BL/6 мишева, док је проценат CD8+Т лимфоцита који на рестимулацију MOG₃₅₋₅₅ пептидом продукују IFN- γ статистички значајно већи ($p < 0.01$) у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c у поређењу са групом MOG₃₅₋₅₅ C57BL/6 мишева (Графикон 16). Овај налаз указује да CD8+Т лимфоцити играју значајну улогу у патогенези аутоимунске неуроинфламације у групи BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.

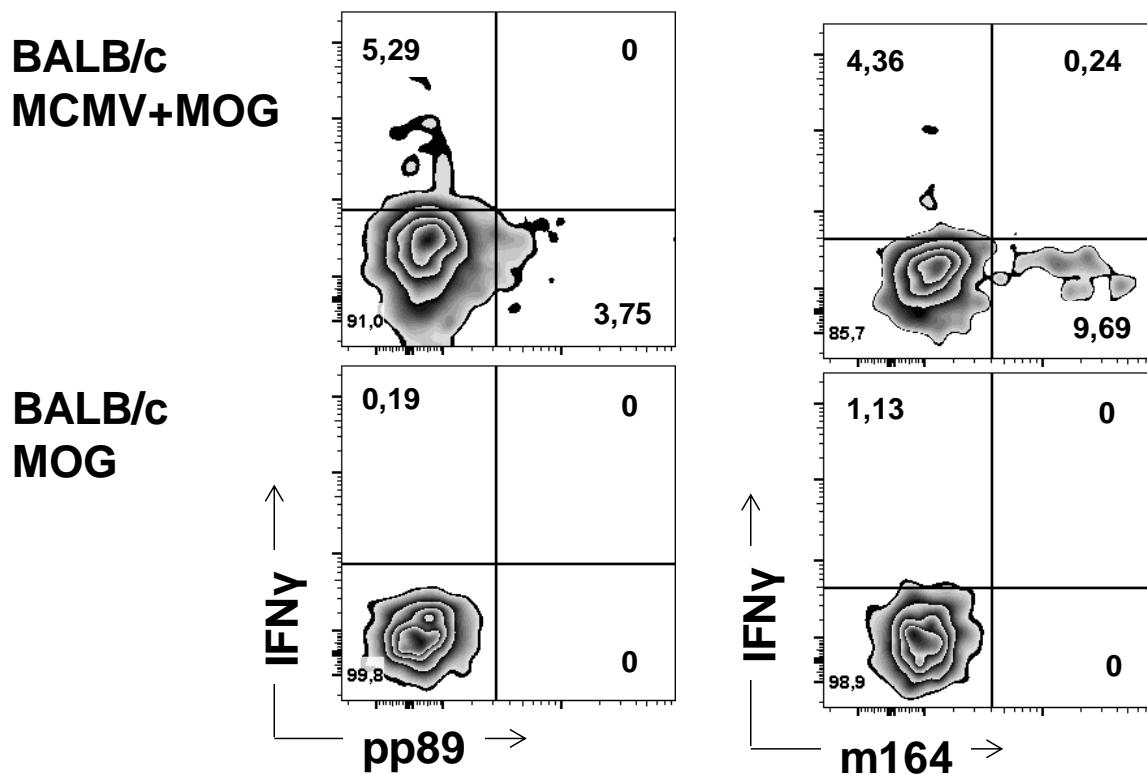
Графикон 16



Графикон 16. У инфилтратима ЦНС-а BALB/c мишева који развијају болест присутан је значајан проценат аутореактивних CD8+Т лимфоцита. Процент CD4+ и CD8+ лимфоцита који експримирају IFN- γ , pp89 и m164 у популацији CD8+ лимфоцита након *in vitro* рестимулације MOG₃₅₋₅₅ пептидом мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c, MOG₃₅₋₅₅ BALB/c и MOG₃₅₋₅₅ C57BL/6 мишева 15 дана после имунизације. Проценти су приказани као средња+SE (репрезентативни експеримент од по 6 мишева по групи). У анализи је коришћен *Student t-test* и *Kruskal Wallis*, *p<0.05, **p<0.005.

Што је још важније, бојење тетрамерима којима се детектују ћелије специфичне за вирусне епитопе pp89 и m164, указује да IFN- γ позитивни CD8+ лимфоцити у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева по рестимулацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом нису специфични за ове вирусне епитопе (Слика 7). Овај налаз указује да су међу инфламацијским CD8+ лимфоцитима у инфилтратима присутним у ЦНС-у мишева који развијају неуроинфламацију после вирусне инфекције присутне MOG₃₅₋₅₅ специфичне што указује да CD8+ лимфоцити доприносе развоју аутоимунске неуроинфламације.

Слика 7

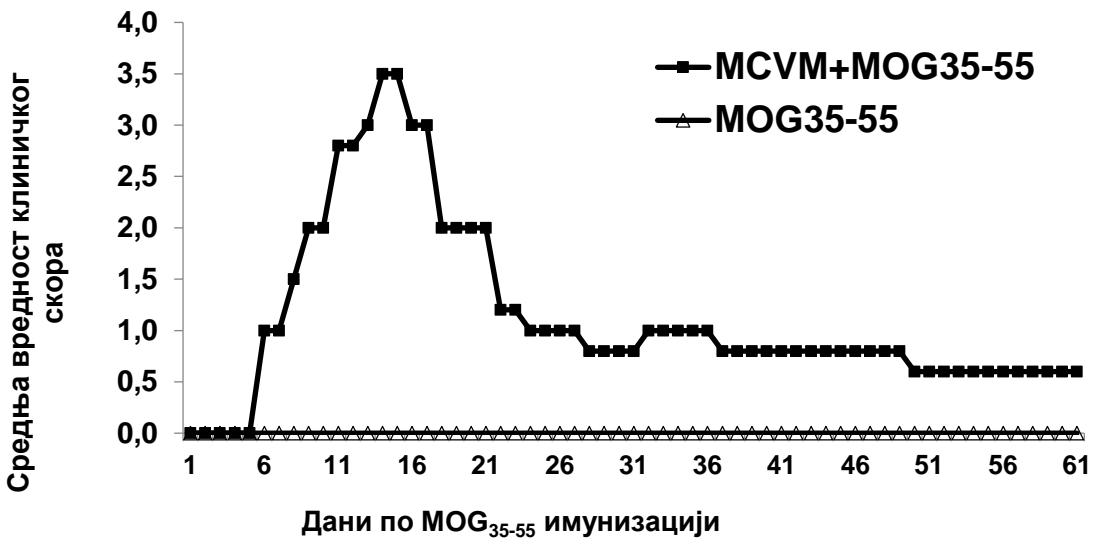


Слика 7. CD8+ Т лимфоцити изоловани из ЦНС-а BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом који после *in vitro* рестимулације MOG₃₅₋₅₅ пептидом продукују IFN- γ нису специфични за вирусне епитопе pp89 и m164. Приказани су репрезентативни FACS плотови који приказују проценат IFN- γ + вирусни епитоп+ ћелија у популацији CD4+ лимфоцита. Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c, MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева и *in vitro* рестимулисаних MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

4.7. Хронична непродуктивна MCMV инфекција омогућава настанак ЕАЕ код BALB/с мишева

Како би се испитало да ли и дуготрајна хронична непродуктивна MCMV инфекција може да утиче на настанак ЕАЕ, BALB/с мишеви су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ три месеца (90 дана) по инфекцији MCMV-ом у адултном периоду. Праћене су клиничке манифестације ЕАЕ 60 дана. Инфицирани мишеви су развили клиничке знаке ЕАЕ док мишеви који су само имунизовани енцефалитогеном нису. Мишеви са хроничном непродуктивном MCMV инфекцијом су почели да манифестују знаке ЕАЕ шест дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом што је раније у поређењу са појавом болести код C57BL/6 мишева имунизованих на исти начин, као и у поређењу са почетком болести код BALB/с мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом на самом почетку хроничне фазе MCMV инфекције; максимални клинички скор су достигли 15 дана по имунизацији и имали су благо изражене знаке болести и 60 дана после имунизације (Графикон 17).

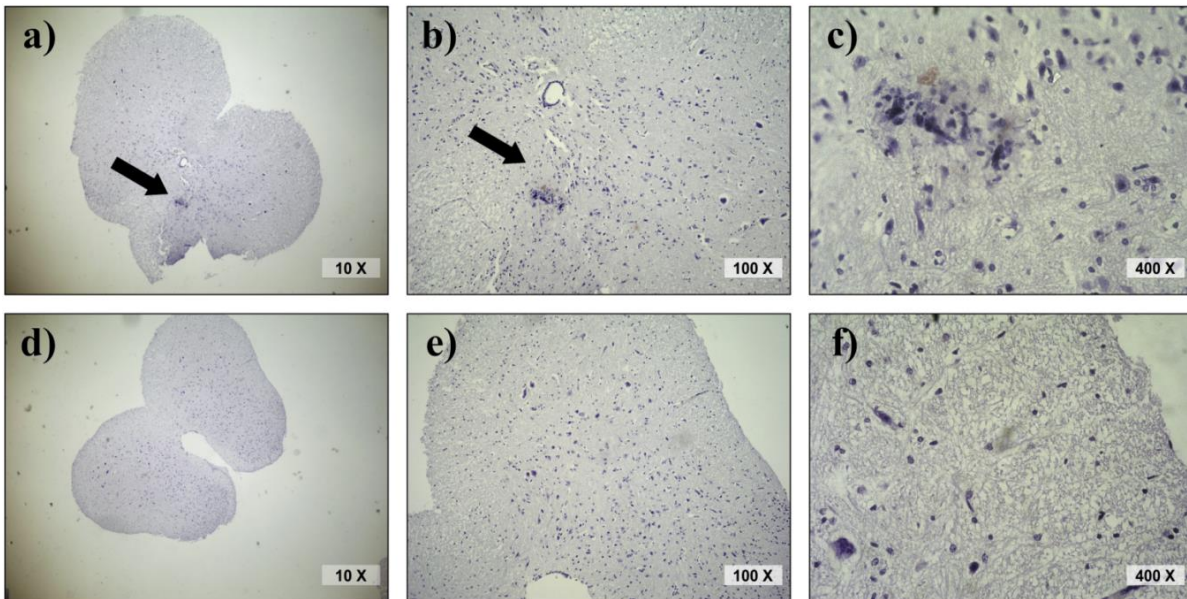
Графикон 17



Графикон 17. BALB/с мишеви са латентном MCMV инфекцијом развијају ЕАЕ По инфекцији мишева цитомегаловирусом и имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ три месеца касније, праћен је клинички ток болести 60 дана. Приказане су средње вредности клиничког скорa 60 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом у MCMV+MOG₃₅₋₅₅ групи и MOG₃₅₋₅₅ групи BALB/с мишева. Приказани примери су из експеримента са 7 мишева по групи.

Хронична болест је потврђена хистолошком анализом. Периваскуларни инфилтрати су детектовани у кичменој моздини мишева са хроничном непродуктивном МСМV инфекцијом и два месеца по апликовању MOG₃₅₋₅₅ пептида (Слика 8).

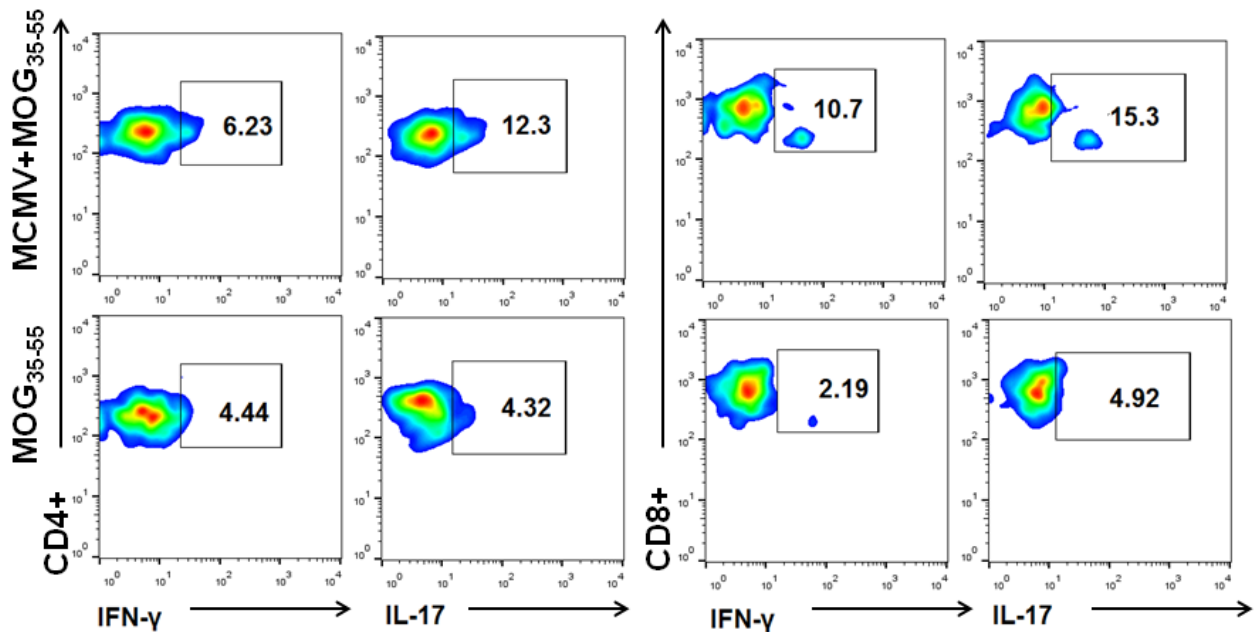
Слика 8



Слика 8. Дуготрајно перзистурање периваскуларних инфилтрата у кичменој моздини мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у фази хроничне непродуктивне инфекције. Репрезентативни примери исечака кичмене моздине 60 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом у МСМV+MOG₃₅₋₅₅ групи (a-c) и MOG₃₅₋₅₅ групи (d-f). С) Приказани примери су из репрезентативног експеримента са 7 мишева по групи.

Међу ћелијама изолованим из мозга BALB/c мишева, који су три месеца по инфекцији MCMV-ом имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом и два месеца касније жртвовани, а потом *in vitro* рестимулисаним ћелија, пептидом MOG₃₅₋₅₅, већи је проценат CD4⁺ и CD8⁺ ћелија које садрже инфламацијске цитокине IL-17 и IFN- γ , у поређењу са стимулираним ћелијама изолованим из BALB/c мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Слика 9).

Слика 9



Слика 9. Репрезентативни примери проточне цитометрије приказују проценат IL-17 и IFN- γ експримирајућих CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита међу мононуклеарима изолованим из мозга 60 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

На основу наведеног се закључује да BALB/c мишеви са латентном MCMV инфекцијом развијају ЕАЕ са дуготрајним инфилтратима у ЦНС-у који садрже лимфоците специфичне за неуроантигене.

4.8. Инфекција МСМV-ом конвертује микроглију у М1 фенотип

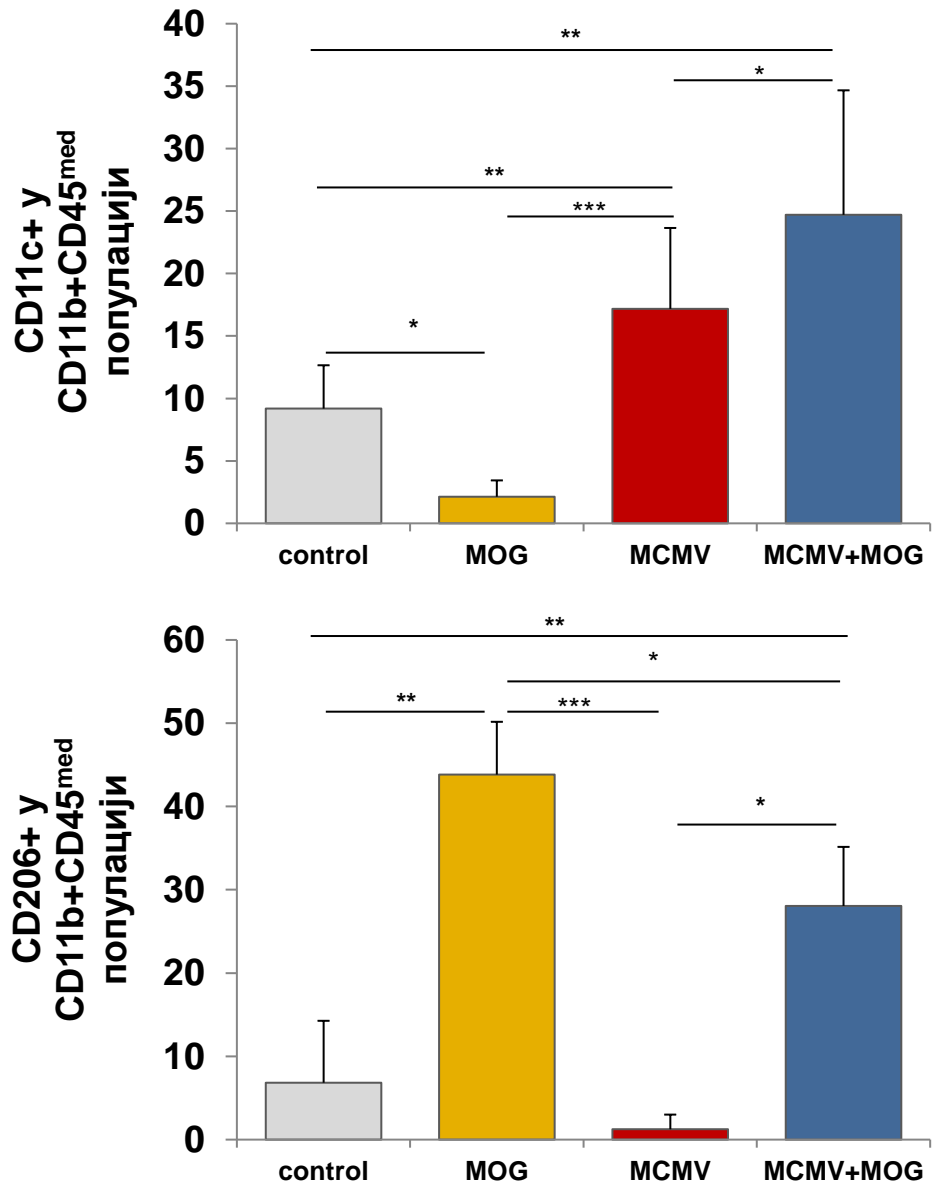
Пошто МСМV инфекција BALB/c мишева узрокује системску инфламацију, а познато је да се системска инфламација одражава на функционални статус микроглије, испитани су ефекти МСМV инфекције на фенотип антиген презентујућих ћелија у ЦНС-у. Анализирана је експресија маркера класичне (CD11c) и алтернативне активације (CD206) у популацији микроглије (CD45^{int}CD11b+) у мононуклеарним ћелијама изолованим из: здравих мишева, мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅, инфицираних МСМV-ом и инфицираних МСМV-ом и десет дана касније имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Као што је приказано на Графикону 18 микроглија мишева који су инфицирани вирусом у адултном периоду без накнадне имунизације енцефалитогеном као и групе мишева инфицираних и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је имала проинфламацијски М1 фенотип. Значајно већи проценат CD11c експримирајућих ћелија у популацији микроглије је био у обе групе инфицираних мишева у поређењу са здравим и мишевима само имунизованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

На другој страни највећи проценат М2 микроглије (тип 2), CD206 експримирајућа микроглија, је био код MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишева. Већи проценат М2 микроглије је откривен у групи МСМV+MOG₃₅₋₅₅ мишева у поређењу са здравим и МСМV инфицираним мишевима, али мањи у поређењу са групом мишева само имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Већи проценат М2 микроглије код мишева који развијају болест и то у време максималног испољавања болести може да буде компензаторни механизам који претходи атенуацији болести.

Значи, у групи мишева само инфицираних вирусом у адултном периоду значајно је већи проценат М1 микроглије, док је у групи мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ највећи проценат М2 микроглије, тако рећи нема М1 микроглије.

Вирусна инфекција конвертује микроглију из М2 у М1 фенотип, али је нешто више М2 микроглије у групи МСМV+MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са мишевима који су примили само вирус.

Графикон 18

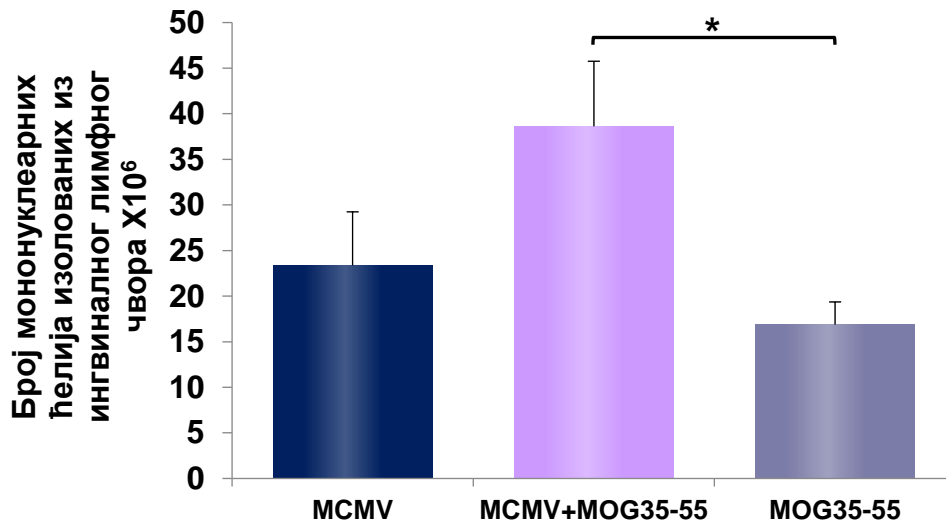


Графикон 18. Инфекција цитомегаловирусом индукује развој M1 микроглије код BALB/c мишева. Приказани су проценти CD11c+ (M1) и CD206+ (M2) ћелија у популацији микроглије CD11b+CD45^{med} у ЦНС-у BALB/c мишева 15 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅, односно 25 дана по инфекцији вирусом. Статистичка значајност разлике у броју изолованих ћелија међу наведеним групама мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005. Приказани су резултати из репрезентативног експеримента од по 8 мишева по групи.

