

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ирина С. Масловарић

**Улога инактивисане вакцине против
грипа у регулацији аутоимунских
процеса у експерименталном
аутоимунском енцефаломијелитису**

докторска дисертација

Београд, 2016. године

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Irina S. Maslovarić

**Role of inactivated influenza vaccine in
regulation of autoimmune processes in
experimental autoimmune
encephalomyelitis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Ментори:

Др Драгана Марковић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

Др Предраг Вујовић, доцент,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Чланови комисије:

Др Драгана Марковић, научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

Др Предраг Вујовић, доцент,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Др Весна Илић, научни саветник,
Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања

Датум одбране:

Вољеном оцу
др Славку Масловарићу

Експериментални део рада на овој докторској дисертацији је изведен у Биомедицинском центру Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“ у Београду, под непосредним руководством др Катице Јованове-Нешић, научног саветника у пензији. Рад је написан у Групи за имунологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

Поводом завршетка ове докторске дисертације желим да се посебно захвалим руководиоцу и сарадницима Биомедицинског центра Института Торлак где је урађен експериментални део и из кога је до сада публиковано 5 радова, др Катици Јовановој-Нешић, научном саветнику и руководиоцу, и колегицама др Александри Стојковић, др Дејани Косановић и др Наташи Вуков.

Због специфичности ситуације, менторство су преузеле моје дугогодишње колегице др Драгана Марковић и др Весна Илић са Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду и захваљујући њима, које су са мном прошле све очекиване и неочекиване кризе, успешно је завршена ова епопеја писања и финализовања докторске дисертације.

Посебно ми је драго што сам током докторских студија имала прилику да упознам и остварим квалитетан контакт и реципрочну сарадњу са својим ментором са Биолошког факултета, доц. др Предрагом Вујовићем.

Неизмерну захвалност, стрпљење, разумевање и још много тога дугујем мојима најближима, мајци Мирјани, сестри Александри и зету Johnathan Shephard-у.

Аутор

Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису

РЕЗИМЕ

Инфлуенца је инфективна респираторна болест узрокована вирусима инфлуенце. Иако је сама инфекција вирусом инфлуенце ретко била повезивана са различитим орган-специфичним и системским аутоимунским болестима, неуролошке аутоимунске манифестације после примене инфлуенца вакцине су биле документоване током времена. Мултипла склероза (МС) је хронична, у основи аутоимунска неуролошка болест која се најчешће доводи у везу са вакцинацијом. Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ) је најинтензивније изучаван мишији модел МС, а мијелин олигодендроцитним гликопротеином (МОГ) индукован ЕАЕ је много сличнији МС код људи него друге варијанте ЕАЕ. С обзиром да је расправа о добробити вакцинације болесника са МС још увек отворена циљ наше студије је био давање доприноса у расветљавању улоге вакцине против грипа и њеног ефекта на регулацију ЕАЕ кроз праћење клиничких знакова, титра серумских антитела ELISA тестом, експресије молекула главног хистокомпатибилног комплекса (МНС) I и II класе на пресецима мозганог ткива имунохистохемијским методама и ефекат на когнитивне функције (просторно учење и памћење одређивано Морисовим тестом воденог лавиринта; MWM). C57BL/6 мишеви су прво вакцинисани split virion инактивисаном инфлуенца вакцином и три дана касније је индукован ЕАЕ са MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Укупно добијени резултати представљени у овој дисертацији указују да инфлуенца вакцина није утицала на продукцију анти-MOG антитела и на развој клиничких знакова ЕАЕ. И поред тога што је поремећај на нивоу (ауто)имунског одговора код МС болесника евидентан, имунски одговор на већину уобичајених вирусних и бактеријских инфекција изгледа да је очуван. Резултати ове студије су показали да је титар анти-инфлуенца антитела код здравих вакцинисаних мишева и код оних код којих је након вакцинације индукован ЕАЕ, четири недеље након вакцинације, био идентичан, што указује на очуваност хуморалног имунског одговора и код мишева код којих је индукован ЕАЕ. Висока експресија МНС молекула II класе

и слаба експресија МНС молекула I класе у хороидном плексусу је била карактеристика мишева са ЕАЕ. Поред овога, наши налази су показали да не постоји позитивна корелација између вакцинације против грипа и оштећења меморије код мишева код којих је индукован ЕАЕ, а самим тим ни значајног утицаја на хипокампус-зависно просторно учење.