4.9. Имунизација енцефалитогеном после инфекције MCMV-ом је праћена значајним повећањем целуларности дренажујућих лимфних чворова и повећањем броја Т лимфоцита у њима

Показано је да инфекција MCMV-ом укида резистенцију BALB/c мишева на индукцију ЕАЕ, након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅, карактерисани су инфилтрати у ЦНС-у па је следећи корак био да се испита утицај вирусне инфекције на фазу индукције болести. Анализиран је састав мононуклеарних ћелија добијених из ингвиналних лимфних чворова BALB/c мишева два дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ и 12 дана по вирусној инфекцији (MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Контролне групе су биле: BALB/c мишеви који су само инфицирани вирусом (MCMV) и BALB/c мишеви само имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅.

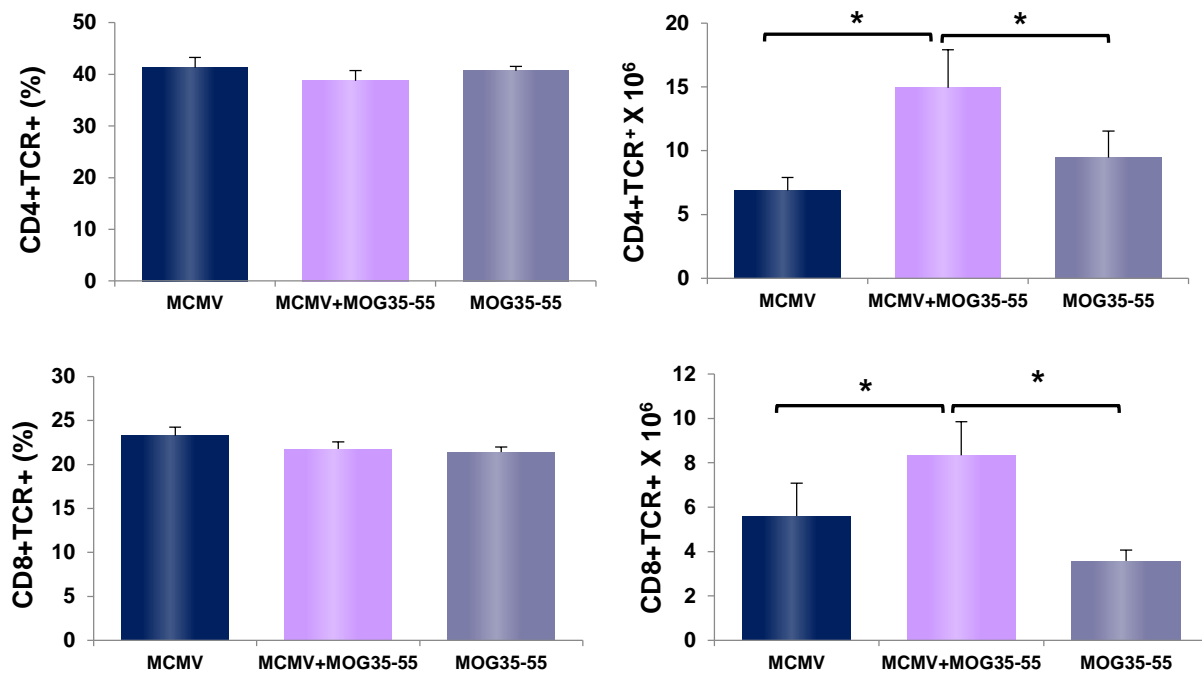
Графикон 19



Графикон 19. Дренажујући лимфни чворови мишева који развијају ЕАЕ су најцелуларнији. Изоловане су мононуклеарне ћелије из дренажујућих ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом). Број изолованих мононуклеарних ћелија је добијен појединачно за сваког миша бројањем у *Neubauer*-ов комори након бојења трипан плавим. Приказана је средња вредност броја + SE изолованих мононуклеарних ћелија из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике броја изолованих мононуклеара је одређена *Student*-овим t тестом, *P<0.05.

Вирусна инфекција је утицала на значајно повећање регионалних лимфних чворова. Број изолованих мононуклеарних ћелија из ингвиналних лимфних чворова обе групе BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом је већи у поређењу са бројем ових ћелија изолованих из лимфних чворова мишева имунизованих само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 19). Међутим, овај број је достигао статистичку значајност ($p < 0.05$) само за групу животиња MCMV+MOG у поређењу са MOG₃₅₋₅₅ имунизованим мишевима (Графикон 19).

Графикон 20



Графикон 20. Имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ након вирусне инфекције значајно повећава број CD4+TCR+ и CD8+TCR+ лимфоцита у регионалним лимфним чворима. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и проценат CD4+TCR+ и CD8+TCR+ ћелија је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD4+TCR+ и CD8+TCR+ ћелија је добијен појединачно за сваког миша. Приказана је средња вредност процента и броја + SE изолованих CD4+TCR+ и CD8+TCR+ ћелија из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних ћелија међу групама је одређена Student-овим t тестом, * $P < 0.05$.

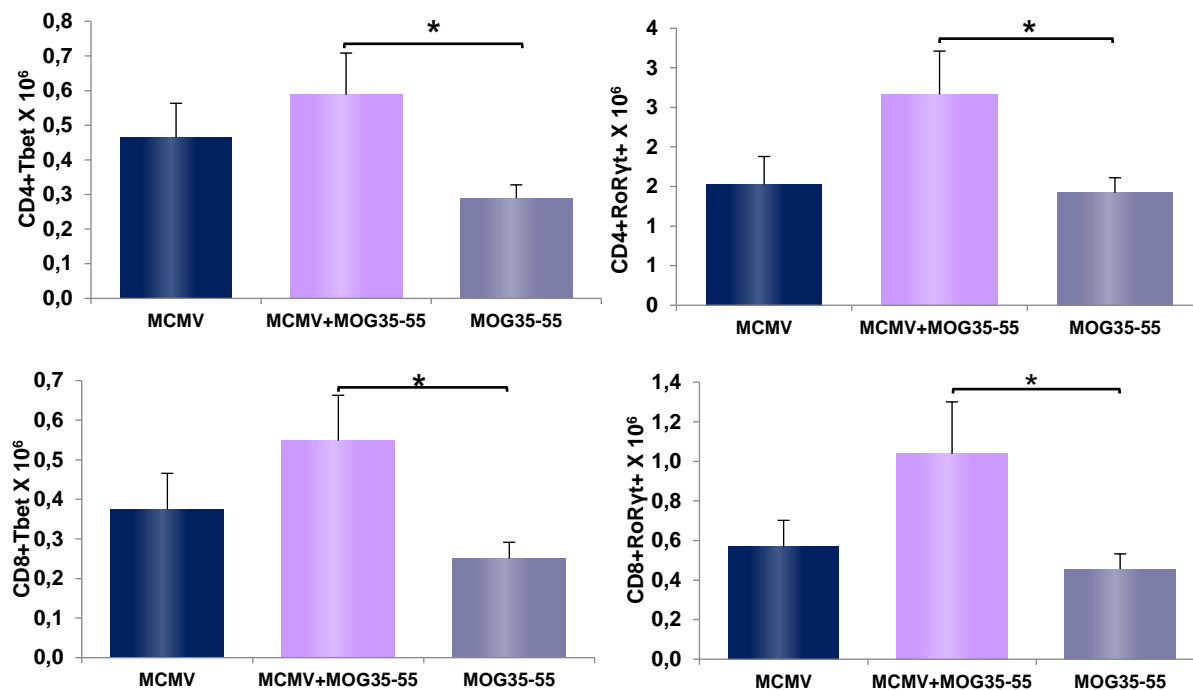
Пошто је за иницијалне фазе развоја ЕАЕ кључно присуство CD4+ Т лимфоцита, а сама вирусна инфекција активира CD8+ лимфоците анализирано је присуство ових ћелија у дренажу, ингвиналним лимфним чворовима све три групе мишева. Нема статистички значајне разлике у проценту CD4+TCR+ лимфоцита у ингвиналним лимфним чворовима међу групама MCMV+MOG₃₅₋₅₅, MCMV и MOG₃₅₋₅₅. Вирусна инфекција није утицала на повећање процента ових ћелија у регионалном лимфном чвору али је број CD4+TCR+ лимфоцита највећи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅, статистички значајно већи ($p < 0.05$) у поређењу са остале две групе мишева (Графикон 20). Исти резултати су добијени и анализом процента и броја CD8+TCR+ ћелија изолованих у наведене три групе мишева (Графикон 20).

4.10. Инфекција MCMV-ом и имунизација енцефалитогеном VALB/c мишева је праћена индукцијом развоја проинфламацијских Т лимфоцита у дренажућим лимфним чворовима у раној фази индукције ЕАЕ

Даља анализа фенотипских карактеристика Т лимфоцита је показала да је апсолутни број CD4+Т лимфоцита који експримирају Tbet, маркер Th1 лимфоцита, и RoR γ t, маркер Th17 лимфоцита, статистички значајно већи ($p < 0.05$) у лимфним чворовима мишева два дана после имунизације енцефалитогеном и 12 дана после инфекције вирусом у поређењу са групом мишева само инфицираних вирусом као и групом само MOG₃₅₋₅₅ имунизованих мишева (Графикон 21). Иста разлика међу групама је забележена и анализом апсолутног броја CD8+Tbet+ и CD8+RoR γ t+ ћелија у лимфним чворовима испитиваних мишева (Графикон 21).

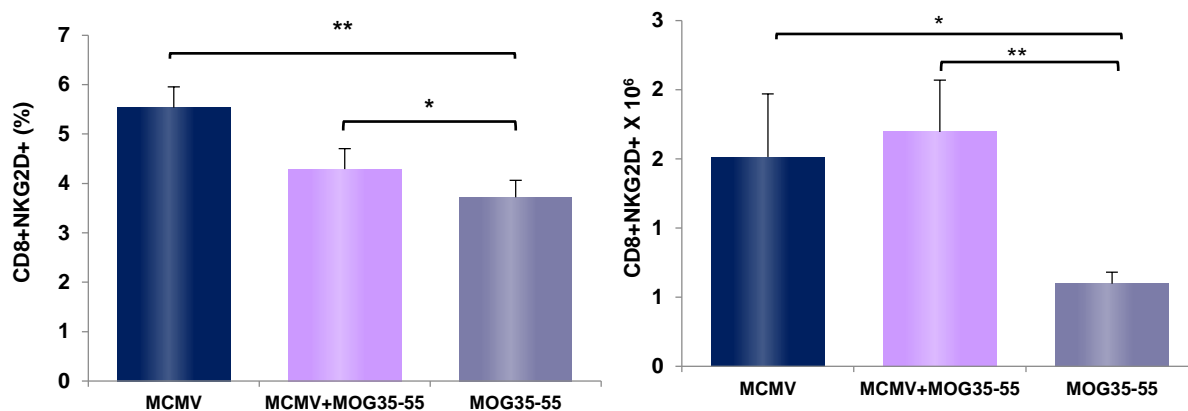
Вирусна инфекција може да изазове повећање експресије NKG2D, молекула који појачава ефекторске функције самих ћелија које га експримирају, на различитим популацијама ћелија, између осталих и на CD8+ лимфоцитима, па ја анализирано присуство CD8+ ћелија које експримирају овај маркер у лимфним чворовима MCMV+MOG₃₅₋₅₅, MCMV и MOG₃₅₋₅₅ мишева у фази индукције болести. Како се уочава на Графикону 22 проценат CD8+ NKG2D+ ћелија је статистички значајно већи у обе групе мишева које су инфициране вирусом MCMV+MOG₃₅₋₅₅ ($p < 0.05$) и MCMV ($p < 0.005$) у поређењу са мишевима само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Процент CD8+ NKG2D+ ћелија је највећи у групи MCMV али та разлика у поређењу са другом групом инфицираних мишева који су 10 дана после инфекције имунизовани енцефалитогеном није статистички значајна (Графикон 22). Међутим, број CD8+ NKG2D+ ћелија је највећи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅. Апсолутни број CD8+ NKG2D+ ћелија је најамњи у групи MOG₃₅₋₅₅ и та разлика је статистички значајна и у поређењу са групом MCMV+MOG₃₅₋₅₅ ($p < 0.005$) и групом MCMV ($p < 0.05$) (Графикон 23).

Графикон 21



Графикон 21. У групи мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ број изолованих CD4+T лимфоцита је статистички значајно мањи у односу на друге групе мишева али је зато број изолованих CD4+T и CD8+T лимфоцита статистички значајно већи у односу на мишове који су само имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и број CD4+ и CD8+ лимфоцита који су Tbet+ и RORγt+ је анализиран проточном цитометријом при чему су бројеви израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD4+ и CD8+ ћелија које су Tbet+ и RORγt+ је добијен појединачно за сваког миша. Приказана је средња вредност процента и броја + SD изолованих CD4+ и CD8+ ћелија Tbet+ и RORγt+ из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике броја испитиваних ћелија међу групама је одређена Student-овим t тестом. *P<0.05, **P<0.005.

Графикон 22

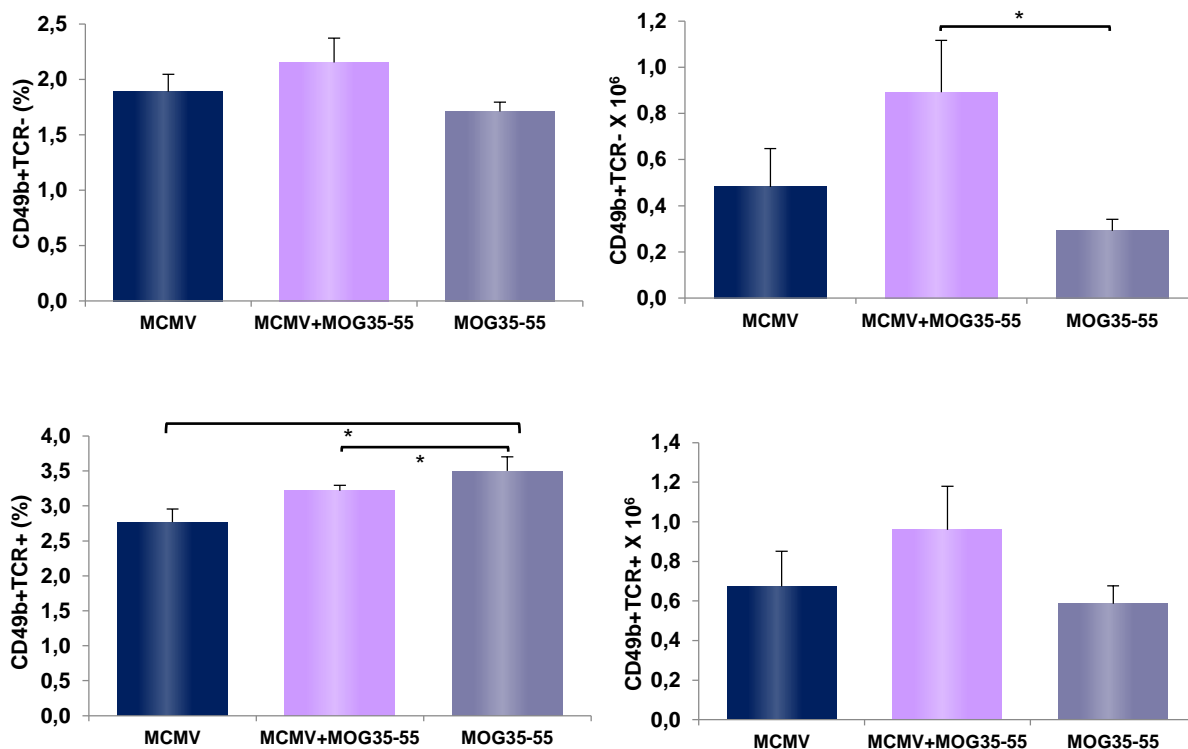


Графикон 22. MCMV+MOG₃₅₋₅₅ BALB/c мишеви имају највећи број CD8+ NKG2D+ ћелија у дренарајућем лимфном чвору. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и проценат CD8+T ћелија које су NKG2D+ је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD8 T ћелија које су NKG2D+ је добијен појединачно за сваког миша бројањем у Neubauer-ов комори након бојења трипан плавим. + SD изолованих CD8 T лимфоцита које су NKG2D+ из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних ћелија међу групама је одређена Student-овим t тестом. *P<0.05, **P<0.005.

У иницијалној фази развоја имунског одговора на вирусну инфекцију прво се активирају NK ћелије које продукују проинфламацијске цитокине који доприносе активацији дендритских ћелија. Међутим одговор NK ћелија BALB/c мишева на MCMV инфекцију је због одсуства активирајућег рецептора који препознаје MCMV неадекватан. Даље је у лимфном чвору анализирана заступељеност NK ћелија (CD49b+TCR-) као и NKT ћелија (CD49b+TCR+) које могу да се активирају компонентама присутним у адјувансу и допринесу развоју ЕАЕ. Процент CD49b+TCR- ћелија је сличан међу испитиваним групама мишева (MCMV+MOG₃₅₋₅₅, MCMV и MOG₃₅₋₅₅) (Графикон 23). Међутим апсолутни број CD49b+TCR- ћелија је највећи у групи MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и статистички је значајно већи (p<0.05) у поређењу са бројем ових ћелија присутним у лимфном чвору мишева само имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 23). Са друге стране проценат NKT ћелија је статистички значајно већи (p<0.05) у групи MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са остале

две групе испитиваних мишева MCMV+MOG₃₅₋₅₅, MCMV, мада међу групама нема разлике у апсолутном броју ћелија ове популације.

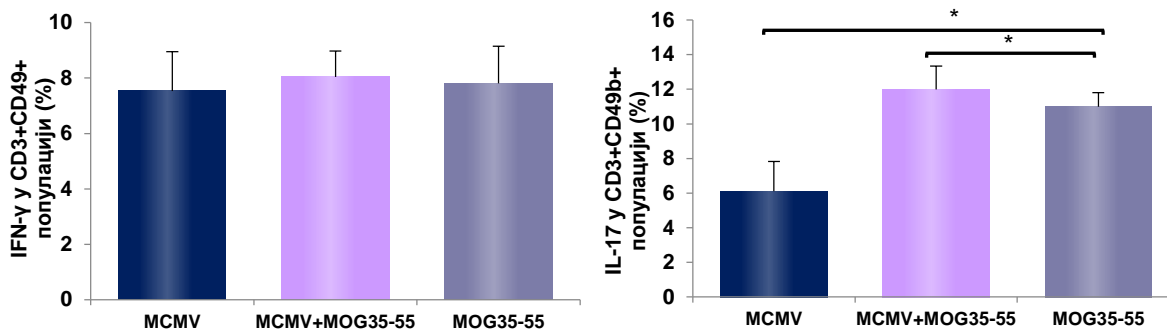
Графикон 23



Графикон 23. Лимфни чворови BALB/c мишева било да су инфицирани вирусом или не, садрже сличан проценат НК ћелија. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и проценат CD49b+TCR- и CD49b+TCR+ је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих НК ћелија које су CD49b+TCR- и NKT ћелија које су CD49b+TCR+ је добијен појединачно за сваког миша бројањем у Neubauer-ов комори након бојења трипан плавим. Приказана је средња вредност броја + SE CD49b+TCR- и CD49b+TCR+ ћелија из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних ћелија међу групама је одређена Student-овим t тестом. *P<0.05.

Даља анализа је указала на инфламацијски фенотип NKT ћелија у групама мишева имунизованих енцефалитогеном. Процент IL-17 продукујућих ћелија у оквиру популације NKT ћелија је статички значајно већи ($p < 0.05$) у групама MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са групом MCMV (Графикон 24). Међу испитиваним групама нема разлике у проценту IFN- γ продукујућих ћелија у оквиру популације NKT ћелија (Графикон 24).

Графикон 24

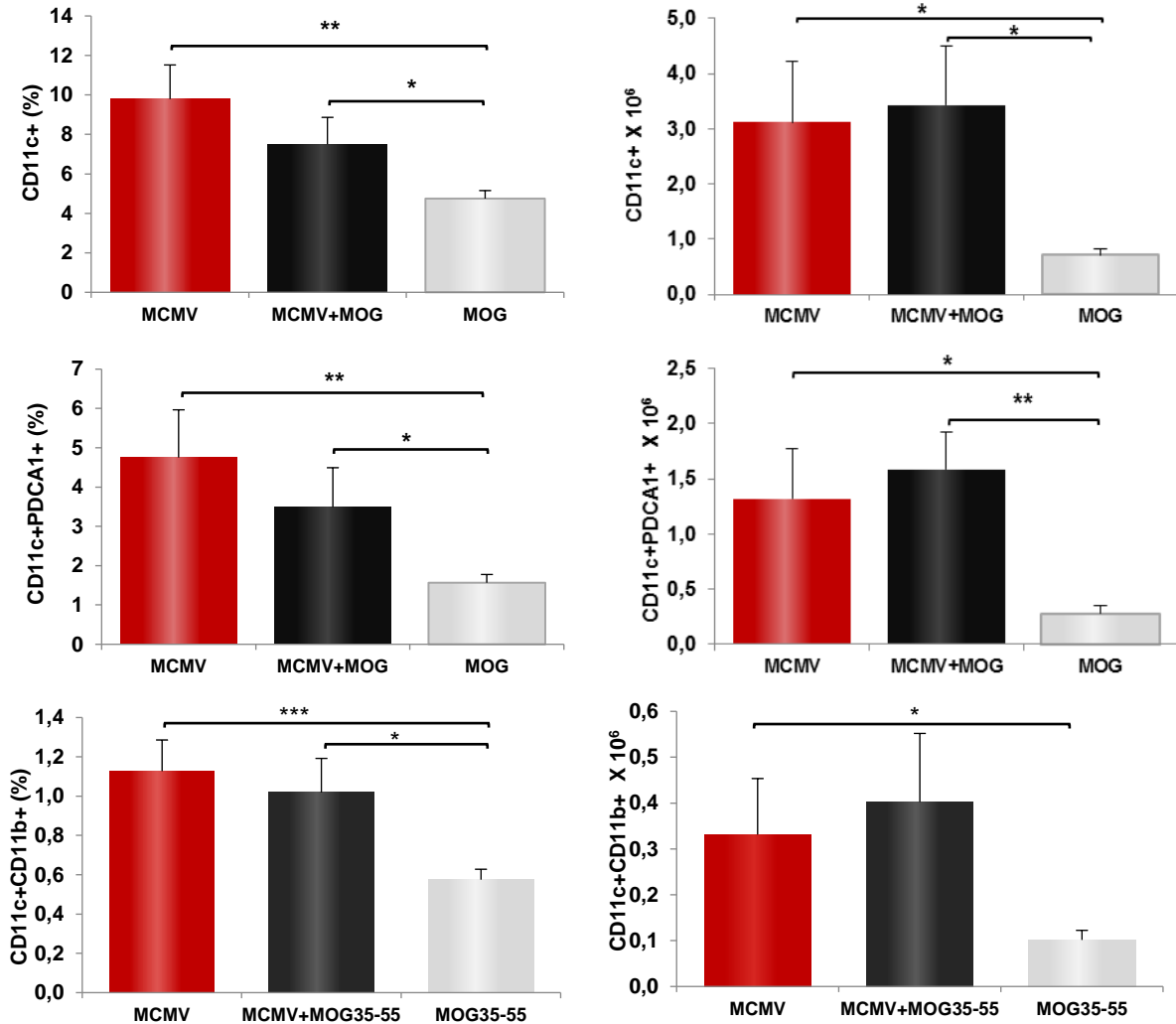


Графикон 24. Лимфни чворови BALB/c мишева имунизованих енцефалитогеном у адјувансу садрже инфламацијске NKT ћелије. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅ (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом) и BALB/c MOG₃₅₋₅₅ мишева (2 дана по имунизацији MOG₃₅₋₅₅ пептидом). Процент IL-17 и IFN- γ продукујућих ћелија је анализиран у популацији CD49b+TCR+ ћелија, проточном цитометријом. Приказана је средња вредност проценат + SE из репрезентативног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних ћелија међу групама је одређена *Student*-овим *t* тестом. * $P < 0.05$.

4.11. MCMV инфекција индукује инфламацијски фенотип антиген презентујућих ћелија на периферији

Познато је да вирусна инфекција индукује антивирусни имунски одговор посредован НК ћелијама, CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитима. Такво инфламацијско микроокружење у периферним лимфним органима може да погодује активацији антиген презентујућих ћелија и тако индиректно допринесе настанку инфламацијских лимфоцита. Пошто је показано да хронична непродуктивна MCMV инфекција повећава осетљивост на развој ЕАЕ, даље су анализирани карактеристике дендритских ћелија у дренажу лимфним чворовима два дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅, односно 12 дана по инфекцији MCMV-ом. У ингвиналним лимфним чворовима, у групи MCMV инфицираних и MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева је присутан значајно већи проценат и број CD11c⁺ дендритских и CD11c⁺PDCA1⁺ плазмацитоидних дендритских ћелија у поређењу са MOG₃₅₋₅₅ имунизованим мишевима (Графикон 25). Наиме, проценат CD11c⁺ дендритских ћелија у обе групе мишева инфицираних вирусом, групи BALB/c MCMV мишева и BALB/c MCMV+MOG₃₅₋₅₅, је статистички значајно већи ако се пореди са групом животиња која је само имунизована пептидом MOG₃₅₋₅₅ и ова статистичка значајност се одржава и у приказу укупног броја изолованих CD11c⁺ дендритских ћелија. На Графикону 25 се уочава и да је апсолутни број изолованих ћелија већи у групи мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на само вирусом инфицирану групу мишева. Сама инфекција MCMV-ом утиче на статистички значајно повећање процента плазмацитоидних дендритских ћелија, CD11c⁺PDCA1⁺, у обе групе мишева инфицираних вирусом у односу на групу мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. У групи мишева који су једино имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅, није било повећања процента плазмацитоидних дендритских ћелија, CD11c⁺PDCA1⁺. Такође број плазмацитоидних дендритских ћелија CD11c⁺PDCA1⁺ у лимфним чворовима обе групе мишева инфицираних вирусом, MCMV и MCMV+MOG, је статистички значајно већи у поређењу са групом мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.

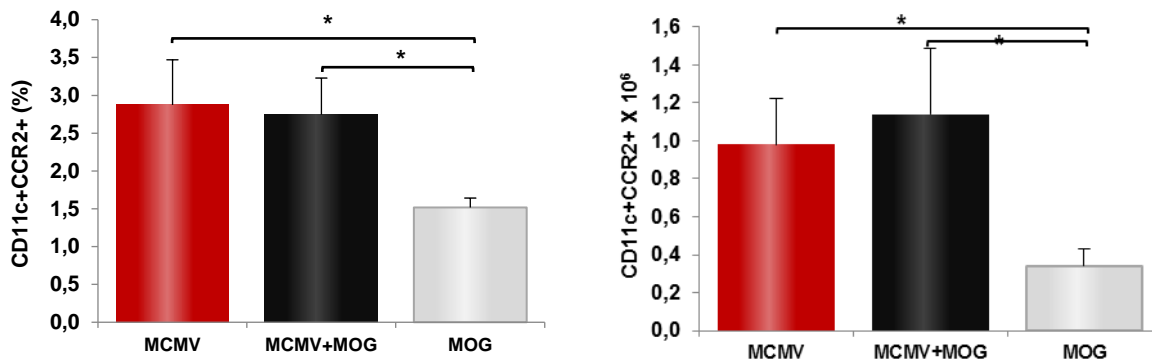
Графикон 25



Графикон 25. Лимфни чворови BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом садрже значајан проценат и број CD11c+ CD11c+PDCA1+ и CD11c+CD11b+ дендритских ћелија. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и проценат дендритских ћелија CD11c+, плазмацитоида дендритских ћелија CD11c+PDCA1+ и мијелоидних дендритских ћелија CD11c+CD11b+ је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD11c+ и CD11c+PDCA1+ ћелија је добијен појединачно за сваког миша бројањем у *Neubauer*-ов комори након бојења трипан плавим. Процент и број изолованих ћелија је приказан као средња вредност + SE из репрезентативног експеримента са укупно 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних CD11c+, CD11c+PDCA1+ и CD11c+CD11b+ ћелија између наведених група мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001

У лимфним чворовима обе групе мишева који су инфицирани вирусом, MCMV и MCMV+MOG₃₅₋₅₅, и проценат и број инфламацијских мијелоидних ћелија CD11c+CD11b+ које често имају инфламацијски фенотип су статистички значајно већи у поређењу са групом мишева који су једино имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 25). С обзиром да MCMV кодира синтезу аналога хемокина CCL2 који привлачи CCR2+ ћелије, анализиран је и проценат дендритских ћелија које експримирају CCR2 хемокински рецептор. Ове ћелије би требало да буду привучене продукцијом хемокина заражених вирусом на место продукције наведеног хемокина.

Графикон 26

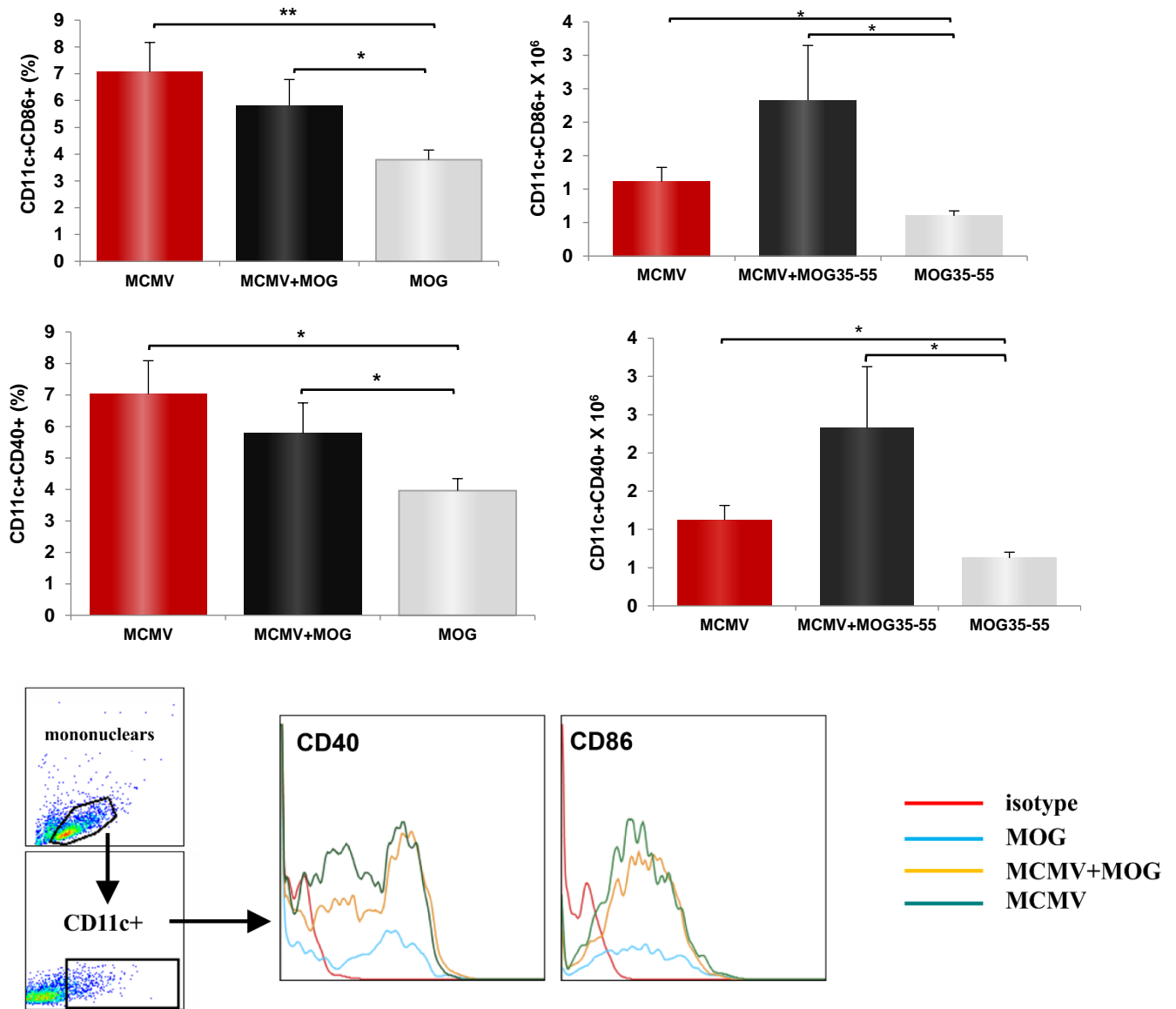


Графикон 26. Инфекција цитомегаловирусом утиче на значајно повећање броја дендритских ћелија које експримирају хемокински рецептор CCR2+ у регионалном лимфном чвору. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и проценат CD11c+дендритских ћелија које експримирају хемокински рецептор CCR2+ је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD11c+CCR2+ дендритских ћелија је добијен појединачно за сваког миша бројањем у Neubauer-ов комори након бојења трипан плавим. Процент и број изолованих ћелија је приказан као средња вредност + SE из репрезентативног експеримента са укупно 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних CD11c+CCR2+дендритских ћелија између наведених група мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05.

Процент и број дендритских ћелија које експримирају CCR2 хемокински рецептор је статистички значајно већи у обе групе мишева инфицираних MCMV-ом у поређењу са групом мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. (Графикон 26). Процент дендритских ћелија које експримирају хемокински рецептор CCR2⁺ је статистички значајно већи у групи мишева који су инфицирани вирусом у поређењу са групом мишева који су само имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅. И анализа броја изолованих дендритских ћелија из ингвиналног лимфног чвора које су CD11c+CCR2⁺ је дала исте резултате. Овај број је значајно већи у групама мишева које су инфициране вирусом, MCMV и MCMV+MOG, у поређењу са групом мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.

Даља анализа фенотипа дендритских ћелија дренажујућег лимфног чвора је показала да је процент и број изолованих CD11c⁺ активираних дендритских ћелија које експримирају маркере активације CD86⁺ и CD40⁺ значајно већи у групама мишева инфицираних вирусом, MCMV и MCMV+MOG₃₅₋₅₅, у поређењу са групом мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 27). Број CD11c+CD86⁺ и CD11c+CD40⁺ дендритских ћелија највећи је у групи животиња које су инфициране MCMV-ом и имунизоване пептидом MOG₃₅₋₅₅. Такође анализа експресије маркера активације CD86⁺ и CD40⁺ у популацији CD11c⁺ ћелија је указала да вирусна инфекција повећава експресију ових маркера на дендритским ћелијама (Графикон 27). Експресија CD86⁺ и CD40⁺ у популацији CD11c⁺ ћелија је најмања у групи мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.

Графикон 27

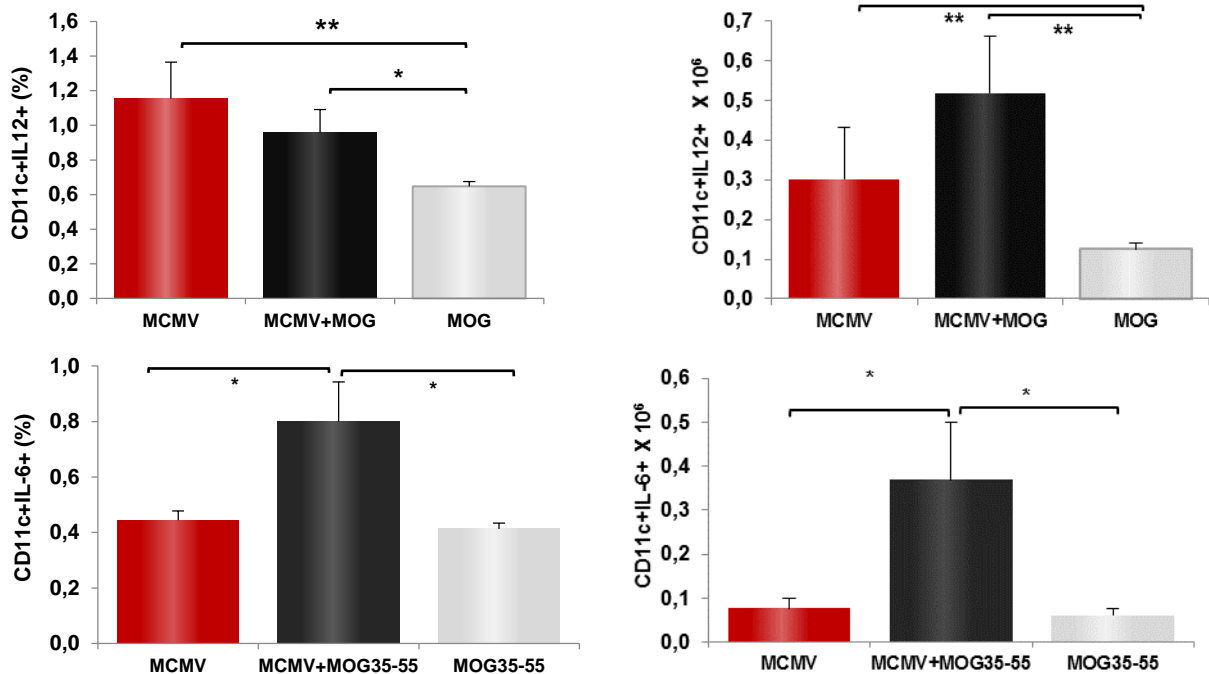


Графикон 27. Вирусна инфекција повећава и проценат и апсолутни број CD11c+CD86+ и CD11c+CD40+ дендритских ћелија у лимфном чвору. Инфекција цитомегаловирусом утиче на значајно повећање дендритских ћелија које експримирају хемокински рецептор CCR2+ у регионалном лимфном чвору. Изоловане су мононуклеарне ћелије из регионалних ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и проценат CD11c+CD86+ и CD11c+CD40+ дендритских ћелија је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD11c+CD86+ и CD11c+CD40+ дендритских ћелија је добијен појединачно за сваког миша бројањем у Neubauer-ов комори након бојења трипан плавим. Процент и број изолованих ћелија је приказан као средња вредност + SE из репрезентативног експеримента са укупно 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних CD11c+CD86+ и CD11c+CD40+ дендритских ћелија између наведених група мишева је одређена Student-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01.

4.12. Дендритске ћелије које долазе у лимфни чвор услед инфламацијског стимулуса су проинфламацијске

Дендритске ћелије у обе групе мишева инфицираних МСМV-ом су инфламацијске, у значајно већем проценту и броју експримирају ИL-12 у поређењу са групом мишева само имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 28). При том је број CD11c+ИL-12+ дендритских ћелија међу моноклеарним ћелијама изолованим из лимфних чворова МСМV+MOG₃₅₋₅₅ мишева скоро двоструко већи у поређењу са групом мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Још једна потврда да су дендритске ћелије које долазе у лимфни чвор инфламацијске проистиче из налаза значајног процента дендритских ћелија које експримирају ИL-6. ИL-6 је цитокин који је неопходан за развој ЕАЕ и има важну улогу у патогенези мултипле склерозе. Интересантно је напоменути да је проценат дендритских ћелија које експримирају ИL-12 велики и сличан у обе групе мишева који су инфицирани вирусом. Међутим када се посматрају дендритске ћелије које експримирају ИL-6, проценат је највећи у групи мишева који су инфицирани вирусом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ и статистички је значајно већи у односу на остале две групе мишева-групу само инфицираних вирусом и групу мишева само имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Из тога закључујемо да вирусна инфекција на неки начин омогућава да по каснијој имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ настану дендритске ћелије које ће да подстакну енцефалитогени потенцијал Т лимфоцита, а за то је потребан ИL-6. Сама имунизација BALB/с мишева пептидом MOG₃₅₋₅₅ нема такав ефекат и нема повећања процента дендритских ћелија које експримирају ИL-6. И на графикону 28 који приказује број CD11c+ ћелија које експримирају ИL-6 се уочава да је највећи број ових ћелија у групи мишева који су развили болест (МСМV+MOG₃₅₋₅₅).

Графикон 28



Графикон 28. У вирусној инфекцији дендритске ћелије које долазе у лимфни чвор услед инфламацијског стимулуса су проинфламацијске. Инфекција цитомегаловирусом утиче на значајно повећање CD11c+IL12+ и CD11c+IL6+ дендритских ћелија у регионалном лимфном чвору. Изазоване су мононуклеарне ћелије из регионалних ингвиналних лимфних чворова BALB/c MCMV (12 дана по инфекцији вирусом), BALB/c MCMV+MOG (12 дана по инфекцији вирусом и 2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и BALB/c MOG мишева (2 дана по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅) и проценат CD11c+IL12+ и CD11c+IL6+ дендритских ћелија је анализиран проточном цитометријом при чему су проценти израчунати као средња вредност појединачних процената добијених по мишу. Број изолованих CD11c+IL12+ и CD11c+IL6+ дендритских ћелија је добијен појединачно за сваког миша бројањем у *Neubauer*-ов комори након бојења трипан плавим. Процент и број изолованих ћелија је приказан као средња вредност + SE из репрезентативног експеримента са укупно 8 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике процента и броја испитиваних CD11c+CD86+ и CD11c+CD40+ дендритских ћелија између наведених група мишева је одређена *Student*-овим t тестом; *P<0.05, **P<0.01. Mann whitney тест је коришћен за анализу броја изолованих ћелија из лимфног чвора.

5. ДИСКУСИЈА

ЕАЕ је експериментални модел за мултиплу склерозу који иако не покрива читав спектар клиничких, патолошких и имунских карактеристика болести ипак има бројне одлике које има и МС. Бројни модели се користе за проучавање различитих аспеката инфламације, демиелинизације, ремиелинизације и неуродегенерације. Доказано је да коришћење ЕАЕ као модела за тестирање дефинисаних хипотеза може да представља веома добру основу за разумевање специфичних патогенетских механизма не само у мултиплој склерози, него и уопштено у развоју аутоимунских болести (279). Модели ЕАЕ који настају индукцијом аутореактивних CD4⁺ Т лимфоцита се углавном користе за проучавање улоге инфламације у патогенези МС.

5.1. Инфекција CMV-ом чини BALB/c мишеве осетљивим на индукцију ЕАЕ

Инфекција, нарочито вирусима, се одавно сматра једним од главних фактора околине који утиче на патогенезу МС. У ЕАЕ моделу је показано да скоро 100% трансгених мишева који експримирају TCR специфичан за имунодоминантни епитоп мијелинског омотача (MBP₁₋₁₁) спонтано развијају ЕАЕ уколико се гаје у нестерилним условима, а ако се гаје у *specific-pathogen-free* условима овакви мишеви остају здрави (52). Штавише ови мишеви имунизовани аутоантигеном у комплетном адјувансу, али без токсина пертусиса гајени у стерилним условима такође нису развили болест јер без обзира на присуство великог броја активираних специфичних лимфоцита нису постојали услови за њихов пролазак кроз крвно-мождану баријеру (280). Ови и други експериментални подаци као и резултати клиничких студија указују на улогу опортунистичких микроорганизама (30), како и коменсалне микрофлоре црева у активацији аутоимунских процеса (28). Утврђено је и да варијације у саставу микрофлоре црева утичу на инциденцу болести (281).

Иако је описана корелација између неколико различитих вирусних инфекција и развоја МС, ни за један вирус није нађена директна узрочно последична веза. Углавном се за развој мултипле склерозе везују вируси из фамилије *Herpetoviridae*, међу њима нарочито *Epstein-Barr* вирус (282), што је потврђено и у мишијем моделу (283). Други вирус из ове фамилије,

Cytomegalovirus, се такође помиње као могући декланширајући фактор за МС (284). Показана је корелација између повећане концентрације серумских IgG специфичних за CMV и системског лупуса (285), а подаци о вези мултипле склерозе и CMV су контроверзни (282). На позитивну корелацију између инфекције CMV-ом и развоја мултипле склерозе указују: налази повећаног титра антитела специфичних за антигене CMV као и вирусне ДНК код оболелих од мултипле склерозе (286); краће време између релапса и израженији релапси код оболелих од мултипле склерозе који имају и антитела специфична за CMV (59); израженија атрофија сиве мождане масе и целог мозга код оболелих од мултипле склерозе уколико имају и анитела на CMV (60); инфекција CMV-ом индукује експанзију проинфламацијских ефекторско-меморијских CD4+CD28^{null} Т лимфоцита које се углавном налазе код особа оболелих од мултипле склерозе и то у лезијама у ЦНС-у где их привлачи градијент CX3CL1 (287, 288), а стимулација ових ћелија аутоантигенима мијелина резултује пролиферацијом и ослобађањем цитотоксичких гранула што може да допринесе развоју оштећења у МС (289).

Супротно, резултати других студија указују да инфекција CMV-ом штити од развоја МС. Показано је да присуство антитела специфичних за CMV указује на мању инциденцу и краћи релапс и мање изражену атрофију мозга (290); здраве особе код којих је доказана латентна инфекција CMV-ом имају мању шансу за развој мултипле склерозе (283); особе инфициране CMV-ом у раном детињству имају мању шансу да оболе од мултипле склерозе до 18-те године (290).