У овој студији *Bordetella pertussis* вакцина (PV) са 10^9 микроорганизама је коришћена као адјуванс за индукцију сензитизације на колокализоване неуронске антигене у ЕАЕ. Друга група експеримената је урађена са циљем да се процени утицај PV као адјуванса на развој ЕАЕ. C57BL/6 мишеви су у ту сврху имунизовани мишјим хомогенатом кичмене мождине и PV са 10^{10} микроорганизама. И десет пута повећана концентрација PV није утицала на тежину клиничке слике, титар анти-МОГ антитела и експресију CD4 и МНС молекула I и II класе у ткиву мозга што би значило да PV, коришћена у првој групи експеримената, није имала додатни утицај на развој ЕАЕ и самим тим није утицала на добијене резултате.

Резултати добијени у овој докторској дисертацији дају за право оној струји истраживача и медицинских стручњака која се бори да докаже добробити вакцинације. Промене уочене кроз праћење анализираних параметара код мишева са индукованим ЕАЕ и код мишева код којих је ЕАЕ индукован након вакцинације против грипа не показују да је примена вакцине била покретач или значајније утицала на развој ЕАЕ, а појединачно уочене разлике односиле би се на интраиндивидуалне разлике мишева унутар испитиваних група.

Кључне речи: Вакцина против грипа; Pertussis вакцина; Мијелин олигодендроцитни гликопротеин; Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис; Хороидни плексус; Хипокампус; МНС молекули I и II класе; CD4 молекул; Просторно учење – Морисов тест воденог лавиринта.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Физиологија

УДК број: 615.371::[616.831-002+616.832] (043.3)

Role of inactivated influenza vaccine in regulation of autoimmune processes in experimental autoimmune encephalomyelitis

SUMMARY

Influenza is a contagious respiratory illness caused by influenza viruses. Influenza infection per se has seldom been associated with various organ-specific and systemic autoimmune diseases but neurological autoimmune phenomena have been reported following influenza vaccine. Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic neurological disease of an autoimmune nature that has been viewed in conjunction with vaccination. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most extensively studied mouse model of MS and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induced EAE more closely resembles MS than other EAE variants. Since the debate about vaccine safety in patients with MS is still wide open, the objective of our study was to shed more light on and supply additional information about the influenza vaccination effects on regulation of EAE through monitoring of clinical signs, serum antibody titers by using ELISA, expression of MHC (Major Histocompatibility Complex) class I and II molecules in brain tissue by immunohistochemical detection, and its effect on cognitive functions (spatial learning and memory measured by Morris Water Maze test). C57BL/6 mice were first vaccinated with influenza split virion inactivated vaccine and three days later EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ peptide. The overall data presented in this study indicate that influenza vaccine had no effect on the production of anti-MOG autoantibodies and the development of clinical signs. Although the unbalanced immune system is evident in patients with MS, immune defense against common viral and bacterial infections appears to be preserved. In this study anti-influenza antibody titers in healthy vaccinated mice and in MOG induced EAE-vaccinated mice, four weeks after vaccination with influenza vaccine have indicated preserved long-lasting antibody response in MOG induced EAE mice. High expression of MHC II and mild-to-low expression of MHC I was detected in mice with EAE. Besides, our finding mainly confirmed lack of positive correlation between influenza

vaccination and memory trajno impairment in MOG induced EAE mice and no significant influence on hippocampal-dependent spatial learning.

In this study *Bordetella pertussis* vaccine (PV) containing 10^9 organisms has been used as an adjuvant to induce sensitization to co-localized neural antigens in EAE. The second set of experiments was designed to assess the impact of PV as an adjuvant on the development of EAE. C57BL/6 mice were therefore immunized with mice spinal cord and PV containing 10^{10} organisms. The examined effects of higher concentration of PV on clinical signs, anti-MOG antibody titer and expression of CD4, MHC I and II molecules in brain tissue revealed no additional activity on EAE development, meaning that PV (10^9) that was used in the first set of experiments had no impact on the results obtained.

The results acquired in this doctoral dissertation are in support of medical community who finds equally valuable to make an overall risk-benefit assessment by opposing risks of influenza infection to the degree of vaccine protection. The overall data analysis of EAE and EAE-vaccinated mice indicates that there is no definite increase of either occurrence or development of EAE following the influenza vaccination, also the observed differences are found to be in relation with intraindividual susceptibility to EAE induction.

Keywords: Influenza vaccine; Pertussis vaccine; Myelin oligodendrocyte glycoprotein; Experimental autoimmune encephalomyelitis, Choroid plexus; Hyppocampus; MHC molecules class I and II, CD4 molecules; Spatial learning – Morris water maze test.

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Physiology

UDC number: 615.371::[616.831-002+616.832] (043.3)

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

<i>HA</i>	хемаглутинин (енглески: <i>hemagglutinin</i>)
<i>NA</i>	неураминидаза или сијалидаза (енглески: <i>neuraminidase</i>).
ЦНС	централни нервни систем
ЕАЕ	експериментални аутоимунски енцефаломијелитис
МС	мултипла склероза
<i>GBS</i>	<i>Guillain-Barré</i> синдром
<i>WHO</i>	Светска здравствена организација (енглески: <i>World Health Organization</i>)
<i>MHC</i>	главни хистокompatибилни комплекси (енглески: <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
<i>MOG</i>	мијелин олигодендроцитни гликопротеин (енглески: <i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>)
<i>CFA</i>	комплетан Фројндов адјуванс (енглески: <i>Complete Freund's adjuvant</i>)
<i>MWM</i>	Морисов тест воденог лавиринта (енглески: <i>Morris water maze test</i>)
Експерименталне групе:	
IC	интактна контрола, нетретиране животиње
VCC	мишеви вакцинисани против грипа
EAE	мишеви код којих је индукован ЕАЕ
EAEVCC	мишеви вакцинисани против грипа код којих је индукован ЕАЕ
<i>Pw</i>	ћелијска <i>pertussis</i> вакцина
<i>Pa</i>	ацелуларна <i>pertussis</i> вакцина
МВР	мијелобазни преотеин

Садржај

1.УВОД	1
1.1. Састав вакцине против грипа	1
1.2. Вакцина против грипа: за и против	5
1.3. Патофизиолошка основа мултипле склерозе са освртом на функцију антиген презентујућих ћелија	8
1.4. Инфекција вирусом грипа или вакцинација против грипа као могући окидачи МС	12
1.5. Утицај вакцине против грипа на учење и памћење код оболелих од мултипле склерозе	18
1.6. Pertussis вакцина као адјуванс у индуковању ЕАЕ	20
2. ЦИЉЕВИ РАДА	24
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	25
3.1. Материјал	25
3.2. Експерименталне животиње	25
3.3. Праћење ефекта примене вакцине против грипа на развој клиничких знакова ЕАЕ и на когнитивне функције мишева	26
3.3.1. Експериментални дизајн	26
3.3.2. Праћење ефекта примене вакцине против грипа на развој клиничких знакова ЕАЕ	28
3.3.3. Праћење ефекта примене вакцине против грипа и индукције ЕАЕ на когнитивне функције	28
3.4. Праћење ефекта имунизације инактивисаним <i>Bordetella pertussis</i> бацилима на развој клиничких знакова ЕАЕ	29
3.4.1. Експериментални дизајн	29
3.5. Методе	30
3.5.1. Имуноензимски тестови (<i>ELISA</i>)	30
3.5.1.1. Детекција присуства IgG антитела на вирус инфлуенце у серумима мишева	30
3.5.1.2. Детекција присуства анти MOG IgG антитела у серумима мишева	31
3.5.2. Имунохистохемијске анализе	32
3.5.2.1. Имунопероксидазна детекција МНС молекула II класе у слезини и лимфним чворовима	32
3.5.2.2. Имунопероксидазна детекција MOG и МНС молекула I и II класе	

у ткиву мозга	33
3.5.2.3. Имунофлуоресцентна детекција CD4 и МНС молекула II класе у ткиву мозга	34
3.6. Статистичка анализа	35
4. РЕЗУЛТАТИ	36
4.1. Ефекат инактивисане вакцине против грипа на C57BL/6 мишеве са ЕАЕ индукованим MOG ₃₅₋₅₅ пептидом	36
4.1.1. Клинички скор – моторна функција	36
4.1.2. Клинички параметар – тежина мишева	37
4.1.3. Титар серумских анти-инфлуенца антитела	38
4.1.4. Титар серумских анти-MOG антитела	38
4.1.5. Хистолошка анализа хипокампадне регије	40
4.1.5.1. Хистолошка анализа: Експресија МНС I и МНС II молекула у хороидном плексусу	40
4.1.6. Хистолошка анализа лимфних чворова и слезине	42
4.1.6.1. Хематоксилин – еозин бојење	43
4.1.6.2. Експресија МНС II молекула	44
4.1.7. Утицај вакцине против грипа на просторно учење и памћење - <i>MWM</i> тест	44
4.1.7.1. Способност учења мишева у прва 3 дана експеримента, пре вакцинације	45
4.1.7.2. Праћење времена потребног за извршење задатка у <i>MWM</i> тесту са појавом клиничких знакова ЕАЕ	45
4.1.7.3. Резултати ретроградне анализе за прва три дана експеримента за мишеве са индукованим ЕАЕ	51
4.2. Pertussis вакцина и индукција ЕАЕ код C57BL/6 мишева	53
4.2.1. Клинички скор – моторна функција	53
4.2.2. Титар серумских анти – MOG антитела	53
4.2.3. Хистолошка анализа хипокампадне регије	54
4.2.3.1. Детекција MOG антигена	54
4.2.3.2. Експресија МНС молекула I и II класе	55
4.2.3.3. Експресија CD4 молекула	56
5. ДИСКУСИЈА	57
5.1. Ефекат инактивисане вакцине против грипа на C57BL/6 мишеве са ЕАЕ индукованим MOG ₃₅₋₅₅ пептидом	57