До сада није испитан утицај инфекције MCMV-ом на развој аутоимунске неуропатологије у експерименталном моделу болести индукованом имунизацијом антигенима мијелина. Да би утврдили утицај инфекције MCMV-ом на развој мултипле склерозе BALB/c мишеви су у неонаталном и адултном периоду инфицирани MCMV-ом и после 10 дана имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅. Анализирано је клиничко испољавање болести код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом пре активне имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у адјувансу и упоређивано са испољавањем болести код C57BL/6 мишева, природно осетљивих на индукцију ЕАЕ.

Резултати овде приказане студије по први пут показују да инфекција MCMV-ом, неонаталних и адултних BALB/c мишева прекида резистенцију на индукцију ЕАЕ имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикони 1 и 8). Клинички ток болести код BALB/c

мишева инфицираних МСМV-ом 10 дана пре имунизације енцефалитогеном је сличан току болести, са типичним клиничким манифестацијама које развијају C57BL/6 мишеви (Графикон 8). Клиничке манифестације ЕАЕ, парализа репа, задњих и најзад предњих ножица, су последице оштећења нервног ткива насталог дејством ћелија имунског система које инфилтришу доминантно кичмену мождину. Хистолошке анализе су потврдиле постојање инфилтрата у кичменој моздини BALB/c мишева инфицираних МСМV-ом (Графикон 9, Слика 4), док код BALB/c *wild type* мишева инфилтрата није ни било већ су регистроване само ретке појединачне моноклеарне ћелије. Целуларност инфилтрата у ЦНС-у је у корелацији са клиничком сликом односно потврђује разлике између неинфицираних и вирусом инфицираних BALB/c мишева. Имунизовани BALB/c мишеви инфицирани МСМV-ом су развили масивну инфилтрацију и у мозданом ткиву, менингеама, периваскуларно у мозданом стаблу и церебелуму (Слика 3). Иако се „класични“ ЕАЕ описује као болест у чијој основи доминира развој инфилтрата у кичменој моздини са веома слабом инфилтрацијом мозданог паренхима (135) у последње време се описују модели ЕАЕ у којима се јавља значајна инфилтрација мозданог паренхима, доминантно у мозданом стаблу и церебелуму (291, 292), а резултати наше студије су у складу са наведеним налазима.

Резултати хистолошких анализа су потврђени испитивањем броја изолованих моноклеарних ћелија из мозга и кичмене мождине имунизованих мишева. Из мозга и кичмене мождине BALB/c мишева инфицираних цитомегаловирусом је изоловано статистички значајно више моноклеарних ћелија у поређењу са бројем ћелија изолованих из BALB/c мишева који након имунизације нису развили ЕАЕ (Графикон 10).

BALB/c мишеви инфицирани МСМV-ом у неонаталном периоду, а имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у адултном добу, развили су манифестације ЕАЕ (графикон 1) и значајан инфламацијски инфилтрат у ЦНС-у (слика 1) у поређењу са мишевима који су само инфицирани вирусом у првом дану рођења. У моделу неонаталне инфекције МСМV који је овде коришћен мишеви развијају менингоенцефалитис са развојем хистопатолошких лезија у којима су присутне инфициране ћелије окружене моно- и полиморфо- нуклеарним леукоцитима и активираним микроглијом (293). Инфилтрација у мозгу овако инфицираних мишева перзистира и по завршетку продуктивне инфекције када се репликативна форма вируса више не детектује у ЦНС-у (247). Међутим, присуство значајне моноклеарне

инфилтрације у мозгу неонатално инфицираних мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ без пораста Т лимфоцита специфичних за вирус, у поређењу са само неонатално инфицираним мишевима, (Графикон 4) указује да се код ових мишева развио и аутоимунски процес, тј да неуролошке манифестације нису само последица реактивације вируса у ЦНС-у.

Налази овде приказане студије су у сагласности са претходним истраживањима спроведеним на приматима и глодарима. Показано је да, уколико се бебама шимпанзи интрацеребрално апликује цитомегаловирус изолован из ЦНС-а шимпанзи које су развиле болест налик мултиплој склерози, оне касније развијају лезије у ЦНС-у типичне за МС, мада без клиничких симптома (63). Такође показана је унакрсна реактивност између протеина UL86 хуманог цитомегаловируса и пептида MOG₃₅₋₅₅ код *rhesus* мајмуна (294). Ћелије специфичне за цитомегаловирус могу да унакрсно реагују са пептидом MOG, одакле проистиче хипотеза да Т лимфоцити настали у току примарне инфекције могу да имају аутореактивни потенцијал када се реактивирају мијелинским антигеном. Овај репертоар може да се прошири у одговору на реактивацију инфекције МСМV као и након почетног оштећења мијелинског омотача што може да допринесе развоју хроничног аутоимунског процеса. Улога имунског репертоара који настаје после инфекције у патогенези МС је илустрована налазом да се код мармосет мајмуна након имунизације пептидом MOG₃₄₋₅₆ у инкомплетном Фројндовом адјувансу активирају само ефекторске меморијске лимфоците специфичне за цитомегаловирус али које препознају и епитопе унутар пептида MOG и да тако започиње развој прогресивне болести која личи на мултиплу склерозу (295). У једној од студија је утврђено да постоји унакрсна реактивност између пептида хуманог цитомегаловируса CMV₉₈₁₋₁₀₀₃ и пептида MOG₃₅₋₅₅ код Луис пацова. Имунизација Луис пацова пептидом MOG₃₅₋₅₅ активира и CMV специфичне лимфоците који пролиферишу и мигрирају у слезину (296). Студија указује на значај молекулске мимикрије у патогенези МС. SJL/J мишеви после имунизације PLP пептидом развијају болест која је по току слична МС, није монофазна већ има релапсе и ремисије (297). Међутим у једној студији је показано да женке SJL/J мишева инфициране вирусом вакциније са убаченим геном за PLP касније инфициране МСМV-ом развијају лезије у белој маси мозга сличне оним у ЕАЕ (298). Ова студија потврђује концепт „плодног поља“, тј. да иницијална вирусна инфекција формира „плодно поље“ повећањем броја аутореактивних лимфоцита али још увек испод критичног

нивоа, а да тек накнадна стимулација имунског одговора (на пример инфекцијом) изазива болест, вероватно механизмом посматрачке активације (298). Овај модел указује да вирусна инфекција може да индукује иницијални догађај у аутоимунском процесу, да подстакне активацију и пролиферацију аутореактивног клона/клонова, а да ће се болест клинички испољити касније услед друге инфекције, или чак понављане вирусне инфекције/реактивације. Инфекција подстиче развој инфламацијске средине која омогућава активацију претходно насталих клонова лимфоцита механизмом посматрачке активације.

5.2. CD8⁺ лимфоцити играју улогу развоју аутоимунске неуроинфламације коју развијају BALB/c мишеви имунизовани енцефалитогеном и претходно инфицирани цитомегаловирусом

Инфекција BALB/c мишева MCMV-ом пре имунизације енцефалитогеном омогућила је развој енцефалитогених лимфоцита и улазак CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у ЦНС. Ови лимфоцити својим ефекторским механизмима узрокују оштећење ЦНС-а и последичне клиничке манифестације ЕАЕ. Док код C57BL/6 мишева у инфилтратима у ЦНС-у доминирају CD4⁺ лимфоцити, у овде приказаној студији је показано да инфилтрати у ЦНС-у код BALB/c мишеви инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ садрже знатан проценат CD8⁺ лимфоцита (Графикони 3 и 10). Резултати клиничких студија и патохистолошких налаза у МС указују да CD8⁺ Т и В лимфоцити играју важну улогу одржавању инфламацијског процеса и оштећењу ткива (299). Болест коју су развили BALB/c мишеви иначе резистетни на индукцију ЕАЕ је по саставу инфилтрата сличнија мултиплој склерози у поређењу са болешћу коју развијају C57BL/6 мишеви (300).

Иницијални догађај у патогенези ЕАЕ укључује активацију CD4⁺ Т лимфоцита у периферним лимфним органима и то оних лимфоцита који су специфични за компоненте мијелинског омотача. Ови лимфоцити по активацији могу да пристигну у ликвор субарахноидног простора, проласком кроз крвно ликворну баријеру (301), или и у периваскуларни простор, проласком кроз крвно моздану баријеру. Како ендотелне ћелије крвних судова паренхима мозга не испољавају на својој површини ахезивне молекуле, сматра се да активирани Т лимфоцити иницијално пролазе из крви у субарахноидни простор кроз ендотел хороидног плесуса који конститутивно експримира селективне и интегрине

(302-304) и тако омогућавају имунски надзор ЦНС-а (305). Заправо, ендотелне ћелије хороидног плесуса, и код људи и код мишева, конститутивно експримирају хемокин CCL20 (306), а активирани CD4⁺ Т лимфоцити који имају енцефалитогени потенцијал експримирају рецептор за овај лиганд, CCR6 што потврђује мишљење о уласку активираних CD4⁺ Т лимфоцита кроз крвно-ликворну баријеру у региону хороидног плексуса.

На овај начин пристигли у ЦНС, CD4⁺ Т лимфоцити се у случају да су специфични за компоненте мијелинског омотача реактивирају у контакту са дендритским ћелијама и макрофагима који приказују мијелинске антигене у склопу молекула II класе МНС (307-310). Дендритске ћелије су у нормалним условима присутне дуж крвно-мождане баријере и у менингеама (311-313) и без обзира на релативно малу заступљеност способне су да реактивирају CD4⁺ Т лимфоците и допринесу настанку инфламације што је показано у експерименту са трансгеним мишевима код којих је експресија молекула II класе МНС била ограничена само на CD11c⁺ дендритске ћелије, а који су након пасивног трансфера CD4⁺ Т лимфоцита испољили клиничке знаке ЕАЕ (314). Реактивирани CD4⁺ Т лимфоцити пролиферишу у субарахноидном простору и формирају агрегате Т лимфоцита (315). CD4⁺ Т лимфоцити по рестимулацији продукују медијаторе који активирају микроглију субпијалног подручја и изазивају локално оштећење аксона праћено антероградним оштећењем тела неурона и Валеријановом дегенерацијом. Последично се активира дистална микроглија и удаљени ендотел (316) чиме је омогућен инфлукс активираних Т лимфоцита и кроз крвно-мождану баријеру. У периваскуларном простору се CD4⁺ Т лимфоцити реактивирају у контакту са периваскуларним макрофагима и дендритским ћелијама, а затим прелазе у мوجدани паренхим (316). За пролаз реактивираних CD4⁺ Т лимфоцита у паренхим је значајна интеракција хемокина и хемокинских рецептора, као и стимулација рецептора за TNF- α (317). Активирани Т лимфоцити и активирани антиген презентујуће ћелије након интеракције продукују бројне медијаторе запаљења који активирају ендотел, нарушавају крвно-мождану баријеру што за последију има неселективни улазак ћелија са периферије у ЦНС.

Налаз подједнаке заступљености CD8⁺ Т лимфоцита у мозгу имунизованих мишева инфицираних MCMV-ом у адултном периоду и налаз већег процента CD8⁺ Т лимфоцита у мозгу имунизованих мишева инфицираних у неонаталном периоду је слична налазима код оболелих од мултипле склерозе. Из литературе је познато да су у мозгу оболелих од

мултипле склерозе у већем проценту заступљени $CD8^+$ Т лимфоцити у поређењу са $CD4^+$ Т лимфоцитима. Показана је и олигоклонска експанзија $CD8^+$ Т лимфоцита у крви, ликвору и мозгу (318-321). МВР специфични $CD8^+$ Т лимфоцити изоловани из периферне крви особа оболелих од мултипле склерозе продукују цитокине $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ за које се зна да су проинфламацијски (323). У прилог овоме је имунохистохемијски налаз да више од 70% Т лимфоцита у акутним и хроничним лезијама мултипле склерозе продукује IL-17, као и то да су међу поменутих IL-17 продукујућим ћелијама подједнако заступљени и $CD4^+$ и $CD8^+$ Т лимфоцити (324).

Улогу $CD8^+$ Т лимфоцита у развоју болести потврђују и студије у којима је урађен пасивни трансфер $CD8^+$ Т лимфоцита у дефицијентне реципијенте, при чему су ови лимфоцити били специфични за MOG₃₅₋₅₅ и МВР (325, 326). Ефекторски механизми ћелијског одговора посредованог $CD8^+$ Т лимфоцитима укључују продукцију солубилних медијатора и директну лизу циљаних ћелија. Оштећење неурона је акутно и највећег је интензитета у раним стадијумима мултипле склерозе при чему тежина оштећења корелира са бројем $CD8^+$ Т лимфоцита у ЦНС-у (320, 321). Симптоми болести коју изазивају $CD8^+$ Т лимфоцити су последица оштећења горњег моторног неурона. Карактеристична је појава атаксије, спастичних рефлекса, некоординисаних покрета, окретања у круг и парализа задњих екстремитета тек код понеке животиње, што је углавном и уочено код BALB/с мишева инфицираних пре имунизације енцефалитогеном који у ЦНС-у у време максималног испољавања болести имају значајан проценат $CD8^+$ Т лимфоцита (Графикон 10).

У почетним студијама у којима је испитиван значај $CD8^+$ Т лимфоцита коришћењем животиња којима су деплетирани ове ћелије или $CD8$ дефицијентних мишева (327, 328) је показано да $CD8^+$ Т лимфоцити током развоја болести могу да имају и регулаторну улогу као и улогу у успостављању ремисија јер је морталитет животиња у одсуству $CD8^+$ Т лимфоцита био мањи али су релапси били учесталији.

Насупрот овом налазу је студија у којој је показано да пасивни трансфер $CD8^+$ Т лимфоцита који су специфични за MOG₃₅₋₅₅ не индукује клиничке знаке болести (329) као и подаци о ублаженим клиничким манифестацијама ЕАЕ ако се трансфер изврши у време максималног испољавања болести или по имунизацији мишева (329), што је у складу са налазима о протективној и регулаторној улози $CD8^+$ Т лимфоцита у ЕАЕ (327, 328).

Новија истраживања улоге CD8⁺ Т лимфоцита у патогенези ЕАЕ су показала да у настанку аутоимунске патологије у ЕАЕ-у могу да учествују и CD8⁺ Т лимфоцити који могу да изазову благ облик болести, али да централну улогу у патогенези болести ипак играју CD4⁺ Т лимфоцити (330). У експериментима са трансгеним NOD мишевима чији су CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити експримирају TCR специфичне за MOG показано је да једноструко трансгени мишеви са CD4⁺ Т лимфоцитима специфичним за MOG развијају тежи облик болести, док једноструко трансгени мишеви са CD8⁺ Т лимфоцитима специфичним за MOG развијају оптички неуритис и ЕАЕ који се касније развија и има блажи клинички ток. Код мишева који су двоструко трансгени, што значи да су им и CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити специфични за MOG, је показано да CD4⁺ Т лимфоцити имају водећу улогу у развоју болести (330).

У складу са наведеним истраживањима је и резултат наше студије да BALB/с мишеви инфицирани MCMV-ом којима су пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ деплетирани CD4⁺ Т лимфоцити не развијају клиничке манифестације ЕАЕ (графикон 14). Овај налаз указује да је за развој неуроинфламације код инфицираних и имунизованих BALB/с мишева неопходно присуство CD4⁺ Т лимфоцита, барем у фази индукције болести, с обзиром да мишеви којима су ове ћелије деплетирани пре имунизације ецефалитогеном не развијају клиничке знаке ЕАЕ, што је веома сличан налаз претходно описаним студијама.

Значајна акумулација CD8⁺ лимфоцита у инфилтратима и њихова улога у патогенези аутоимунског процеса је документована клиничким знацима и типичном патологијом која је употпуњена специфичношћу инфилтришућих ћелија. *Ex vivo* рестимулација моноклеарних ћелија, изолованих из ЦНС-а, пептидом MOG₃₅₋₅₅ изазива значајан пораст CD8⁺ лимфоцита које продукују IFN- γ у групи BALB/с мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 16). Сасвим супротни резултати су добијени рестимулацијом ћелија изолованих из ЦНС-а C57BL/6 мишева. CD8⁺ лимфоцити C57BL/6 мишева који су развили ЕАЕ нису одговориле на рестимулацију пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 16). Значајан налаз је да CD8⁺ лимфоцити у групи мишева MCMV+MOG₃₅₋₅₅ које су на рестимулацију пептидом MOG₃₅₋₅₅ одговориле продукцијом цитокина нису били специфичне за вирусне епитопе pp89 и m164 (слика 7). Овај и налаз CD8⁺ лимфоцита који експримирају маркере цитотоксичке активности (графикон 15) указује да су у ЦНС-у BALB/с MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева присутни потенцијално аутореактивни CD8⁺ лимфоцити специфични за MOG₃₅₋₅₅ који доприносе аутоимунском процесу у овом моделу ЕАЕ. Овај

налаз је у складу са претходним извештајем да CD4⁺ Т лимфоцити иницирају развој аутоимунског процеса у ЦНС-у што је касније праћено појавом мијелин специфичних CD8⁺ Т лимфоцита које су способне да директно препознају олигодендроците и да допринесу оштећењу ткива (30). Слично, појачање ЕАЕ код C57BL/6 мишева који су инфицирани γ HV-68 удружено је са инфилтрацијом паренхима мозга CD8⁺ IFN- γ ⁺ гранзим⁺ лимфоцитима (284). Међутим, специфичност за аутоантиген ових инфламацијских и цитолитичких CD8⁺ лимфоцита у γ HV-68 инфицираним C57BL/6 мишевима није проучена (284). Налаз да мишеви којима су деплетирани CD4⁺ лимфоцити по MCMV инфекцији и пре MOG₃₅₋₅₅ имунизације нису развили болест (Графикон 7) доприноси закључку да су BALB/c мишеви инфицирани MCMV развили аутоимунску неуропатологију. Стална инфилтрација ЦНС-а и присуство CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита специфичних за MOG₃₅₋₅₅ у ЦНС-у BALB/c мишева, два месеца по имунизацији пептидом MOG₃₅₋₅₅ (слика 9) такође доказује аутоимунску природу болести.

Сумарно, резултати добијени у нашем моделу указују да су CD4⁺ лимфоцити апсолутно неопходни за развој ЕАЕ, а да CD8⁺ лимфоцити имају улогу ефекторских ћелија које доприносе оштећењу. Овај закључак је у складу са налазима претходних студија у којима је показано *in vitro* на материјалу хуманог порекла (331) и *in vivo* у експерименталним анималним моделима (325) да CD8⁺ лимфоцити остварују директан цитотоксички ефекат на олигодендроците.

5.3. Инфилтрати у ЦНС-у BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих енцефалитогеном садрже проинфламацијске Th1/Th17 CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоците

За развој ЕАЕ је важна диференцијација наивних CD4⁺ Т лимфоцита, специфичних за компоненте мијелинског омотача, у проинфламацијски Th1 лимфоцити. Показано је да се ЕАЕ може изазвати пасивним трансфером Th1 или Th17 лимфоцита специфичних за мијелин, а да трансфер специфичних Th2 лимфоцита не може да изазове болест (332, 333). Инфекција BALB/c мишева цитомегаловирусом утиче на развој енцефалитогених CD4⁺ лимфоцита који се акумулирају у ЦНС-у. Највећи број ових ћелија садржи TNF- α , цитокин који вероватно доприноси инцијацији инфламације у ЦНС-у, али и оштећењу нервног ткива и клиничком испољавању болести.

Концентрација проинфламацијског TNF- α је повећана и у серуму и у ликвору код особа оболелих од MC (334). Примена TNF- α након иницијације EAE, продужава трајање болести и индукује појаву релапса (335, 336), док блокада TNF- α или TNFR1, специфичним антителима, спречава развој болести или ублажава њено клиничко испољавање (337-342). Међутим, блокада TNF- α може да изазове и теже форме EAE, зависно од модела болести и времена примене антитела (343, 344). Овај цитокин је у време испољавања болести присутан у лезијама ЦНС-а и у MC и у EAE, док га у фази репарације ткива нема (345).

Коришћењем мишева дефицијентних за TNF- α на C57BL/6 основи, који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅, показано је да TNF- α игра значајну улогу у иницијацији болести, кретању леукоцита ка ЦНС-у и нарочито у формирању периваскуларних инфилтрата (346). Показано је да TNF- α директно стимулише смрт примарних олигодендроцита глодара и људи (347, 348) и *in vitro* оштећење мијелина на исечцима ЦНС-а (347), што је навело на закључак да је овај цитокин укључен у процес демиелинизације. Коришћењем трансгених мишева који експримирају TNF- α или у астроцитима или неуронима, је показано да сигнализација са TNF- α /TNFR1 индукује селективно апоптозу зрелих олигодендроцита, вакуолизацију мијелина и развој примарних лезија (349). Поред тога, TNF- α може да омета ремиелинизацију појачавајући ефекат IFN- γ који ремети развој олигодендроцита (350).

Описани су и супротни, антиинфламацијски ефекти TNF- α у патогенези EAE. Тако, 129/Sv мишеви, иначе резистентни на индукцију EAE пептидом MOG, након инактивација гена за TNF- α испољавају изразите знаке болести, што указује да TNF- α није искључиво медијатор инфламације и демиелинизације у EAE већ може да има и важну антиинфламацијску улогу ограничавајући тежину и дужину болести вероватно утичући на апоптозу CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита *in vivo* (343).

У овде приказаној студији је показано да инфилтрати у ЦНС-у мишева који развијају EAE, у време максималног испољавања болести, садрже значајно већи број CD4⁺ TNF- α ⁺ и CD8⁺ TNF- α ⁺ Т лимфоцита што може да буде повезано са позитивним утицајем овог цитокина на развој EAE, али не искључује могућност да TNF- α , у овој фази болести, може да буде фактор апоптозе CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита и да тако допринесе уласку болести у фазу ремисије која и иначе следи након достизања максималног испољавања болести.

У ЦНС-у BALB/c мишева који су инфицирани MCMV-ом и развили манифестације EAE присутан је скоро исти број Th1 и Th17 лимфоцита (Графикон 11). Супротно нашим

результатима, у инфилтратима у ЦНС-у C57BL/6 мишева који су имунизовани енцефалитогеном после инфекције вирусом γ HV-68 присутни су готово искључиво Th1 лимфоцити (14).