5.2. Pertussis вакцина и индукција ЕАЕ код C57BL/6 мишева	67
6. ЗАКЉУЧЦИ	74
7. ЛИТЕРАТУРА	77
8. ПРИЛОЗИ	94

1. УВОД

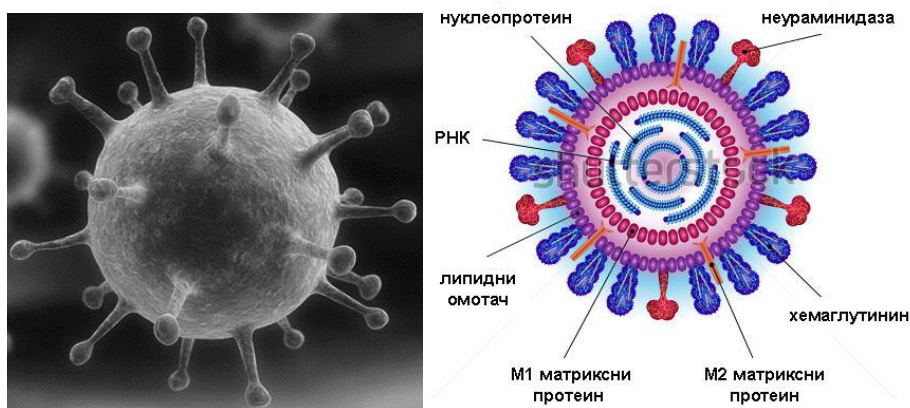
Инфлуенца или грип је инфективна болест узрокована РНК вирусима који припадају фамилији *Orthomyxoviridae*. Он је и једна од најчешћих вирусних респираторних инфекција, може да се шири великом брзином и доводи до појаве сезонских епидемија које свој максимум достижу у зимском периоду. Први писани документи о пандемији грипа датирају из 1580. године, и од тада па све до данас грип је остао инфективна болест глобалног значаја (Hilleman, 2002). Анализом података из медицинске литературе публиковане током пандемије грипа познате као Шпанска грозница, и која је трајала од 1918 до 1920., показано је да лечење новооболелих особа дозама целе крви, плазмом или серумом болесника који су прележали ову форму грипа смањило стопу смртности тешко оболелих пацијената у 1918. години за 50% (Luke и сар., 2006). Goodpasture је 1931. први открио да вируси могу да се узгајају на оплођеним кокошијим јајима, а четрдесетих година XX века војска САД је развила прву одобрену инактивисану вакцину против грипа која се користила за време II светског рата (Hilleman, 2002). За разлику од вакцина против других вирусних болести, препоручено је да се због брзе еволуције овог вируса и појава нових антигенских варијанти вируса вакцинација против грипа спроводи на годишњем нивоу (Grohskopf и сар., 2015; Chen и Deng, 2009; DeDiego и сар., 2016).

1.1. Састав вакцине против грипа

Познато је да постоје три различита типа вируса инфлуенце: *A*, *B* и *C*. Вируси инфлуенце *A* и *B* су узрочници епидемија грипа код људи. Осим људи, вирус инфлуенце *A* може да инфицира птице, свиње, али и друге врсте животиња (Lamb и Krug, 2001) и код људи он је главни узрочник пандемија грипа. Вируси инфлуенце тип *B* и *C*, су примарно хумани патогени. За разлику од вируса инфлуенце тип *A* и *B*, вирус типа *C* има мали клинички значај (Yoon и сар., 2014).

Структура вируса инфлуенце је приказана на слици 1.1. Вирусне честице су по правилу сферне или овалне са пречником од 80 до 120 nm. Језгро вируса је окружено липидима који потичу из липидне мембране ћелија домаћина. Из

липидне мембране се пружају површински гликопротеини, тримерни хемаглутинин (енглески: *hemagglutinin*; *HA*) и тетрамерна неураминидаза или сијалидаза (енглески: *neuraminidase*; *NA*). *HA* чини око 80% површинских гликопротеина преко којих се вирус везује за ћелију домаћина, тако што се везује за рецепторе који садрже сијалинску киселину. Након везивања за ове рецепторе вирусна честица се, захваљујући свом липидном омотачу, фузионише са ћелијском мембраном и улази у ћелију домаћина. *NA* гликопротеин је ензим који разара рецепторе на ћелији домаћина и одговоран је за ослобађање вируса и ширење вируса са ћелије на ћелију. На унутрашњој страни омотача вируса је слој протеина матрикса. Унутар омотача је вирусни геном који је код вируса инфлуенце тип *A* и *B* организован у облику 8, а код вируса инфлуенце тип *C* у облику 7 једноланчаних молекула (сегмената) РНК. Ова РНК са нуклеопротеинима формира нуклеопротеин хеличне структуре са три пептида нуклеополимеразе у сваком сегменту РНК. (Lamb и Krug, 2001; Yoon и сар., 2014; Murphy и Webster, 1990; Gelderblom, 1996; Palese и Compans, 1976; Matrosovich и сар., 2004; Pica и Palese, 2013; <https://micro.magnet.fsu.edu/...>).



Слика 1.1. Структура вируса инфлуенце

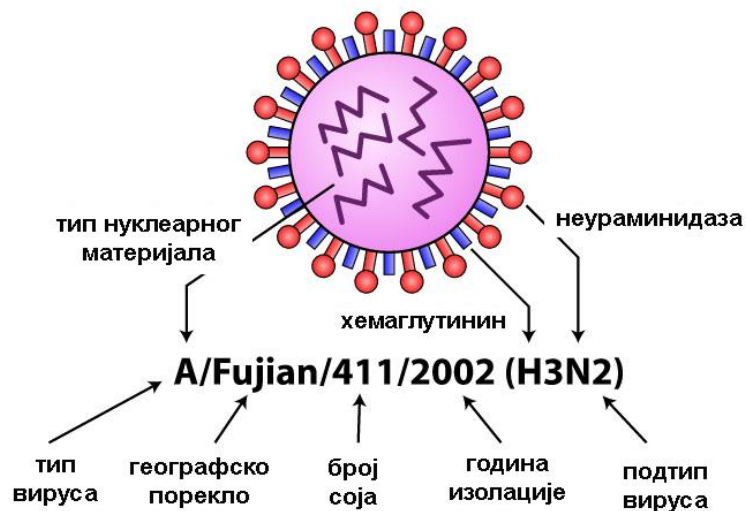
(<https://www.pinterest.com/pin/271412315015558171/>;
https://www.123rf.com/photo_25154199_diagram-of-influenza-virus-particle-structure.html)

Мутације у антигенској структури вируса инфлуенце су разлог постојања бројних субтипова и сојева овог вируса. Специфичне варијанте, подтипови,

вируса *A* добијају име по одређеном антигенском типу *HA* и *NA*. До данас је описано 18 различитих типова *HA* и 11 различитих типова *NA*. Структурна хетерогеност *HA* и *NA* резултира у њиховој антигенској хетерогености а серотипови вируса се дефинишу на основу способности антитела да реагују са вирусом. Тренутно међу људима доминантно циркулишу два подтипа (серотипа) вируса грипа *A*: *H1N1* и *H3N2*. Подтипови (серотипови) вируса инфлуенце *A* се даље, на основу још финијих структурних разлика у површинским гликопротеинима, деле на сојеве. Антигенска хетерогеност вируса инфлуенце *B* је мања и не постоје његови подтипови, али постоје његове линије и сојеви. Међу људима данас циркулишу две линије инфлуенца вируса *B*: *B/Yamagata* и *B/Victoria*. Начин савремене номенклатуре вируса грипа приказана је на слици 1.2. По овој номенклатури назив вируса почиње антигенским типом (*A*, *B* или *C*) иза које стоји врста домаћина, ако је домаћин животиња. Ако је домаћин човек, име врсте домаћина се изоставља из назива вируса. Иза врсте домаћина налази се географско порекло, број соја, година изолације, и ако је вирус тип *A* у загради се наводе тип *HA* и *NA* (<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>).