Показана је удруженост клиничког испољавања ЕАЕ и експресије IFN- γ и IL-12p40, у ткиву ЦНС-а, ликвору, и циркулишућим леукоцитима (351-353) што уз чињеницу да се стање код оболелих од мултипле склерозе након примене IFN- γ погоршава (354) наводи на закључак да Th1 лимфоцити, који продукују IFN- γ , играју кључну улогу у настанку ЕАЕ. Међутим, показано је и да су мишеви са делецијом гена за IL-12, IFN- γ и TNF- α (Th1 цитокини) подложнији развоју ЕАЕ, као и мишеви третирани анти-IFN- γ антителом (355-359). Првобитни закључак да је цитокин урођене имуности који игра кључну улогу у развоју ЕАЕ IL-12, последица је чињенице да IL-12 дели са IL-23 заједничку субјединицу (p40), као и компоненту рецептора IL-12R β 1, па генска или терапијска модификација IL-12p40 или IL-12R β 1 резултује блокадом оба цитокина (360). Међутим, касније је показано да су мишеви са делецијом гена за IL-23 потпуно резистентни на развој ЕАЕ. Из литературе је познато да је IL-23 неопходан за диференцијацију наивних Т лимфоцита у патогене Th17 лимфоците (361), односно за касну фазу диференцијације и успостављање стабилног фенотипа ових ћелија (362, 363). Th17 лимфоцити продукују проинфламацијске цитокине IL-17A и IL-7F и стимулишу продукцију IL-6, GM-CSF, CXCL8 и металопроотеиназа матрикса што доприноси развоју инфламације у ЦНС-у.

Студија у којој је ЕАЕ изазван пасивним трансфером Т лимфоцита специфичних за пептид RLP₁₃₉₋₁₅₁ претходно *in vitro* излаганих цитокинима, IL-12 или IL-23, је указала да Th1 и Th17 лимфоцити индукују развој клинички веома сличних мијелопатија али да се инфилтрати које мишеви развијају разликују (156). Пасивни трансфер Th1 лимфоцита индукује развој инфилтрата углавном у подручју менингеа и субпијалне беле масе, а у инфилтратима доминирају макрофаги. У мозгу и кичменој моздини ових мишева је повећана експресија CXCL9, CXCL10 и CXCL11, хемокина који делују хемотаксно на моноците и лимфоците. Супротно, пасивни трансфер Th17 лимфоцита изазива инфилтрате углавном у субпијалном подручју са ширењем дубоко у белу масу. У инфилтратима су најзаступљенији неутрофили, а експресија CXCL1 и CXCL2, хемотаксних фактора за неутрофиле, је повишена у мозгу и кичменој моздини (156).

Веома значајним се сматра различит одговор ове две форме ЕАЕ на специфичну имуномодулаторну терапију. Неутрализација GM-CSF или IL-17 је супримира ЕАЕ индукован трансфером Th17, али не и развој ЕАЕ изазван трансфером Th1 лимфоцита. Примена анти TNF- α антитела је супримира ЕАЕ изазван трансфером и Th1 и Th17 лимфоцита специфичних за PLP₁₃₉₋₁₅₁ (156). Налази других студија указују да су у патогенези ЕАЕ кључни Т лимфоцити који ко-експримирају IL-17 и IFN- γ (364).

Показано је и да IL-17 игра кључну улогу у олакшавању уласка инфламацијских ћелија у мозак, а IFN- γ омогућује развој инфламације у кичменој мождини а инхибише улазак инфламацијских ћелија у мозак (365). С обзиром на то да се зна да је један од маркера Th17 лимфоцита CCR6 хемокински рецептор (366), као и то да је експресија овог рецептора неопходна за иницијални улазак у ЦНС Т лимфоцита који су специфични за компоненте мијелинског омотача, може да се закључи да у инцијацији неуроинфламације IL-17 може да има кључну улогу.

У складу са наведеним је налаз значајног броја CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IL-17, транскрипциони фактор RoR γ t и хемокински рецептор CCR6 у ЦНС-у BALB/с мишева инфицираних вирусом који након имунизације развијају манифестације ЕАЕ (Графикони 12 и 13). Активирани CD4⁺ Т лимфоцити који имају енцефалитогени потенцијал експримирају хемокински рецептор CCR6 (367) који игра кључну улогу у иницијалном уласку помагачких Т лимфоцита у ЦНС интеракцијом са хемокином CCL20 који је конститутивно експримиран у епителним ћелијама хороидног плексуса мишева и људи (301). Т лимфоцити који експримирају CCR6 улазе у ЦНС, реактивирају се и продукују солубилне медијаторе који активирају ендотел паренхима па је онда могућ улазак активираних Т лимфоцита у ЦНС кроз паренхимске крвне судове (306).

Међутим, међу ћелијама изолованим из ЦНС-а инфицираних и имунизованих BALB/с мишева детектован је значајан проценат CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају транскрипциони фактор T-bet (графикон 12). Транскрипциони фактор T-bet је кључан за енцефалитогени потенцијал мијелин специфичних Th1 и Th17 Т лимфоцита (368, 369). Познато је да T-bet има плејотропне ефекте. Важно је напоменути да T-bet регулише експресију рецептора за IL-23 (368, 370) а зна се да IL-23 регулише продукцију GM-CSF у CD4⁺ Т лимфоцитима (152).

На енцефалитогеност Т лимфоцита у инфилтратима BALB/c мишева указује експресија хемокинског рецептора CXCR3 (Графикон 13), чија блокада у фази индукције ЕАЕ атенуише болест (371).

Подаци о улози хемокинског рецептора CXCR3 у патогенези ЕАЕ су различити. CXCR3 дефицијентни мишеви развијају тежи облик ЕАЕ са израженим уласком ћелија у ЦНС што указује да CXCR3 има улогу у атенуацији ЕАЕ (372). Овај налаз указује да експресија CXCR3 није важна у хемокинетском кретању Т лимфоцита (370), већ да CXCR3 има улогу у ефекторској фази ЕАЕ када утиче на продукцију NO и нарушавање крвно мождане баријере (373). Са друге стране, резултати новије студије указују да у ЦНС-у мишева који развију ЕАЕ, више од 90% CD4⁺ Т инфилтришућих лимфоцита експримира CXCR3. Хемокински рецептор CXCR3 експримирају и Т лимфоцити у инфилтратима у ЦНС-у особа који су оболели од мултипле склерозе (374). У експериментима где је урађена блокада CXCR3, добијени су различити налази зависно од времена блокирања ових хемокинских рецептора. CXCR3 је иначе углавном експримиран на Th1 лимфоцитима (375). Ако се CXCR3 блокира у току пасивног изазивања ЕАЕ трансфером активираним Т лимфоцитима који су специфични за мијелин, болест је атенуирана (371). Блокада рецептора у току активне имунизације не мења степен инфилтрације у ЦНС-у и нема утицај ни на продукцију цитокина IFN- γ и IL-17, али блокада у току већ испољеног активног ЕАЕ код пацова, инхибисаће кретање нових Т лимфоцита у ЦНС. На основу наведених налаза се закључује да CXCR3 има улогу у хемокинетском кретању енцефалитогених Т лимфоцита ка ЦНС-у што му обезбеђује улогу у индукцији болести, али и да се инфилтрација ЦНС-а енцефалитогеним ћелијама у току ЕАЕ одвија независно од овог хемокинског рецептора.

Међу мононуклеарним ћелијама изолованим из мозга мишева инфицираних цитомегаловирусом у неонаталном периоду и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ детектован је већи број CD8⁺ лимфоцита који садрже Tbet и T1 цитокине TNF- α и IFN- γ у поређењу са ћелијама изолованим из ЦНС-а мишева само имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом и групе мишева само инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду (Графикон 5). Значајан је налаз пораста броја Tc17 лимфоцита, CD8⁺ лимфоцита које продукују IL-17 и садрже транскрипциони фактор RoR γ t и имају углавном меморијски фенотип, након имунизације енцефалитогеном. Присуство Tc17 лимфоцита је доказано код људи (376) и мишева (377). У ЦНС-у мишева само инфицираних цитомегаловирусом у неонаталном периоду скоро и

да нема Tc17 лимфоцита, док је у групи мишева имунизованих енцефалитогеном после неонаталне MCMV инфекције број ових ћелија скоро исти као и број Th17 лимфоцита. Раније је показано да су Tc17 лимфоцити неопходни за накупљање Th17 лимфоцита у ЦНС-у и за развој ЕАЕ (170). Код оболелих од мултипле склерозе у раном стадијуму се детектују ове Tc17 лимфоците у ликвору, где их има више него у периферној крви и сматра се да доприносе започињању аутоимунског процеса у ЦНС-у (170). Наши резултати указују да болест коју развијају BALB/c мишеви инфицирани MCMV-ом у неонаталном периоду и касније имунизовани енцефалитогеном карактерише значајан додатни инфлукс инфламацијских Tc1 лимфоцита у ЦНС али и појава нових популација Th1, Th17 и Tc17 лимфоцита што је у складу са развојем аутоимунског процеса у ЦНС-у.

Познато је да неонаталну инфекцију MCMV-ом прати инфлукс CD8+CXCR3+ лимфоцита у ЦНС (378), али се у ЦНС-у овако инфицираних мишева након имунизације енцефалитогеном детектују и CD4+ лимфоцити који експримирају CXCR3, хемокински рецептор за CXCL10, као и CD4+T лимфоцити који експримирају CCR6 (графикон 7), рецептор који има кључну улогу у развоју инцијалне аутоимунске инфламације у ЦНС-у (306, 379). Такође уочено је да развој ЕАЕ код имунизованих мишева инфицираних MCMV-ом у неонаталном периоду прати повећан инфлукс CD8+CCR6+ лимфоцита (Графикон 7) што указује да новонастали аутоимунски процес привлачи у ЦНС сасвим нову популацију CD8+ лимфоцита.

5.4. Инфекција MCMV-ом подстиче развој M1 микроглије

Микроглија и астроцити у физиолошким условима експримирају низак ниво молекула МНС. Међутим у току неуроинфламације микроглија експримира молекуле II класе МНС као и костимулаторне молекуле (380), продукује IL-12 (380, 381) и IL-23 (142) и стимулише продукцију цитокина у T лимфоцитима (379, 380). Такође показано је да системска MCMV инфекција значајно повећава број ћелија које имају морфолошке карактеристике активираних микроглије и то доминантно M1 фенотип (384).

Ћелије микроглије нису најзначајније међу ћелијама које презентују антигене (314) у ЦНС-у, али ипак микроглија утиче на локални цитокински миље тако што секрецијом IL-23

подстиче Т лимфоците на секрецију GM-CSF и одржава њихов патогени фенотип а тиме и инфламацију (385). На кључну улогу микроглије у одржавању аутоимунских процеса у ЦНС-у указали су експерименти којима је показано да одсуство CD40 ограничено само на ћелије микроглије ублажава манифестације EAE (386).

У нашој студији уочен је значајно већи проценат класично активираних микроглија (CD45^{med}CD11b+CD11c+) у ЦНС-у BALB/c мишева 25 дана после MCMV инфекције у поређењу са мишевима имунизованим пептидом MOG₃₅₋₅₅ без претходне инфекције, који су углавном имали алтернативно активираних микроглија (CD45^{med}CD11b+CD206+) (Графикон 18). Мишеви инфицирани MCMV-ом и имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у ЦНС-у имају и даље већи проценат класично активираних микроглија у поређењу са мишевима само имунизованим енцефалитогеном.

Наши налази указују да инфекција BALB/c мишева MCMV-ом и системска инфламација коју ови мишеви развијају по инфекцији MCMV-ом утичу и на стање резидентних ћелија ЦНС-а, тј да подстичу активацију микроглије. Тако активираних микроглија, која има измењен фенотип у поређењу са BALB/c мишевима само имунизованим пептидом MOG₃₅₋₅₅, сада може да променом микроокружења у ЦНС-у допринесе адекватној реактивацији лимфоцита претходно активираних енцефалитогеном. Односно могуће је да инфекција MCMV-ом конверзијом фенотипа резидентних антиген презентујућих ћелија ЦНС-а доприноси прекиду резистенције BALB/c мишева на индукцију EAE пептидом MOG₃₅₋₅₅.

5.5. За развој енцефалитогеног процеса је важан утицај инфекције MCMV-ом на антиген презентујуће ћелије

Развој помагачких Т лимфоцита зависи од функције ћелија које приказују антигене (387) па су детаљније испитани ефекти инфекције MCMV-ом на функцију антиген презентујућих ћелија у току индукције EAE.

MCMV инфекција значајно повећава пропорцију дендритских (CD11c+) и плазмацитоидних дендритских ћелија (CD11c+PDCA1+) у периферним лимфним чворовима (Графикон 25) у поређењу са имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅. Већи проценат

дендритских ћелија у лимфном чвору у групи MCMV инфицираних мишева је удружен са већим процентом CCR2⁺ дендритских ћелија (Графикон 26). Познато је да MCMV кодира проинфламацијски фактор (MCK-2), аналог хемокину CCL2 (240) који утиче на појачано регрутовање моноцита и дисеминацију вируса (241). Могуће је да је већи проценат дендритских ћелија у ингвиналним лимфним чворовима у групи животиња инфицираних MCMV-ом последица продукције аналога CCL2, пошто се CCL2 у лимфним чворовима презентује на површини венула са високим ендотелом и утиче на регрутовање моноцита (388). Иако је раније показано да MCMV привлачи моноците који имају имуносупресивну улогу (389) наши резултати указују да су у лимфним чворовима мишева инфицираних вирусом у већем проценту присутне дендритске ћелије које експримирају маркере активације CD86 и CD40 (Графикон 27) и садрже IL-12 који подстиче развој Th1 лимфоцита (Графикон 28).

CD11c⁺CD11b⁺, описане као инфламацијске дендритске ћелије, су ћелије које после вирусне инфекције и имунизације мишева са CFA (Th1 стимулус) мигрирају у регионални лимфни чвор и продукују велику количину IL-12 и тако стимулишу продукцију IFN- γ у T лимфоцитима (390). Неки радови показују да су CD11c⁺CD11b⁺ ћелије имуносупресивне и да имају важну улогу у индукцији толеранције. Међутим, те имуносупресивне CD11c⁺CD11b⁺ дендритске ћелије пролиферишу након интравенске индукције имунске толеранције (391), оралне толеранције на тип II колагена (392) или након трансгене експресије специфичног хемокиноског рецептора у циљном ткиву (173). Инфламацијске CD11c⁺CD11b⁺ ћелије долазе из периферне крви и накупљају се у регионалном лимфном чвору после субкутане имунизације антигеном у комплетном адјувансу (390).

Могући узроци израженијег инфлуksа инфламацијских дендритских ћелија у лимфни чвор BALB/c+MCMV мишева могу да буду а) мања продукција Th2 цитокина у ћелијама неспецифичне имуности тип 2 у случају вирусне инфекције што мења баланс иницијално продукованих цитокина ка типу 1 што привлачи инфламацијске дендритске ћелије б) мијелоидне ћелије инфициране вирусом продукују више проинфламацијских цитокина након стимулације адјувансом и онда овај иницијални инфламацијски стимулус додатно привлачи још инфламацијских дендритских ћелија у лимфни чвор ових мишева и тако поларизује имунски одговор ка T1/T17 типу. Налаз већег броја CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита у дренирајућем лимфном чвору два дана после имунизације у групи мишева који су

претходно инфицирани вирусом (графикон 20), као и налаз већег броја проинфламацијских лимфоцита који експримирају транскрипционе факторе кључне за развој Т1/Т17 лимфоцита (графикон 21) је у складу са налазом већег броја инфламацијских дендритских ћелија у лимфним чворовима инфицираних и имунизованих мишева (Графикон 28). Наши резултати указују да инфекција BALB/с мишева MCMV индукује пораст инфламацијских дендритских ћелија у периферним лимфним чворовима и тако омогућава развој енцефалитогених Т лимфоцита. Ово откриће је у корелацији са претходним налазом да су мишеви инфицирани MCMV-ом резистентни на бактеријску инфекцију услед продужене продукције антивирусног цитокина IFN- γ и системске активације макрофага (333).

Такође налаз значајног повећања броја NKT ћелија у лимфним чворовима мишева који добијају болест рано по имунизацији енцефалитогеном (графикон 23) може да укаже да инфекција MCMV-ом у комбинацији са имунизацијом стимулише ћелије урођене имуности и мења микросредину у лимфном чвору омогућавајући адекватну активацији антиген специфичних лимфоцита. Подаци о улози NKT ћелија у патогенези ЕАЕ су контроверзни. У CD1d дефицијентним мишевима је описана протективна улога NKT ћелија у патогенези ЕАЕ (396), да немају ефекта на развој ЕАЕ (397-399), као и да погоршавају ЕАЕ (397). Међутим коришћењем великих доза α -GalCer који стимулише NKT ћелије је показано да ове ћелије играју улогу у егзацербацији ЕАЕ (397). Налази ових студија указују да NKT ћелије утичу на ток ЕАЕ тако што подстичу промену цитокинског профила антиген специфичних ћелија (398). У нашој студији је показано да инфекција MCMV-ом и имунизација BALB/с мишева пептидом MOG₃₅₋₅₅ значајно повећава број NKT ћелија које продукују IL-17 у дренажу лимфном чвору (Графикон 24). Само инфекција MCMV-ом не повећава број IL-17+ NKT ћелија, само имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава број ових ћелија у поређењу са вирусом, али најзначајније повећање имају мишеви инфицирани вирусом и имунизовани енцефалитогеном (графикон 24). Могуће је да иницијано промењена микросредина у лимфном чвору настала деловањем вируса на дендритске ћелије утиче на развој инфламацијског фенотипа NKT ћелија након имунизације енцефалитогеном које онда додатно мењају цитокински миље у лимфном чвору и тако подстичу развој специфичних лимфоцита са енцефалитогеним потенцијалом.

Инфекција MCMV-ом без додатних стимулуса утиче на повећање CD8+NKG2D+ ћелија у лимфним чворовима (графикон 22). Број ових CD8+NKG2D+ ћелија у дренажу лимфном

лимфном чвору је највећи у групи инфицираних и имунизованих мишева (Графикон 22). Познато је да је експресија NKG2D на CD8⁺ ћелијама важна за настанак меморијског фенотипа и да подстиче њихово преживљавање (400). Узимајући у обзир овај податак и вероватно развој дугоживећих лимфоцита специфичних за вирус након инфекције, као и податак о постојању унакрсне реактивности између епитопа цитомегаловируса и епитопа пептида MOG могуће је објаснити релативно брз развој клиничких манифестација ЕАЕ у групи мишева који су инфицирани вирусом три месеца пре имунизације енцефалитогеном (Графикон 17). МСМV инфекција која траје дуже праћена је појавом све већег процента вирус специфичних лимфоцита на периферији који имају ефекторско-меморијски фенотип. У таквој ситуацији имунизација аутоантигеном који има преклапајуће епитопе са МСМV-ом додатно стимулише већ постојеће ефекторско-меморијске Т лимфоците који се брже активирају у поређењу са наивним Т лимфоцитима и брже доспеју до ЦНС-а, па се код таквих мишева и болест брже развија.

Осетљивост BALB/c мишева на индукцију ЕАЕ пептидом MOG₃₅₋₅₅, изазвана претходном инфекцијом цитомегаловирусом, би могла да буде последица настанка инфламацијске средине услед вирусне инфекције, а таква средина конвертује ћелије које презентују антиген, и на периферији и у ЦНС-у, у инфламацијске ћелије способне да адекватно активирају аутореактивне лимфоците. Иако у овој студији није детектована унакрсна реактивност између пептида MOG₃₅₋₅₅ и вирусних епитопа pp89 и m164, није искључено постојање унакрсне реактивности између других вирусних епитопа и енцефалитогена, па је могуће да и молекулска мимикрија доприноси осетљивости BALB/c мишева на индукцију ЕАЕ, нарочито имајући у виду бржи развој болести код мишева који су имунизовани енцефалитогеном после дуготрајне вирусне инфекције. Што инфекција дуже траје повећава се проценат вирус специфичних лимфоцита који имају ефекторско-меморијски фенотип па имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ може да побуди овакве ћелије услед унакрсне реактивности, које у поређењу са наивним лимфоцитима брже постају ефекторске ћелије способне да индукују неуроинфламацију.