У већини земаља се за превенцију инфекције и превенцију компликација насталих као резултат инфекције вирусом грипа користе тзв. „тривалентне вакцине“ које се састоје од три типа инактивисаних вирусних честица: 1) вирус инфлуенце *A*, подтип *H1N1*; 2) вирус инфлуенце *A*, подтип *H3N2* и 3) вирус инфлуенце *B* (Yoon и сар., 2014; <https://micro.magnet.fsu.edu/>; <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>).

Нови сојеви вируса инфлуенце *A* и *B* настају процесом који се назива антигенски дрифт. Током овог процеса постепено се акумулирају мутације унутар епитопа које препознају специфична антитела. Због антигенског дрифта нови сојеви вируса грипа не могу бити препознати антителима чију синтезу је индуковао други сој вируса, и на тај начин вирус грипа ефикасно избегава имунолошку одбрану домаћина. Антигенске карактеристике и типа *A* и типа *B* вируса инфлуенце стално се мењају процесом антигенског дрифта и због тога је сваке године неопходно да се уради реформулација вакцине (<https://micro.magnet.fsu.edu/...>).



Слика 1.2. Савремена номенклатура вируса инфлуенце
 (<http://www.healthguideinfo.com/infectious-disease/p34077/>)

Антигеност вируса инфлуенце тип *A* се мења још једним процесом под именом антигенски шифт и који резултује настанком новог субтипа (серотипа) вируса. Антигенски шифт представља наглу промену антигености која је узрокована рекомбинацијама унутар вирусног генома, а које се дешавају када су ћелије домаћина истовремено инфициране са два различита соја вируса. То што велики број врста могу бити домаћини овог вируса повећава вероватноћу настанка антигенског шифта. Сматра се да је за највећи број случајева антигенског шифта одговорно мешање сојева вируса који могу да инфицирају птице, свиње и људе. Проблем представља и то што се нови подтип вируса *A* јавља нагло и што његову појаву није могуће предвидети, па самим тим није могуће ни спремити ефикасну вакцину. Због тога су и нови подтипови вируса *A* у стању да проузрокују пандемије за релативно кратко време (<https://micro.magnet.fsu.edu/...>; <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>).

1.2. Вакцина против грипа: за и против

Савремене вакцине садрже или целе мртве или инактивисане микроорганизме (вирусе, бактерије, паразите) или су се праве од препарата добијених издвајањем и пречишћавањем специфичних протеина патогена који су у стању да покрену протективни имунски одговор на одређену инфективну болест (WIPO, 2012). Вакцине које се данас дају људима се сматрају једним од најбезбеднијих медицинских лекова и представљају ефикасан метод заштите од инфективних болести у општој популацији. Медицинска наука такође сматра да су садашње вакцине за хуману употребу безбедне и ефикасне и када су у питању пацијенти са аутоимунским обољењима (Holvast и сар., 2007; Conti и сар. 2008), што наравно са друге стране, као и код било ког другог медицинског производа, не искључује у потпуности постојање и ризика код њихове примене (WIPO, 2012). Расправа да ли је однос ризик/добробит код примене вирусне вакцине више на страни добробити него ризика код пацијената са аутоимунским болестима (нарочито оних са неуролошким манифестацијама) траје већ деценијама. Тако је још тридесетих година прошлог века примећено да се приликом вакцинације против вируса беснила који је био узгајан на кичменој мождини зечева јавила, али само код неких људи, инфалматорна демјелинизациона болест централног нервног система (ЦНС) (Sabin и Wright, 1934). Убрзо после тога установили су да разлог за енцефаломијелитис није био вирус беснила већ се десила сензибилизација нервним ткивом, тј. кичменом мождином која се као контаминант нашла у вакцини и која је била окидач за покретање аутоимунског одговора. Због овог феномена Constantinescu и сар. у свом прегледном чланку (2011) су подсетили да је Rivers још 1933. године развио модел експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) у покушају да се боље разуме патогенеза овог енцефаломијелитиса који се јавио после вакцинације.

Иако је сама инфекција вирусом инфлуенце ретко била повезивана са различитим орган-специфичним и системским аутоимунским болестима, системске и неуролошке аутоимунске манифестације после примене вакцине против грипа које су садржале само инактивисане пречишћене површинске

фрагменте вируса, без генетског материјала (Fiore и сар., 2008) су биле документоване током времена. Светска здравствена организација (енглески: *World Health Organization; WHO*) је јуна 2009. године прогласила пандемију грипа због појаве новог вируса инфлуенце *A (H1N1)*, свињског порекла који је откривен у Мексику 18. марта 2009. године (WHO, 2009). Вакцинација против овог вируса грипа је подстакла забринутост због могуће појаве неуроимунолошких нежељених ефеката, а што је укључивало и појаву *Guillain-Barré* синдрома (*GBS*). Узрочна веза између вакцине и ове аутоимунске неуролошке болести је сугерисана још 1957. године од стране Центара за контролу болести САД када се, као последица вакцинације против свињског грипа, повећала инциденца *GBS*-а (Safranek и сар., 1991). Наиме током 1976. године у САД примећен је седам пута повећан ризик од појаве *GBS*-а након апликације вакцине против грипа *A (H1N1)* подтипа *A/New Jersey/76 (A/NJ/76)* због чега је вакцинација те године нагло прекинута (Aron-Maor и Shoenfeld, 2004). За разлику од *A/NJ* вакцине 1976., 1978-1979. године је уведен нови *HA* тип вакцине против грипа чија примена није довела до статистички значајног пораста ризика од појаве *GBS*-а (Hurwitz и сар., 1981). Ретроспективна епидемиолошка студија коју је урадио Lasky, а која се односила на сезонске вакцине против грипа током 1992-1993. и 1993-1994. године показала је умерен пораст ризика од појаве *GBS*-а. Приказан интервал (1,0; 2,8) ризика за појаву *GBS*-а за обе ове сезоне заједно је потврђен са интервалом поверења од 95 процената. Релативни ризик за појаву *GBS*-а (коригован за старост, пол и сезону вакцинације) од 1,7 ($P=0,04$) указује на више од једног новог случаја *GBS* на милион људи у периоду до шест недеља након вакцинације (Lasky и сар., 1998).

Популациона кохортна студија урађена у Стокхолму, у Шведској, испитала је у периоду од осам до десет месеци степен ризика за развој неуролошких и аутоимунских поремећаја од посебног интереса код људи који су били вакцинисани против пандемијског *A (H1N1)* вируса са моновалентном *Pandemrix* вакцином (*GlaxoSmithKline, Middlesex, UK*) из 2009. године у поређењу са невакцинисаним делом популације. Анализирана је популација од 1.98 милиона људи, од којих је више од једног милиона људи било

вакцинисано, а 900 000 невакцинисано. Ова студија је показала да свеобухватни релативни ризик за појаву *GBS*-а, мултипле склерозе (МС), дијабетеса типа 1 или реуматоидног артритиса када се пореде вакцинисани и невакцинисани део популације остаје непромењен. (Bardage и сар., 2011).

Три главне неуролошке манифестације аутоимунске природе се доводе у везу са вакцинацијом: *GBS*, МС и аутизам (Molina и Shoenfeld, 2005). Након вакцинације против грипа најчесталија међу аутоимунским неуролошким нежељеним ефектима остаје појава *GBS*-а и због тога, као и догађаја из 1976. године, је са циљем да се поново процени веза између *GBS*-а и адјувантне вакцине против пандемијског вируса инфлуенце типа А (*H1N1*) из 2009. године урађена друга мултинационална проспективна студија у Европи (Dieleman и сар., 2011). Главни резултат ове студије је била реална процена релативног ризика појаве *GBS* након вакцинације против грипа. У овој студије је одређен горњи ниво ризика од 2,7, што указује на потенцијално повећање ризика од 2,7-пута или потенцијалну појаву од само три случаја на милион вакцинисаних људи.

GBS је транзиторна акутна полинеуропатија, којој обично претходи респираторна или гастроинтестинална болест. У Европи *GBS* се најчешће јавља у форми акутне инфламаторне демиелинизирајуће полирадикулонеуропатије, коју карактерише арефлексна симетрична моторна пареза са благим сензорним поремећајима (Vucic и сар., 2009; Sejvar и сар., 2010). Инфекције саме по себи обично нису довољне за покретање аутоимунских болести, већ је јасно да постоји и учешће других фактора као што су: генски, имунолошки и хормонски фактори (Toplak и Avcin, 2009). Вероватно да је овај комплексан механизам који учествује у настанку *GBS*-а и главни разлог постојања контроверзи о улози вакцинације против грипа као окидачу (Dieleman и сар., 2011). Постојање неусаглашених ставова о вези између *GBS*-а и вакцине покушавају да разреше и друге студије. Тако су у две студије недавно урађене у Великој Британији инфекције горњег респираторног тракта тј. болести сличне инфлуенци идентификоване као снажан фактор ризика за развој *GBS*-а. Повећан ризик од појаве *GBS*-а је примећен убрзо након ових инфекција што је у складу са запажањима да болест респираторног система често претходи појави *GBS*-а.