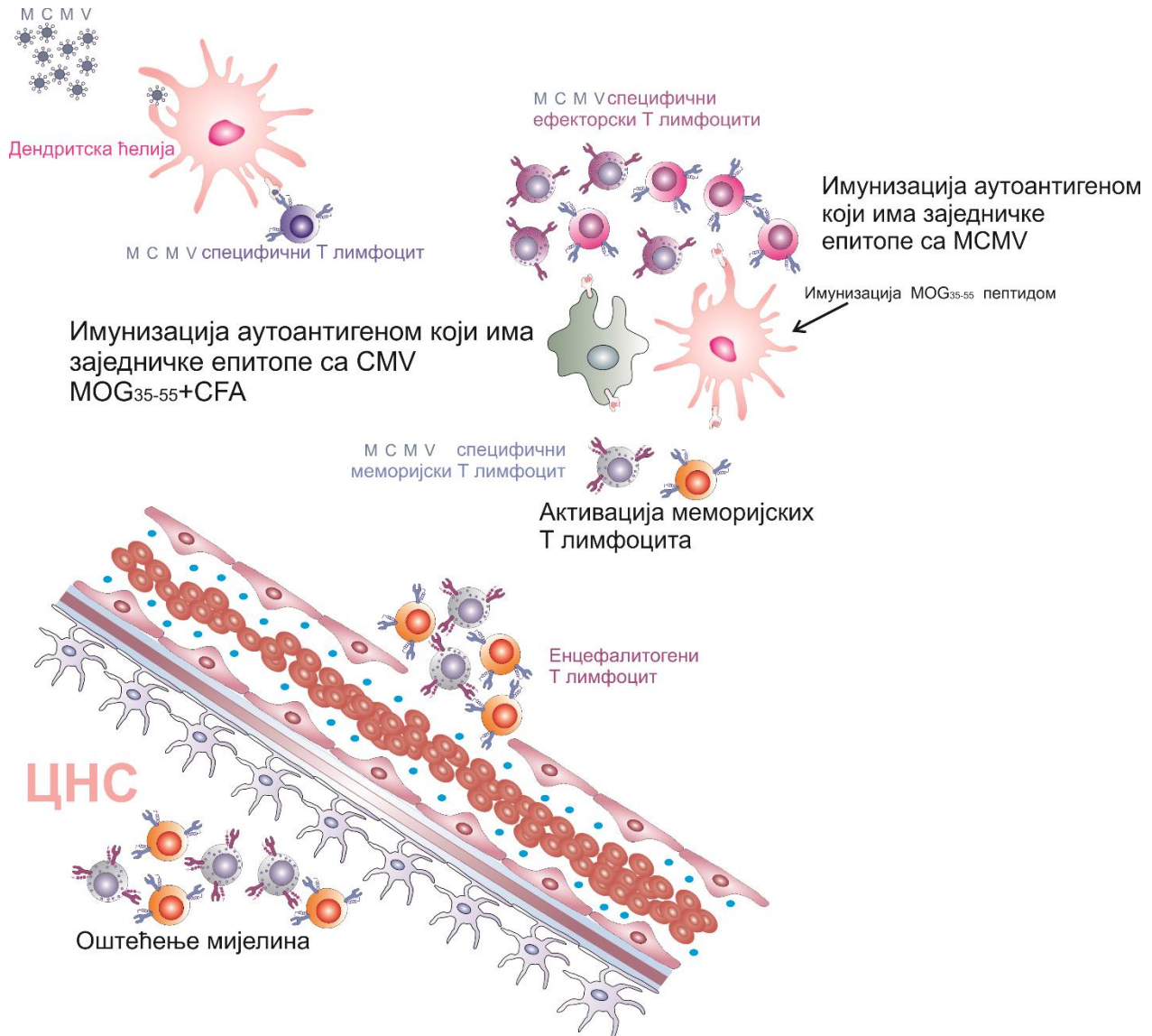
6. ЗАКЉУЧЦИ

Инфекција MCMV-ом појачава аутоимунску неуроинфламацију и прекида природну резистенцију BALB/c мишева на индукцију EAE пептидом MOG₃₅₋₅₅ и то стимулацијом инфламацијског фенотипа дендритских ћелија и енцефалитогеног потенцијала Th1/Th17 и CD8+T лимфоцита.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

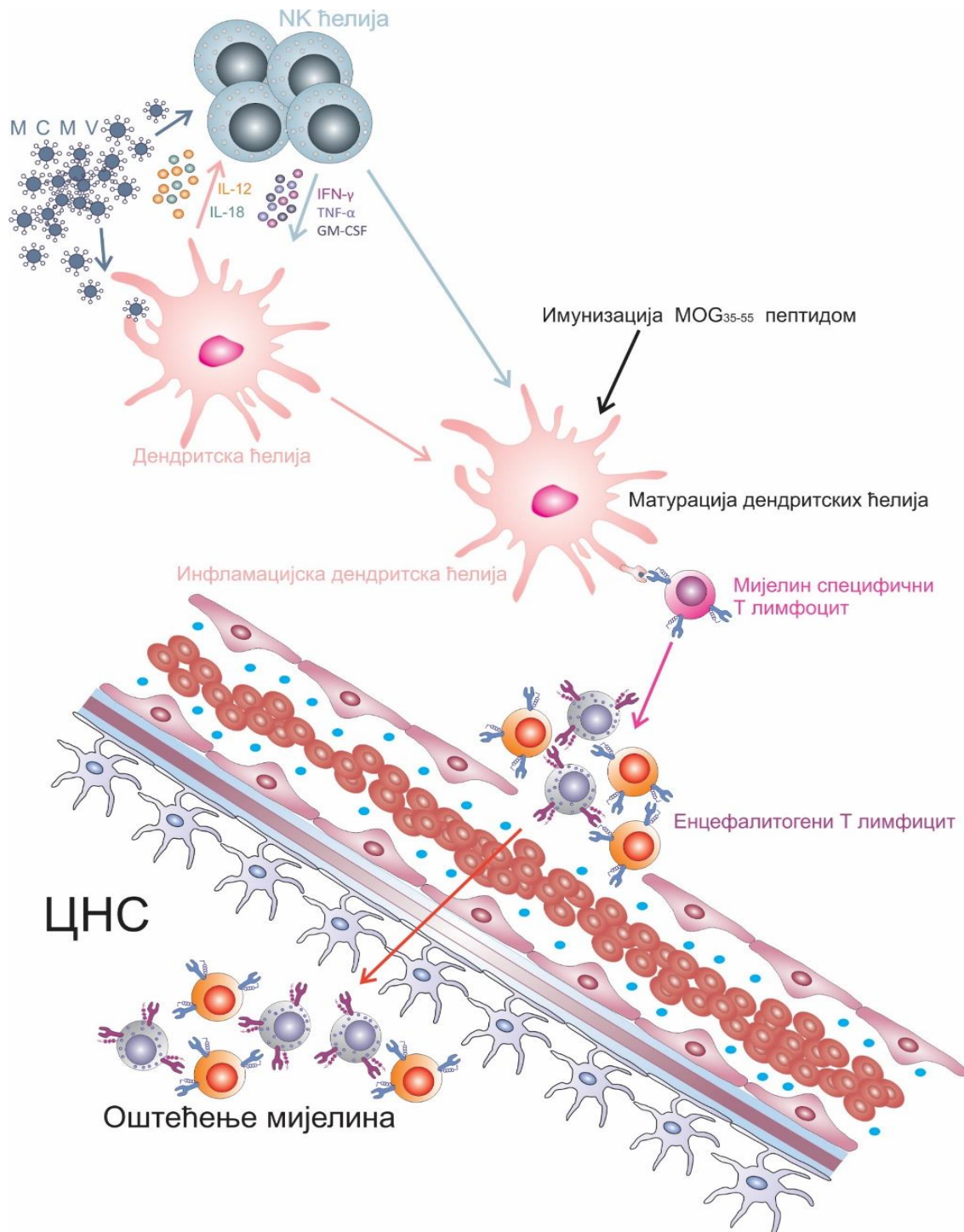
1. Инфекција MCMV-ом чини BALB/c мишеве осетљивим на развој EAE-а па они након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају типичне клиничке и хистолошке манифестације болести.
2. У инфилтратима мозга и кичмене мождине BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ присутни су CD4+ и CD8+T лимфоцити који садрже проинфламацијске цитокине IL-17, IFN- γ и TNF- α , као и хемокине и транскрипционе факторе маркере T1/T17 имунског одговора.
3. У инфилтратима мозга и кичмене мождине BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ су у значајној мери заступени CD8+T лимфоцити од којих значајан број испољава маркере цитолитичке активности.
4. У инфилтратима мозга и кичмене мождине BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих енцефалитогеном су присутни и CD4+ и CD8+T лимфоцити специфични за пептид MOG₃₅₋₅₅.
5. Присуство CD4+ лимфоцита је неопходно за развој неуроинфламације код BALB/c мишева инфицираних MCMV-ом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.
6. Инфекција MCMV-ом и имунизација енцефалитогеном BALB/c мишева је праћена индукцијом развоја проинфламацијских CD4+ и CD8+T лимфоцита у дренирајућим лимфним чворовима у раној фази индукције EAE.
7. Инфекција MCMV-ом индукује инфламацијски фенотип антиген презентујућих ћелија на периферији и стимулише конверзију M2 микроглије BALB/c мишева у M1 тип микроглије.

Схема 3



Могућа улога MCMV инфекције у патогенези ЕАЕ, молекулска мимикрија: иако нема унакрсне реактивности између пептида MOG₃₅₋₅₅ и вирусних епитопа pp89 и m164, не искључује се могућност да постоји унакрсна реактивност између других епитопа вирусних антигена и MOG₃₅₋₅₅ пептида. У стању хроничне инфекције вирусом повећава се проценат меморијских Т лимфоцита од којих неки вероватно деле епитопе са енцефалитогеном па имунизација антигенима мијелина у адјувансу брже активира постојеће вирус специфичне лимфоците који постају енцефалитогени, улазе у ЦНС и изазивају оштећење мозга.

Схема 4



Могућа улога MCMV инфекције у патогенези ЕАЕ, посматрачка активација: вирусна инфекција на периферији изазива реакцију урођене имуности и настаје проинфламацијска средина која мења фенотип дендритских ћелија које у таквој средини матурирају и постају проинфламацијске. По имунизацији антигеном овакве проинфламацијске дендритске ћелије су способне да адекватно активирају Т лимфоците који постају проинфламацијски ефекторски Т лимфоцити способни да уђу у ЦНС и изазову оштећење.

7.Референце:

1. Charcot JM. Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetriere. Thome 1, 4th edn. Paris: Bureau du Progress Medical, V.A. Delahaye et Co; 1880.
2. McFarlin DE, McFarland HF. Multiple sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1982; 307(19):1183-8.
3. McFarlin DE, McFarland HF. Multiple sclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1982; 307(20):1246-51.
4. Kurschus FC, Wörtge S, Waisman A. Modeling a complex disease: multiple sclerosis. *Adv Immunol*. 2011;110:111-37.
5. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004;55(4):458-68.
6. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*. 1996; 6(3):259-74.
7. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000; 47(6):707-17.
8. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Bush WS, Sawcer SJ, de Jager PL, Oksenberg JR, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis--the shape of things to come. *Am J Hum Genet*. 2010; 86(4):621-5.
9. Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, van der Valk P, van Horssen J. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*. 2010; 10(5):411-8.
10. KJ, Tracey. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 19-26; 420(6917):853-9.
11. Ames A. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000; 34(1-2):42-68.
12. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(1):41-53.
13. Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol*. 2006; 26(2):149-88.
14. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67(12):1113-21.
15. Ladeby R, Wirefeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 48(2):196-206.
16. Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006; 1(2):127-37.
17. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*. 2007; 14(11):1189-97.

18. Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Döpp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*. 2005; 51(4):297-305.
19. Rivers, T. M., Sprunt, D. H. & Berry, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 1933; 58(1):39-53.
20. Kivisäkk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2009; 65(4):457-69.
21. Fetler L, Amigorena S. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science. Neuroscience*. 2005; 309(5733):392-3.
22. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007; 28(1):12-8.
23. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009; 132 (5): 1175-89.
24. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46(4):907-11.
25. Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Ebers GC, Muraro PA. Age and disability accumulation in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011; 77(13):1246-52.
26. Beecham, A. H. et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013; 45(11):1353-60.
27. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(4):246-58.
28. Harkiolaki, M. et al. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*. 2009; 30(3):348-57.
29. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 108(2):311-8.
30. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*. 2010; 11(7):628-34.
31. Calliope A, Dendrou, Lars Fugger, Manuel A. Friese. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15(9):545-58.
32. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(9):623-35.
33. Louveau, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523(7560):337-41.
34. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004; 3(2):104-10.

35. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, Poschmann G, Kaur G, Lambert L, Leach OA, Prömel S, Punwani D, Felce JH, Davis SJ, Gold R, Nielsen FC, Siegel RM, Mann M, Bell JI, McVean G, Fugger L. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012; 488(7412):508-11.
36. Taşan M, Musso G, Hao T, Vidal M, MacRae CA, Roth FP. Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally coherent subnetworks. *Nat Methods*. 2015; 12(2):154-9.
37. Farh, K. K. et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. 2015;518(7539):337-43.
38. Friese MA, Jakobsen KB, Friis L, Etzensperger R, Craner MJ, McMahon RM, Jensen LT, Huygelen V, Jones EY, Bell JI, Fugger L. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med*. 2008; 14(11):1227-35.
39. Gregersen, J. W. et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature*. 2006; 443(7111):574-7.
40. Hartmann FJ, Khademi M, Aram J, Ammann S, Kockum I, Constantinescu C, Gran B, Piehl F, Olsson T, Codarri L, Becher B. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat Commun*. 2014; 5:5056.
41. Dendrou, C. A. et al. Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat Genet*. 2009; 41(9):1011-5.
42. Gregory, S. G. et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007; 39(9):1083-91.
43. Lundström W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J, Mackall CL. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(19):E1761-70.
44. Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol*. 1999; 46(3):425-8.
45. Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. *J Neuroimmunol*. 2001 Dec 3 and 121(1-2):40-8. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions.
46. Dec, McFarland HF. *Ann Neurol*. 1992 and 32(6):722-3. Twin studies and multiple sclerosis.
47. Coo H, Aronson KJ. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2004; 23(1-2):1-12.
48. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372(9648):1502-17.
49. Runmarker B, Andersen O. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain*. 1995; 118 (Pt 1):253-61.
50. Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, Wu TC, Voskuhl RR. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol*. 2002; 52(4):421-8.

51. Nov, Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(4):531-5.
52. Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell.* 1993; 72(4):551-60.
53. Scally, S. W. et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2013; 210(12):2569-82.
54. Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, Katz-Levy Y, Carrizosa A, Kim BS. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med.* 1997; 3(10):1133-6.
55. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol.* 2015; 14(3):263-73.
56. Lossius A, Johansen JN, Vartdal F, Robins H, Jūratė Šaltytė B, Holmøy T, Olweus J. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2014; 44(11):3439-52.
57. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, van Dommelen S, Shellam GR, Hill AB. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity.* 2008;29(4):650-9.
58. Sanadgol N, Ramroodi N, Ahmadi GA, Komijani M, Moghtaderi A, Bouzari M, Rezaei M, Kardi MT, Dabiri S, Moradi M, Sanadgol E. Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis. *New Microbiol.* 2011; 34(3):263-74.
59. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Tyblova M, Bergsland N, Hussein S, Willis L, Krasensky J, Vaneckova M, Seidl Z, Lelkova P, Dwyer MG, Zhang M, Yu H, Duan X, Kalincik T, Ramanathan M. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One.* 2013; 8(1):e53996.
60. Weinstock-Guttman B, Horakova D, Zivadinov R, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Tyblova M, Vaneckova M, Seidl Z, Krasensky J, Bergsland N, Ramasamy DP, Hagemeyer J, Havrdova E, Ramanathan M. Interactions of serum cholesterol with anti-herpesvirus responses affect disease progression in clinically isolated syndromes. *J Neuroimmunol.* 2013; 263(1-2):121-7.
61. Pirko I, Cardin R, Chen Y, Lohrey AK, Lindquist DM, Dunn RS, Zivadinov R, Johnson AJ. CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2012; 7(2):e32767.
62. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, Pirko I, Johnson AJ, Furlan C, Pozzi-Mucelli RS, Monti-Bragadin L, Grop A, Zambon M, Antonello RM, Cazzato G, Zorzon M. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res.* 2006; 28(3):262-9.

63. Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J, Alfredsson L, Kockum I, Olsson T. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014; 20(2):165-73.
64. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Chabas D, Strober J, McDonald J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, Oksenberg JR, James JA and Network., US Pediatric MS. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology.* 2011; 76(23):1989-95.
65. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 1997; 120 (Pt 3):393-9.
66. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol.* 2000; 157(1):267-76.
67. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17(2):210-8.
68. Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Mahad D, Binder CJ, Krumbholz M, Bauer J, Bradl M, Lassmann H. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2013; 136(Pt 6):1799-815.
69. Moll NM, Rietsch AM, Ransohoff AJ, Cossoy MB, Huang D, Eichler FS, Trapp BD, Ransohoff RM. Cortical demyelination in PML and MS: Similarities and differences. *Neurology.* 2008; 70(5):336-43.
70. Hickey WF. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol.* 1999; 98(1):37-44.
71. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012; 7:185-217.
72. . Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, Mandrekar J, Bramow S, Metz I, Brück W, Lassmann H, Lucchinetti CF. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol.* 2015; 78(5):710-21.
73. Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Höftberger R, Bagnato F, Grabner G, Trattinig S, Pfeifenbring S, Brück W, Lassmann H. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain.* 2016; 139(3): 807–815.
74. Josa M, Frischer, Stephan Bramow, Assunta Dal-Bianco, Claudia F. Lucchinetti, Helmut Rauschka, Manfred Schmidbauer, Henning Laursen, Per Soelberg Sorensen, and Hans Lassmann corresponding author. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009; 132(5): 1175–1189.
75. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005; 128(Pt 11):2705-12.

76. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1983; 62(1-3):219-32.
77. Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: Major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol.* 1988; 24(4):523-31.
78. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014; 10(4):225-38.
79. Schattling B, Steinbach K, Thies E, Kruse M, Menigoz A, Ufer F, Flockerzi V, Brück W, Pongs O, Vennekens R, Kneussel M, Freichel M, Merkler D, Friese MA. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* 2012; 18(12):1805-11.
80. Mayo, L. et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med.* 2014; 20(10):1147-56.
81. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia.* 2013; 61(4):453-65
82. Ransohoff RM, Howe CL, Rodriguez M. Growth factor treatment of demyelinating disease: at last, a leap into the light. *Trends Immunol.* 2002; 23(11):512-6.
83. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain.* 2012; 135(Pt 3):886-99.
84. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011; 134(Pt 9):2755-71.
85. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2004; 172(6):3893-904.
86. Hellings N, Barée M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res.* 2001; 63(3):290-302.
87. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiula M, Mirabella M, Tonali PA, Batocchi AP. IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine.* 2008; 44(1):22-5.
88. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008; 172(1):146-55.
89. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, Hafler DA. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2015; 7(287):287ra74.

90. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009; 66(3):390-402.
91. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH and Investigators., Ustekinumab MS. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol.* 2008; 7(9):796-804.
92. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005; 11(3):335-9.
93. Willing A, Leach OA, Ufer F, Attfield KE, Steinbach K, Kursawe N, Piedavent M, Friese MA. CD8⁺ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2014; 44(10):3119-28.
94. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* 2006; 7(4):344-53.
95. Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, Nicholas R, Roncaroli F, Reynolds R. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2012; 135(Pt 10):2925-37.
96. Palanichamy, A. et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2014; 6(248):248ra106.
97. Stern, J. N. H. et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med.* 2014; 6(248):248ra107.
98. Hauser, S. L. et al. B-Cell Depletion With Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Med.* 2008; 358(7):676-8
99. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med.* 2012; 209(5):1001-10.
100. Michael T, Heneka, Markus P, Kummer, Eicke Latz. Innate immune activation in neurodegenerative disease *Nature Reviews Immunology.* 2014; 14(7):463-77
101. Giannetti, P. et al. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain.* 2015; 138(Pt 1):110-9.
102. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Coteleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* 2014; 211(8):1533-49.
103. Chen, Z. et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun.* 2014; 5:4486.
104. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol.* 2011; 186(8):4973-83.

105. BA., Singer. Parenteral Treatment of Multiple Sclerosis: The Advent of Monoclonal Antibodies. *Semin Neurol.* 2016; 36(2):140-7.
106. Steinman L, Zamvil SS. Beginning of the end of two-stage theory purporting that inflammation then degeneration explains pathogenesis of progressive multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2016; 29(3):340-4.
107. van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson AJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Adèr HJ, Polman CH. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology.* 1997; 49(2):351-7.
108. Adams, R. D. & Kubik, C. S. Am. The morbid anatomy of the demyelinating diseases. *J. Med.* 1952; 510–546-
109. Koritschoner, R.und Schweinburg, F. Z. Klinisch und experimentelle beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Immunitats Forsh.* 1925; 217–283.
110. Stuart G, Krikorian KS. The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* 1928; 22:327–377.
111. Stuart, G. & Krikorian, K. S. A fatal neuro-paralytic accident of antirabies treatment. *Lancet* 1, 1930; 1123–1125.
112. Rivers, T. M. & Schwentker, F. F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkey.. *J. Exp. Med.* 61. 1935; 689–702.
113. Schwentker, F. F. & Rivers, T. M. The antibody response of rabbits to injection of emulsions and extracts of homologous brain. *J. Exp. Med.* 60. 1934; 559–574.
114. Freund, J. & McDermott, K. Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Soc. Exp. Biol.* 49. 1942; 548–553.
115. Kabat, E. A., Wolf, A. & Bezer, A. E. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.* 85. 1947; 117–130.
116. Morgan, I. M. Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.* 1947; 131–140.
117. Wolf, A., Kabat, E. A. & Bezer, A. E. The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 6, 1947; 333–357.
118. Freund, J., Stern, E. R. & Pisini, T. M. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsi *J. Immunol.* 57. 1947; 179–194.
119. Morrison, L. R. Arch. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Neurol. Psychiat.* 1947; 58, 391–416.
120. Lumsden, C. E. Experimental allergic encephalomyelitis II — on the nature of the encephalitogenic agent. *Brain* 27. 1949; 517–537.
121. Olitsky, P. K. & Yager, R. H. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J. Exp. Med.* 1949; 90, 213–223.

122. Lipton, M. M. & Freund, Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *J. Proc. Soc. Exp. Biol.* NY 81.1952; 260–261.
123. Tal, C., Laufer, A. & Behar, A. J. Br. J. An experimental demyelinating disease in the Syrian hamster. *Exp. Pathol.* 39. 1958; 158–164.
124. Thomas, L., Paterson, P. Y. & Smithwick, B. Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts: I. Studies on the role of a circulating antibody in the production of the condition in dogs. *J. Exp. Med.* 92. 1950; 133–152.
125. Innes, J. R. M. J. Experimental allergic encephalitis: attempts to produce the disease in sheep and goats. *Comp. Path.* 61 1951; 241–250.
126. Ranzenhofer, E. R., Lipton, M. M. & Steigman, A. Effect of homologous spinal cord in Freund's adjuvant on cockerel comb, testicular and body growth. *J. Proc. Soc. Exp. Biol.* 1958; NY 99, 280–282.
127. Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol. Biol.* 2012; 900: 363-80.
128. AR, Pachner. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2011; 24(3):291-9.
129. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981; 11(3):195-9.
130. Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest.* 2006; 116(9):2385-92.
131. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441(7090):235-8.
132. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011; 479(7374):538-41.
133. AG, Baxter. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(11):904-12.
134. Sajad M, Zargan J, Chawla R, Umar S, Sadaqat M, Khan HA. Hippocampal neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): potential role of inflammation activated myeloperoxidase. *Mol Cell Biochem.* 2009; 328(1-2):183-8.
135. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006; 129(Pt 8):1953-71.
136. Renno T, Zeine R, Girard JM, Gillani S, Dodelet V, Owens T. Selective enrichment of Th1 CD45RBlow CD4+ T cells in autoimmune infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol.* 1994; 6(3):347-54.

137. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol.* 1989; 124(1):132-43.
138. Lafaille JJ, Keere FV, Hsu AL, Baron JL, Haas W, Raine CS, Tonegawa S. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med.* 1997; 186(2):307-12.
139. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest.* 2002; 110(4):493-7.
140. Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol.* 2002; 169(12):7104-10.
141. Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, Kamoun M, Rostami A. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol.* 2003; 170(4):2153-60.
142. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003; 421(6924):744-8.
143. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201(2):233-40.
144. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2003; 112(8):1186-91.
145. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 2006; 126(6):1121-33.
146. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity.* 2008; 28(1):29-39.
147. Kurschus FC, Croxford AL, Heinen AP, Wörtge S, Ielo D, Waisman A. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol.* 2010; 40(12):3336-46.
148. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011; 12(3):255-63.

149. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*. 2008; 14(3):337-42.
150. Ghoreschi, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 2010; 467(7318):967-71.
151. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012; 484(7395):514-8.
152. Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011; 12(6):560-7.
153. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang HD, Radbruch A, Zielinski CE. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med*. 2014; 6(241):241ra80.
154. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. 2007; 13(4):423-31.
155. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*. 2010; 24(4):1023-34.
156. 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; 205(7):1535-41.
157. Zehntner SP, Brickman C, Bourbonnière L, Remington L, Caruso M, Owens T. Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol*. 2005; 174(8):5124-31.
158. Soulika AM, Lee E, McCauley E, Miers L, Bannerman P, Pleasure D. Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 2009; 29(47):14965-79.
159. Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med*. 2008; 205(4):811-23.
160. McColl SR, Staykova MA, Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO. Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1998; 161(11):6421-6.
161. Aubé B, Lévesque SA, Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, Lécuyer MA, Alvarez JI, De Koninck Y, Engelhardt B, Prat A, Côté D, Lacroix S. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol*. 2014; 193(5):2438-54.

162. Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol.* 2013; 191(9):4531-9.
163. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006; 203(4):1007-19.
164. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T, Takata K, Koda T, Tada S, Shirakura T, Fujimura H, Mochizuki H, Sakoda S, Nakatsuji Y. Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71329.
165. van der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K, Roos D, van den Berg TK, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol.* 1998; 92(1-2):67-75.
166. Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995; 38(5):788-96.
167. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002; 25(6):313-9.
168. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol.* 2001; 159(3):809-15.
169. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2001; 166(12):7579-87.
170. Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hünig T, Mittrücker HW, Brüstle A, Kamradt T, Lohoff M. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol.* 2009; 39(7):1716-25.
171. Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, Guralnik A, Bollig N, Jeltsch K, Heinemann C, Wittmann E, Buch T, Prazeres da Costa O, Brüstle A, Brenner D, Mak TW, Mittrücker HW, Tackenberg B, Kamradt T, Lohoff M. IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2013; 123(1):247-60.
172. Weiner HL, Selkoe DJ. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature.* 2002; 420(6917):879-84.
173. Kriegel MA, Rathinam C, Flavell RA. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c⁺ CD11b⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(9):3457-62.
174. Cinque P, Marenzi R, Ceresa D. Cytomegalovirus infections of the nervous system. *Intervirology.* 1997; 40(2-3):85-97.
175. Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol.* 1992; 31(1):64-8.
176. Smith AJ, Weidman F. Infection of a stillborn infant by an amebiform protozoön (*Entamoeba mortinatalium*, N.S.). *Univ Penn Med Bull.* 1910; 23: 285–298.

177. Hill RB Jr, Rowlands DT Jr, Rifkind D. Infectious pulmonary disease in patients receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. *N Engl J Med* 1964; 271: 1021–1027.
178. Goodpasture E, Talbot F. Concerning the nature of "protozoan-like" cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child*. 1921; 21(5):415-425.
179. Sinzger C, Plachter B, Stenglein S, Jahn G. Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis*. 1993; 167(6):1427-32.
180. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*. 1995; 76 (Pt 4):741-50.
181. Roberts WH, Sneddon JM, Waldman J, Stephens RE. Cytomegalovirus infection of gastrointestinal endothelium demonstrated by simultaneous nucleic acid hybridization and immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113(5):461-4.
182. Francis ND, Boylston AW, Roberts AH, Parkin JM, Pinching AJ. Cytomegalovirus infection in gastrointestinal tracts of patients infected with HIV-1 or AIDS. *J Clin Pathol*. 1989; 42(10):1055-64.
183. Escudero-Fabre A, Cummings O, Kirklin JK, Bourge RC, Aldrete JS. Cytomegalovirus colitis presenting as hematochezia and requiring resection. *Arch Surg*. 1992; 127(1):102-4.
184. Ng-Bautista CL, Sedmak DD. Cytomegalovirus infection is associated with absence of alveolar epithelial cell HLA class II antigen expression. *J Infect Dis*. 1995 ;171(1):39-44.
185. Aukrust P, Farstad IN, Frøland SS, Holter E. Cytomegalovirus (CMV) pneumonitis in AIDS patients: the result of intensive CMV replication? *Eur Respir J*. 1992; 5(3):362-4.
186. Gnann JW Jr, Ahlmén J, Svalander C, Olding L, Oldstone MB, Nelson JA. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol*. 1988; 132(2):239-48.
187. Nelson, C. A. Wiley and J. A. Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am J Pathol*. 1988; 133(1): 73–81.
188. Histopathologic and molecular profile of human cytomegalovirus infections in patients with heart transplants Arbustini E, Grasso M, Diegoli M, Percivalle E, Grossi P, Bramerio M, Campana C, Goggi C, Gavazzi A, Vigano M.. *Am J Clin Pathol*. 1992; 98(2):205-13.
189. Wu TC, Hruban RH, Ambinder RF, Pizzorno M, Cameron DE, Baumgartner WA, Reitz BA, Hayward GS, Hutchins GM. Demonstration of cytomegalovirus nucleic acids in the coronary arteries of transplanted hearts. *Am J Pathol*. 1992; 140(3):739-47.
190. Aqel NM, Tanner P, Drury A, Francis ND, Henry K. Cytomegalovirus gastritis with perforation and gastrocolic fistula formation. *Histopathology*. 1991; 18(2):165-8.
191. Nabeshima K, Sakaguchi E, Inoue S, Eizuru Y, Minamishima Y, Koono M. Jejunal perforation associated with cytomegalovirus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Acta Pathol Jpn*. 1992; 42(4):267-71.
192. Mühlemann K, Miller RK, Metlay L, Menegus MA. Cytomegalovirus infection of the human placenta: an immunocytochemical study. *Hum Pathol*. 1992; 23(11):1234-7.

193. Sinzger C, Müntefering H, Löning T, Stöss H, Plachter B, Jahn G. Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(4):249-56.
194. Gretchen L, Bentz, Marta Jarquin-Pardo, Gary Chan, M. Shane Smith, Christian Sinzger, and Andrew D. Yurochk. Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection of Endothelial Cells Promotes Naïve Monocyte Extravasation and Transfer of Productive Virus To Enhance Hematogenous Dissemination of HCMV *J Virol.* 2006; 80(23): 11539–11555.
195. K Kondo, H Kaneshima, E S Mocarski. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(25): 11879–11883.
196. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 2011; 121(5):1673-80.
197. Carlson C, Britt WJ, Compton T. Expression, purification, and characterization of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Virology* 1997; 239: 198–205.
198. Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol* 2009; 83: 3891–3903.
199. MG., SMITH. Propagation of salivary gland virus of mouse in tissue cultures. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;86(3):435-40.
200. Shellam GR, Redwood AJ, Smith LM, Gorman S. Murine cytomegalovirus and other herpesviruses. p. 1-48. *The mouse in biomedical research, vol. 2.* Academic Press, Inc., New York, NY. 2006.
201. J. Trgovcich, E. Pernjak-Pugel, J. Tomac, U.H. Koszinowski, S. Jonjic, in: F.R.M. Scholz, W. Doerr, J. Cinatl Jr (Eds.). *Monographs in Virology*, Karger, Basel. 1998; pp. 42–53.
202. Koontz T, Bralic M, Tomac J, Pernjak-Pugel E, Bantug G, Jonjic S. Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. *J Exp Med.* 2008;205(2):423-35.
203. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1):99-126,
204. Y, Tsutsui. Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development. *Congenit Anom (Kyoto).* 2009; 49(2):47-55.
205. Lokensgard JR, Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Chao CC, Peterson PK. Human cytomegalovirus replication and modulation of apoptosis in astrocytes. *J Hum Virol.* 1999; 2(2):91-101.
206. Spiller OB, Borysiewicz LK, Morgan BP. Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes. *J Gen Virol.* 1997; 78 (Pt 12):3349-56.
207. Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol.* 1998; 72(7):5661-8.
208. Lathey JL, Wiley CA, Verity MA, Nelson JA. Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. *Virology.* 1990; 176(1):266-73.

209. Poland SD, Costello P, Dekaban GA, Rice GP. Cytomegalovirus in the brain: in vitro infection of human brain-derived cells. *J Infect Dis.* 1990; 162(6):1252-62.
210. Mutnal MB, Hu S, Little MR, Lokensgard JR. Memory T cells persisting in the brain following MCMV infection induce long-term microglial activation via interferon- γ . *J Neurovirol.* 2011; 17(5):424-37.
211. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol.* 2006; 80(18):8929-39.
212. Mutnal MB, Cheeran MC, Hu S, Lokensgard JR. Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. *PLoS One.* 2011; 6(1):e16211.
213. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Sundström E, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. *J Neurosci Res.* 2007; 85(3):583-93.
214. Arai Y, Ishiwata M, Baba S, Kawasaki H, Kosugi I, Li RY, Tsuchida T, Miura K, Tsutsui Y. Neuron-specific activation of murine cytomegalovirus early gene e1 promoter in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2003; 163(2):643-52.
215. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H. Neuropathogenesis in cytomegalovirus infection: indication of the mechanisms using mouse models. *Rev Med Virol.* 2005; 15(5):327-45.
216. Li RY, Tsutsui Y. Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus. *Teratology.* 2000; 62(2):79-85.
217. Slavuljica I, Kveštak D, Huszthy PC, Kosmac K, Britt WJ, Jonjić S. Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system—the murine cytomegalovirus model. *Cell Mol Immunol.* 2015; 12(2):180-91.
218. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *Am J Pathol.* 2002; 161(3):919-28.
219. Han GP, Li L, Kosugi I, Kawasaki H, Tsuchida T, Miura K, Tsutsui Y. Enhancement of susceptibility of adult mouse brain to cytomegalovirus infection by infusion of epidermal growth factor. *J Neurosci Res.* 2007; 85(13):2981-90.
220. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* 2003; 424(6947):456-61.
221. Cekinović D, Golemac M, Pugel EP, Tomac J, Cicin-Sain L, Slavuljica I, Bradford R, Misch S, Winkler TH, Mach M, Britt WJ, Jonjić S. Passive immunization reduces murine cytomegalovirus-induced brain pathology in newborn mice. *J Virol.* 2008; 82(24):12172-80.
222. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* 2011; 52(3):244-6.
223. Grassi MP, Clerici F, Perin C, D'Arminio Monforte A, Vago L, Borella M, Boldorini R, Mangoni A. Microglial nodular encephalitis and ventriculoencephalitis due to cytomegalovirus infection in patients with AIDS: two distinct clinical patterns. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(3):504-8.

224. González-Sánchez HM1, Monsiváis-Urenda A, Salazar-Aldrete CA, Hernández-Salinas A, Noyola DE, Jiménez-Capdeville ME, Martínez-Serrano A, Castillo CG. Effects of cytomegalovirus infection in human neural precursor cells depend on their differentiation state. *J Neurovirol.* 2015; 21(4):346-57.
225. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 1995; 18:159-92.
226. R, McKay. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997; 276(5309):66-71.
227. Miller GG, Boivin G, Dummer JS, McConnell T, Becher MW, Kassim A, Tang YW. Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in a peripheral blood stem cell transplant recipient. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(4):e26-9.
228. Nesin M, Cunningham-Rundles S. Cytokines and neonates. *Am J Perinatol.* 2000; 17(8):393-404.
229. Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Sasaki M, Matsumoto T, Mikami K, Aiba Y, Hasegawa H, Kawabe N, Koga Y. Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus. *J Immunol.* 2001; 166(5):3533-41.
230. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 2006; 7:131-137.
231. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988; 141(7):2407-12.
232. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol.* 1997; 71(1):267-75.
233. M. Dalod, T. Hamilton, R. Salomon, T.P. Salazar-Mather, S.C. Henry. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med.* 2003; 197(7):885-98.
234. M.P. Gil, E. Bohn, A.K. O'Guin, C.V. Ramana, B. Levine, G.R. Stark. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(12): 6680–6685.
235. R.M. Presti, J.L. Pollock, A.J. Dal Canto, A.K. O'Guin, H.W. t.Virgin. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med.* 1998; 188(3):577-88.
236. Hamilton ST, Scott GM, Naing Z, Rawlinson WD Human cytomegalovirus directly modulates expression of chemokine CCL2 (MCP-1) during viral replication. *J Gen Virol.* 2013; 94(Pt 11):2495-503.
237. Saederup N, Aguirre SA, Sparer TE, Bouley DM, Mocarski ES. Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection. *J Virol.* 2001; 75:9966–76. .
238. Noda S, Aguirre SA, Bitmansour A, Brown JM, Sparer TE, Huang J, Mocarski ES. Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination . *Blood.* 2006; 107(1):30-8.

239. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, Wikstrom ME, Khong A, Voigt V, Fleming P, Tabarias H, Hill GR, van der Most RG, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med.* 2010; 207(6):1333-43
240. Hou, L. Hyland, K.W. Ryan, A. Portner, P.C. Doherty. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size, *Nature.* 1994; 369(6482):652-4.
241. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(6):367-77.
242. B. Polic, S. Jonjic, I. Pavic, I. Crnkovic, I. Zorica, H. Hengel, P. Lucin. Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *J Gen Virol.* 1996; 77 (Pt 2):217-25.
243. S. Jonjic, I. Pavic, P. Lucin, D. Rukavina, U.H. Koszinowski. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol.* 1990; 64(11):5457-64.
244. S. Jonjic, W. Mutter, F.Weiland, M.J. Reddehase, U.H. Koszinowski. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med.* 1989 ;169(4):1199-212.
245. J. Podlech, R. Holtappels, N. Wirtz, H.P. Steffens, M.J. Reddehase. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J Gen Virol.* 1998; 79 (Pt 9):2099-104.
246. M. Alterio de Goss, R. Holtappels, H.P. Steffens, J. Podlech. Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *J Virol.* 1998; 72(10):7733-44.
247. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ. Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. *PLoS Pathog.* 2013; 9(3):e1003200.
248. Bantug GR, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J Immunol.* 2008 Aug; 181(3):2111-23.
249. Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Peterson PK. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis.* 2002; 186 Suppl 2:S171-9.
250. van den Pol AN, Robek MD, Ghosh PK, Ozduman K, Bandi P, Whim MD, Wollmann G. Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression and is attenuated by interferon in the developing brain. *J Virol.* 2007; 81(1):332-48.
251. Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Lokensgard JR. Decreased cytomegalovirus expression following proinflammatory cytokine treatment of primary human astrocytes. *J Immunol.* 2000; 164(2):926-33.

252. Cheeran MC, Hu S, Yager SL, Gekker G, Peterson PK, Lokensgard JR. Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: antiviral implications. *J Neurovirol.* 2001; 7(2):135-47.
253. Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Lokensgard JR. CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. *J Virol.* 2003; 77(8):4502-15.
254. Cheeran MC, Hu S, Palmquist JM, Bakken T, Gekker G, Lokensgard JR. Dysregulated interferon-gamma responses during lethal cytomegalovirus brain infection of IL-10-deficient mice. *Virus Res.* 2007; 130(1-2):96-102.
255. Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(4):1695-700.
256. Andrews DM, Matthews VB, Sammels LM, Carrello AC, McMinn PC. The severity of murray valley encephalitis in mice is linked to neutrophil infiltration and inducible nitric oxide synthase activity in the central nervous system. *J Virol.* 1999; 73(10):8781-90.
257. Mutnal MB, Cheeran MC, Hu S, Little MR, Lokensgard JR. Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. *J Neuroimmunol.* 2010; 227(1-2):101-10.
258. Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Palmquist JM, Lokensgard JR. T cell-mediated restriction of intracerebral murine cytomegalovirus infection displays dependence upon perforin but not interferon-gamma. *J Neurovirol.* 2005; 11(3):274-80.
259. Reddehase MJ, Weiland F, Münch K, Jonjic S, Lüske A, Koszinowski UH. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol.* 1985; 55(2):264-73.
260. Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol.* 1987; 61(10):3102-8.
261. Graham JB, Da Costa A, Lund JM. Regulatory T cells shape the resident memory T cell response to virus infection in the tissues. *J Immunol.* 2014; 192(2):683-90.
262. Tishon A, Lewicki H, Andaya A, McGavern D, Martin L, Oldstone MB. CD4 T cell control primary measles virus infection of the CNS: regulation is dependent on combined activity with either CD8 T cells or with B cells: CD4, CD8 or B cells alone are ineffective. *Virology.* 2006; 347(1):234-45.
263. Poole E, Avdic S, Hodkinson J, Jackson S, Wills M, Slobedman B, Sinclair J. Latency-associated viral interleukin-10 (IL-10) encoded by human cytomegalovirus modulates cellular IL-10 and CCL8 Secretion during latent infection through changes in the cellular microRNA hsa-miR-92a. *J Virol.* 2014; 88(24):13947-55.
264. R S Fujinami, M B Oldstone, Z Wroblewska, M E Frankel, and H Koprowski. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex

- virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(8): 2346–2350.
265. J Srinivasappa, J Saegusa, B S Prabhakar, M K Gentry, M J Buchmeier, T J Wiktor, H Koprowski, M B Oldstone, and A L Notkins. Molecular mimicry: frequency of reactivity of monoclonal antiviral antibodies with normal tissues. *J Virol*. 1986; 57(1): 397–401.
266. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995; 80(5):695–705.
267. Hemmer B, Fleckenstein BT, Vergelli M, Jung G, McFarland H, Martin R, Wiesmüller KH. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med*. 1997; 185(9):1651-9.
268. Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol*. 2001; 2(9):797-801.
269. Vanheusden M1, Stinissen P, 't Hart BA, Hellings N. Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med*. 2015; 21(1):16-23.
270. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5(10):679-87.
271. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity*. 2006; 39(1):9-19.
272. Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Kinkel PR. Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease. *J Autoimmun*. 1999; 13(1):11-20.
273. T., Wilkin. Autoimmunity: attack, or defence? (The case for a primary lesion theory). *Autoimmunity*. 1989; 3(1):57-73.
274. Tuohy VK, Kinkel RP. Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000; 48(5):347-51.
275. Robert S. Fujinami, Matthias G. von Herrath, Urs Christen, and J. Lindsay Whitton. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 80–94.
276. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med*. 2011; 364: 2111–2118.
277. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*. 1992; 326(10):663-7.
278. Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, et al. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol*. 2008; 82:7078–7088.

279. Attfield KE, Dendrou CA, Fugger L. Bridging the gap from genetic association to functional understanding: the next generation of mouse models of multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 2012; 248(1):10-22.
280. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108
281. Brabb T, Goldrath AW, von Dassow P, Paez A, Liggitt HD, Goverman J. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol.* 1997; 159(1):497-507.
282. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA.* 2001; 286(24):3083-8
283. Casiraghi C, Shanina I, Cho S, Freeman ML, Blackman MA, Horwitz MS. Gammaherpesvirus latency accentuates EAE pathogenesis: relevance to Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): e1002715.
284. Wroblewska Z, Gilden D, Devlin M, Huang ES, Rorke LB, Hamada T, Furukawa T, Cummins L, Kalter S, Koprowski H. Cytomegalovirus isolation from a chimpanzee with acute demyelinating disease after inoculation of multiple sclerosis brain cells. *Infect Immun.* 1979; 25(3):1008-15.
285. Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, Shoenfeld Y. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1108:567-77.
286. Najafi S, Ghane M, Poortahmasebi V, Jazayeri SM, Yousefzadeh-Chabok S. Prevalence of Cytomegalovirus in Patients With Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in Northern Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(7):e36582.
287. Pinto-Medel MJ1, García-León JA, Oliver-Martos B, López-Gómez C, Luque G, Arnáiz-Urrutia C, Orpez T, Marín-Bañasco C, Fernández O, Leyva L. The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012; 243(1-2):1-11.
288. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol.* 2007; 179(10):6514-23.
289. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends Mol Med.* 2012; 18(8):446-53.
290. Brok HP, Boven L, van Meurs M, Kerlero de Rosbo N, Celebi-Paul L, Kap YS, Jagessar A, Hintzen RQ, Keir G, Bajramovic J, Ben-Nun A, Bauer J, Laman JD, Amor S, 't Hart BA. The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol.* 2007 ;182(1-2):135-52. Epub 2006 Nov 28.

291. Schmitt C, Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:187.
292. Pierson E, Simmons SB, Castelli L, Goverman JM. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev*. 2012; 248(1):205-15.
293. van den Pol AN, Reuter JD, Santarelli JG. Enhanced cytomegalovirus infection of developing brain independent of the adaptive immune system. *J Virol*. 2002; 76(17):8842-54.
294. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Chabas D, Strober J, McDonald J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, Oksenberg JR, James JA and Network. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology*. 2011; 76(23):1989-95.
295. Jagessar SA, Kap YS, Heijmans N, van Driel N, van Straalen L, Bajramovic JJ, Brok HP, Blezer EL, Bauer J, Laman JD, 't Hart BA. Induction of progressive demyelinating autoimmune encephalomyelitis in common marmoset monkeys using MOG34-56 peptide in incomplete Freund adjuvant. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69(4):372-85.
296. Zheng MM, Zhang XH. Cross-reactivity between human cytomegalovirus peptide 981-1003 and myelin oligodendroglia glycoprotein peptide 35-55 in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 443(3):1118-23.
297. Kennedy MK, Dal Canto MC, Trotter JL, Miller SD. Specific immune regulation of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol*. 1988; 141(9):2986-93.
298. Fujinami RS1, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1):80-94.
299. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(2): 223–244.
300. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000; 192(3): 393-404. .
301. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. *Nat Rev Immunol*. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. 2003; 3(7):569-81.
302. Huseby, E. S., Sather, B., Huseby, P. G. & Goverman, J. Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity*. 2001; 14(4):471-81.
303. Furtado, G. C. et al. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2008; 181(7):4648-55.
304. Piccio, L. et al. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric Gi-linked receptors. *J. Immunol*. 2002; 168, 1940–1949.
305. Carrithers, M. D., Visintin, I., Viret, C. & Janeway, C. S. Jr. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J. Neuroimmunol*. 2002; 129(1-2):51-7.

306. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* 2009; 10(5):514-23.
307. Tompkins, S.M. et al. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2002; 168(8):4173-83.
308. Kawakami, N. et al. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2004; 199(2):185-97.
309. Archambault, A.S., Sim, J., Gimenez, M.A. & Russell, J.H. Eur. Defining antigen-dependent stages of T cell migration from the blood to the central nervous system parenchyma. *J. Immunol.* 2005; 35(4):1076-85.
310. Slavin AJ, Soos JM, Stuve O, Patarroyo JC, Weiner HL, Fontana A, Bikoff EK, Zamvil SS. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J Clin Invest.* 2001; 108(8):1133-9.
311. McMenamin, P.G. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations *J. Comp Neurol.* 1999; 405(4):553-62.
312. Matyszak, M.K. & Perry, V.H. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience.* 1996; 74(2):599-608.
313. Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F., & Aloisi, F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2000; 157(6):1991-2002.
314. Greter, M. et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005; 11(3):328-34.
315. Lassmann H, Wisniewski HM. Chronic relapsing EAE. Time course of neurological symptoms and pathology. *Acta Neuropathol.* 1978; 43(1-2):35-42.
316. Brown DA, Sawchenko PE. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol.* 2007; 502(2):236-60.
317. Gimenez, M. A., Sim, J., Archambault, A. S., Klein, R. S. & Russell, J. H. A tumor necrosis factor receptor 1-dependent conversation between central nervous system-specific T cells and the central nervous system is required for inflammatory infiltration of the spinal cord. *Am. J. Pathol.* 2006; 168(4):1200-9.
318. Gay F. W., Drye T. J., Dick G. W., Esiri M. M. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain.* 1997; 120 (Pt 8):1461-83.

319. Jacobsen, M., S. Cepok, E. Quak, M. Happel, R. Gaber, A. Ziegler, S. Schock, W. H. Oertel, N. Sommer, B. Hemmer. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*. 2002; 125(Pt 3):538-50.
320. Goverman, J., Perchellet, A. & Huseby, E. S. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17(2) 239–245.
321. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8⁺ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain*. 2005; 128(Pt 8):1747-63
322. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*. 2007; 130(Pt 11):2789-99.
323. Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ. Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004; 172(8):5120-7.
324. Tzartos, J. S. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2008 Jan; 172(1):146-55.
325. Huseby, E. S. et al. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁺ T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 2001; 194(5):669-76.
326. Ford, M. L., B. D. Evavold. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8⁺ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35(1):76-85.
327. Koh, D. R. et al. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*. 1992; 256(5060):1210-3.
328. Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1992 May 22;256(5060):1213-5.
329. York, N. R., J. P. Mendoza, S. B. Ortega, A. Benagh, A. F. Tyler, M. Firan, N. J. Karandikar. Immune regulatory CNS-reactive CD8⁺T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 2010; 35(1):33-44
330. Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, Sullivan JM, Solomon A, Rodriguez-Manzanet R, Greve B, Sobel RA, Kuchroo VK. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T and B cells. *J Immunol*. 2012; 188(5):2084-92.
331. Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol*. 1998; 160(6):3056-9.
332. Merrill JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, Hofman FM. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(2):574-8.
333. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, Miller VL, Virgin HW 4th. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*. 2007; 447(7142):326-9.

334. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1991; 325(7):467-72.
335. Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol.* 1991; 34(2-3):159-64.
336. Crisi GM, Santambrogio L, Hochwald GM, Smith SR, Carlino JA, Thorbecke GJ. Staphylococcal enterotoxin B and tumor-necrosis factor-alpha-induced relapses of experimental allergic encephalomyelitis: protection by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995; 25(11):3035-40.
337. Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, Lingenheld EG, Grunnet ML, Padula SJ, et al. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1990; 172(4):1193-200.
338. Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol.* 1994; 24(9):2040-8.
339. Martin D, Near SL, Bendele A, Russell DA. Inhibition of tumor necrosis factor is protective against neurologic dysfunction after active immunization of Lewis rats with myelin basic protein. *Exp Neurol.* 1995; 131(2):221-8.
340. Selmaj K, Papierz W, Glabinski A, Kohno T. Prevention of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor I. *J Neuroimmunol.* 1995; 56(2):135-41.
341. Willenborg DO, Fordham SA, Cowden WB, Ramshaw IA. Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scand J Immunol.* 1995; 41(1):31-41.
342. Klinkert WE, Kojima K, Lesslauer W, Rinner W, Lassmann H, Wekerle H. TNF- α -alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. *J Neuroimmunol* 1997; 163-8, 72.
343. Liu, J., M.W. Marino, G. Wong, D. Grail, A. Dunn, J. Bettadapura, A.J. Slavin, L. Old, and C.C. Bernard. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Med.* 1998; 4(1):78-83.
344. Probert, L., H.P. Eugster, K. Akassoglou, J. Bauer, K. Frei, H. Lassmann, and A. Fontana. TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain.* 2000; 123 (Pt 10):2005-19.
345. Rev, Olsson T. Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 1995; 144:245-68.
346. Korner H, Riminton DS, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD. Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. *J Exp Med.* 1997; 186(9):1585-90.

347. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 1988; 23(4):339-46.
348. D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, Goodyer C, Antel JP. Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF- α -dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci.* 1995; 15 (11) 7293-7300.
349. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol.* 1997; 158:438–45.
350. Agresti C, D'Urso D, Levi, G. Reversible inhibitory effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci.* 1996; 8:1106–16.
351. Fassbender, K., A. Ragoschke, S. Rossol, A. Schwartz, O. Mielke, A. Paulig, and M. Hennerici. Increased release of interleukin-12p40 in MS: association with intracerebral inflammation. *Neurology.* 1998; 51:753–758.
352. Moldovan, I.R., R.A. Rudick, A.C. Cotleur, S.E. Born, J.C. Lee, M.T. Karafa, and C.M. Pelfrey. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J. Neuroimmunol.* 2003; 141:132.
353. van Boxel-Dezaire, A.H., S.C. Hoff, B.W. van Oosten, C.L. Verweij, A.M. Drager, H.J. Ader, J.C. van Houwelingen, F. Barkhof, C.H. Polman, and L. Nagelkerken. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1999; 45:695–703.
354. Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Haley, A. S. & Johnson, K. P. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet.* 1987; 1:893–895.
355. Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, C. G. Fathman. Mice with a disrupted IFN- γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* 1996; 156:5-7.
356. Gutcher, I. & Becher, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:1119–1127.
357. Chu, C.Q., Wittmer, S. & Dalton, D.K. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon γ -deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2000; 192:123–128.
358. Steinman, L. A brief history of TH17, the first major revision in the T H 1/T H 2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Med.* 2007; 13:139–145.
359. Segal, B.M., B.K. Dwyer, and E.M. Shevach. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1998; 187:537–546.
360. Kreyborg, K., Bohlmann, U. & Becher, B. IL-23: changing the verdict on IL-12 function in inflammation and autoimmunity. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2005; 9:1123–1136.
361. McGeachy, M. J. et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunol.* 2009; 10:314–324.

362. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; 24:179-189.
363. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J. & Gurney, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:1910–1914.
364. Axtell, R. C., Xu, L., Barnum, S. R. & Raman, C. CD5–CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J. Immunol.* 2006; 177:8542–8549.
365. Lees, J. R., Golumbek, P. T., Sim, J., Dorsey, D. & Russell, J. H. Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *J. Exp. Med.* 2008; 205:2633–2642.
366. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, Martin-Orozco N, Kang HS, Ma L, Panopoulos AD, Craig S, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 181(12):8391-401.
367. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med.* 2007; 204(12):2803-12.
368. Yang Y, Weiner J, Liu Y, Smith AJ, Huss DJ, Winger R, Peng H, Cravens PD, Racke MK, Lovett-Racke AE. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med.* 2009; 206(7):1549-64.
369. Nath N, Prasad R, Giri S, Singh AK, Singh I. T-bet is essential for the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* 2006; 118:384-391.
370. Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, Lovett-Racke AE. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol.* 2007; 178(3):1341-8.
371. Sporici R, Issekutz TB. CXCR3 blockade inhibits T-cell migration into the CNS during EAE and prevents development of adoptively transferred, but not actively induced, disease. *Eur J Immunol.* 2010; 40(10): 2751–2761.
372. Müller M, Carter SL, Hofer MJ, Manders P, Getts DR, Getts MT, Dreykluft A, Lu B, Gerard C, King NJ, Campbell IL. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol.* 2007; 179(5):2774-86.
373. Liu L, Huang D, Matsui M, He TT, Hu T, Demartino J, Lu B, Gerard C, Ransohoff RM. Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3-/- mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 176(7):4399-409.

374. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(12):6873-8.
375. Syrbe U, Siveke J, Hamann A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol*. 1999; 21(3):263-85.
376. Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*. 2009; 182(4):1794-8.
377. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, Wherry EJ, Lindsten T, Reiner SL. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science*. 2008; 321(5887):408-11.
378. Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J Virol*. 2007; 81(3): 1241-1250.
379. Liston A, Kohler RE, Townley S, et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J Immunol*. 2009; 182(5): 3121–3130.
380. Aloisi, F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001; 36:165–179.
381. Becher, B., Blain, M. & Antel, J. P. CD40 engagement stimulates IL-12 p70 production by human microglial cells: basis for Th1 polarization in the CNS. *J. Neuroimmunol*. 2000; 102:44–50.
382. Ford, A. L., Foulcher, E., Lemckert, F. A. & Sedgwick, J. D. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp. Med*. 1996; 184:1737–1745.
383. Juedes, A. E. & Ruddle, N. H. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2001; 166: 5168–5175.
384. Zinkernagel MS, Chinnery HR, Ong ML, Petitjean C, Voigt V, McLenachan S, McMenamin PG, Hill GR, Forrester JV, Wikstrom ME, Degli-Esposti MA. Interferon γ -Dependent Migration of Microglial Cells in the Retina after Systemic Cytomegalovirus Infection. *Am J Pathol*. 2013; 182(3):875-85.
385. Becher, B., Durell, B.G. & Noelle, R.J. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest*. 2003; 112:1186–1191.
386. Becher, B., Durell, B. G., Miga, A. V., Hickey, W. F. & Noelle, R. J. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J. Exp. Med*. 2001; 193(8):967-74.
387. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E et al. 28. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2009; 182(2):1167-73.
388. I, Palframan RT. Jung S. Cheng G. Weninger W. Luo Y. Dorf M. Littman DR. Rollins BJ. Zweerink H. Rot A. von Andrian UH. Inflammatory chemokine transport and presentation in

- HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*. 2001; 194:1361–1373.
389. Daley-Bauer LP, Wynn GM, Mocarski ES. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 2012; 37(1):122-133. .
390. Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, Gunn MD. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol*. 2009; 10(4):394-402.
391. Li H, Zhang GX, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, Rostami A. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008; 181(4):2483-93.
392. Min SY, Park KS, Cho ML, Kang JW, Cho YG, Hwang SY, Park MJ, Yoon CH, Min JK, Lee SH, Park SH, Kim HY. Antigen-induced, tolerogenic CD11c+,CD11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(3):887-98.
393. Viale R, Ware R, Maricic I, Chaturvedi V, Kumar V. NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2012; 8(4):287-296.
394. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, Burdin N, Naidenko O, Kronenberg M, Koezuka Y, Kumar V. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001; 194(12):1789-99.
395. Singh AK, Wilson MT, Hong S, Olivares-Villagómez D, Du C, Stanic AK, Joyce S, Sriram S, Koezuka Y, Van Kaer L. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001; 194(12):1801-11.
396. Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, Casorati G, Martino G. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol*. 2003; 33(7):1830-8.
397. Teige A, Teige I, Lavasani S, Bockermann R, Mondoc E, Holmdahl R, Issazadeh-Navikas S. CD1-dependent regulation of chronic central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2004; 172(1):186-94.
398. Qian G, Qin X, Zang YQ, Ge B, Guo TB, Wan B, Fang L, Zhang JZ. High doses of alpha-galactosylceramide potentiate experimental autoimmune encephalomyelitis by directly enhancing Th17 response. *Cell Res*. 2010; 20(4):480-91.
399. Van Kaer L, Wu L, Parekh VV. Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 2015; 146(1):1-10.
400. Wensveen FM, Lenartic M, Jelencic V, Lemmermann NA, ten Brinke A, Jonjic S, Polic B. NKG2D induces Mcl-1 expression and mediates survival of CD8 memory T cell precursors via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. 2013; 191(3):1307-15.

8. ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Јелена З. Миловановић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Миодраг Л. Лукић

Наслов рада:

НР

Инфекција *Cytomegalovirus*-ом и патогенеза експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:

ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2017.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Физичи опис рада: ФО	Дисертација има 147 страна, садржи 7 поглавља, 9 слика, 28 графикана, 4 схеме, 1 табелу, 400 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Имунологија
Предметна одредница/ кључне речи ПО	ЕАЕ, МСМV, ВАLВ/с мишеви, CD8 Т лимфоцити, посматрачка активација
УДК Чува се: ЧУ	У Библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац
Важна напомена: МН	
Извод:	

ИД

BALB/c мишеви су, за разлику од C57BL/6 мишева, релативно резистентни на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅. У овој студији је по први пут показано да и неонатална инфекција мишјим *Cytomegalovirus*-ом (MCMV) и инфекција у адултном добу прекида ову резистенцију. Инфицирани BALB/c мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ су развили клиничке и хистолошке карактеристике ЕАЕ сличне оним који се развијају у осетљивом соју мишева, C57BL/6. У инфилтратима ЦНС-а BALB/c мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ су поред CD4⁺ лимфоцита у значајном проценту нађени и CD8⁺ лимфоцити, слично налазима код оболелих од мултипле склерозе (МС). CD8⁺ лимфоцити изоловани из инфилтрата ЦНС-а оболелих мишева који су у одговору на *ex vivo* рестимулацију MOG₃₅₋₅₅ пептидом одговорили продукцијом цитокина нису специфични за вирусне епитопе pp89 и m164. MCMV инфекција BALB/c мишева стимулише развој проинфламацијског фенотипа дендритских ћелија (CD86⁺CD40⁺CD11c⁺) у периферним лимфним органима, М1 типа микроглије у ЦНС-у, и енцефалитогених Th1/Th17 ћелија. Ова студија указује да *Cytomegalovirus*, стимулацијом развоја проинфламацијског фенотипа ћелија које приказују антигене и Th1/Th17 и CD8 одговора на MOG₃₅₋₅₅ пептид, појачава аутоимунске процесе у ЦНС-у и укида резистенцију на развој ЕАЕ.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 05.04.2017.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:
КО

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;

2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;

3. **Проф. др Ирена Танасковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Jelena Z. Milovanović

Menthor/co-mentor

MN

Prof. dr Miodrag L. Lukić

Title:

TI

Cytomegalovirus infection and pathogenesis
of experimental autoimmune encephalomyelitis

Language of text:

LT

Serbian (Cyrilic)

Language of abstract:

Country of publication:

CP

Serbian/English

Serbia

Locality of publication:

LP

Serbia

Publication year: 2017.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia
PP Svetozara Markovića 69

Physical description
PD

Medicine

Scientific field:

Immunology

SF

Scientific discipline:

SD

Subject/key words:

EAE, MCMV, BALB/c mice, CD8 T cells,
bystander activation

SKW

UDC

Holding data:

Library of Faculty of Medical Sciences
34000 Kragujevac

Note:

N

Abstract:

AB

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

- 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević**, Full Professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president;
- 2. Prof. dr Danilo Vojvodić**, Full Professor of Immunology, Medical Faculty, University of Military Academy Belgrade, member;
- 3. Prof. dr Irena Tanasković**, Full Professor of Histology and Embriology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member.

8.3. Биографски подаци кандидата

Јелена Миловановић рођена је 20. 05. 1981. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. Медицински факултет у Крагујевцу, уписала је школске 2000/01. године, а након дипломирања обавила је приправнички лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине. Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација уписала је школске 2012/2013. године на Медицинском факултету у Крагујевцу. Положила је усмени докторски испит са оценом 10 (десет) 16.03.2015. Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија у оквиру макро и јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу: Две године је обављала посао сарадника у настави на предмету Хистологија и ембриологија. У јануару 2015. године изабрана је у звање асистента на предмету Хистологија и ембриологија.

8.4. Списак објављених радова

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017 Feb 27;8:192.
2. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep.* 2016;6:23348. doi: 10.1038/srep23348.
3. Milos V. Nikolic, Marina Z. Mijajlovic, Verica V. Jevtic, Zoran R. Ratkovic, Slađana B. Novakovic, Goran A. Bogdanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Srecko R. Trifunovic, Gordana P. Radic. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure.* 2016;1116:264-271.
4. Marina Ž. Mijajlović, Miloš V. Nikolić, Verica V. Jevtić, Zoran R. Ratković, Jelena Milovanović, Aleksandar Arsenijević, Bojana Stojanović, Slađana B. Novaković, Goran A. Bogdanović, Srećko R. Trifunović, Gordana P. Radić. Cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd(1,2-dpheddp)] complex. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 2016; 35(1):79 – 86.

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:

1. Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (4): 183-190 (M52 = 1,5 бодова)
2. Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (3): 145-150 (M52 = 1,5 бодова)
3. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. *Ser J Exp Clin Res.*

Прихваћен за штампу и биће штампан у једном од наредних бројева часописа. DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048, прилог одобрење. (M52 = 1,5 бодова)

4. Žana Besser Silconi, Sasa Benazic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16 (3): 181-186 (M52 = 1,5 бодова)
5. Sasa Benazic, Zana Besser Silconi, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16 (4): 10-10. (M52 = 1,5 бодова)
6. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Ser J Exp Clin Res*. DOI:10.1515/SJECR-2016-0042 (M52 = 1,5 бодова)

Зборници међународних научних скупова

1. Marija Z. Milovanovic, A.N. Arsenijevic, J.Z. Milovanovic, B. Stojanovic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, pp 152. (M34 = 0,5 бода)
2. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection facilitates EAE development in resistant BALB/c mice. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p79–80. 2014. (M34 = 0,5 бода)
3. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p11–12. 2014. (M34 = 0,5 бода)
4. Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 75. M34=0,5 бода
5. Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Natasa Zdravkovic, Patrick Leung, Fu-Tong Liu, Erick Gershwin, Miodrag L. Lukic. Deletion of

Galectin 3 Enhances Primary Biliary Cirrhosis in Mice by Enhanced Apoptosis of Biliary Epithelial Cells and Release of Autoantigens. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 43. M34=0,5 бодова

6. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May, 2015. Abstract book p69. M34=0,5 бодова
7. J. Milovanovic, M. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, B. Popovic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M. L. Lukic. MCMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015. Abstract book, pp 105. (M34 = 0,5 бодова)

8.5. The list of published papers

The published papers in extenso in international journals

1. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017 Feb 27;8:192.
2. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep.* 2016;6:23348. doi: 10.1038/srep23348.
3. Milos V. Nikolic, Marina Z. Mijajlovic, Verica V. Jevtic, Zoran R. Ratkovic, Slađana B. Novakovic, Goran A. Bogdanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Srećko R. Trifunovic, Gordana P. Radić. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure.* 2016;1116:264-271.
4. Marina Ž. Mijajlović, Miloš V. Nikolić, Verica V. Jevtić, Zoran R. Ratković, Jelena Milovanović, Aleksandar Arsenijević, Bojana Stojanović, Slađana B. Novaković, Goran A. Bogdanović, Srećko R. Trifunović, Gordana P. Radić. Cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd(1,2-dpheddp)] complex. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 2016; 35(1):79 – 86.

The published papers in extenso national journals

1. Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (4): 183-190 (M52 = 1,5 бодова)
2. Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (3): 145-150 (M52 = 1,5 бодова)

3. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res. Прихваћен за штампу и биће штампан у једном од наредних бројева часописа. DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048, прилог одобрење. (M52 = 1,5 бодова)
4. Žana Besser Silconi, Sasa Benazic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186 (M52 = 1,5 бодова)
5. Sasa Benazic, Zana Besser Silconi, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (4): 10-10. (M52 = 1,5 бодова)
6. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. Ser J Exp Clin Res. DOI:10.1515/SJECR-2016-0042 (M52 = 1,5 бодова)

The international congress presentations published as abstracts

1. Marija Z. Milovanovic, A.N. Arsenijevic, J.Z. Milovanovic, B. Stojanovic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, pp 152. (M34 = 0,5 бода)
2. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection facilitates EAE development in resistant BALB/c mice. Journal of Neuroimmunology, Vol. 275, Issues 1-2, p79–80. 2014. (M34 = 0,5 бода)
3. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. Journal of Neuroimmunology, Vol. 275, Issues 1-2, p11–12. 2014. (M34 = 0,5 бода)
4. Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 75. M34=0,5 бода

5. Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Natasa Zdravkovic, Patrick Leung, Fu-Tong Liu, Erick Gershwin, Miodrag L. Lukic. Deletion of Galectin 3 Enhances Primary Biliary Cirrhosis in Mice by Enhanced Apoptosis of Biliary Epithelial Cells and Release of Autoantigens. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 43. M34=0,5 бодова
6. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May, 2015. Abstract book p69. M34=0,5 бодова
7. J. Milovanovic, M. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, B. Popovic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M. L. Lukic. MCMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015. Abstract book, pp 105. (M34 = 0,5 бодова)

8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Јелена З. Миловановић
Датум и место рођења: 20.05.1981.
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Хистологија и ембриологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Инфекција <i>Cytomegalovirus</i> -ом и патогенеза експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса
Број страница: 147
Број слика: 9 слика, 28 графикана, 4 схеме
Број библиографских података: 400
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 24.02.2016.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03- 374/23 од 05.04.2017.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник2. Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан3. Доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан4. Проф. др Олгица Гајовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан5. Проф. др Светлана Милетић Дракулић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неурологија, члан
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;3. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.
Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;
3. Проф. др Ирина Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

Датум одбране дисертације:

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миловановић Јелена, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Инфекција *Cytomegalovirus*-ом и патогенеза експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2017 године,

Миловановић Јелена
потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миловановић Јелена,

ДОЗВОЉАВАМ

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Инфекција *Cytomegalovirus*-ом и патогенеза експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

ДОЗВОЉАВАМ

1 Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) **Ауторство - некомерцијално - без прерада²**

У Крагујевцу, 2017 године,

потпис аутора

2 Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>