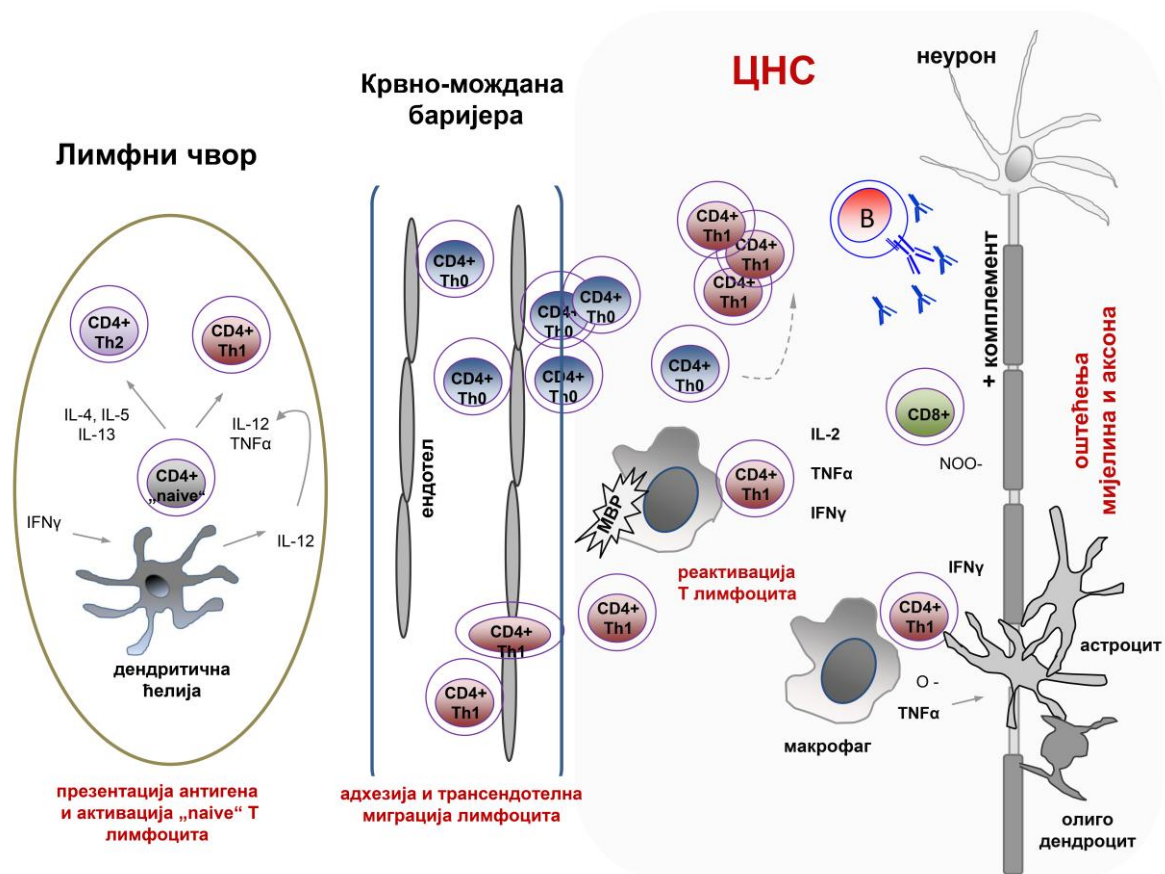
Због овога је тешко повезати *GBS* искључиво са gripом јер су и други респираторни патогени који изазивају болести сличне инфлуенци високо заступљени у зимском периоду. У овим студијама узрочно-последична веза између *GBS*-а и вакцине против грипа није пронађена. Уместо тога, резултати истичу да постоји повећан ризик за развој *GBS*-а као последица других вирусних обољења која су слична инфлуенци. У наставку, у поменутим студијама се сугерише да вакцинација против грипа штити од настанка *GBS*-а и такође наводи да је подједнако значајно да се направи свеобухватна процена ризика и добробити: ризик од пандемијске инфекције инфлуенцом насупрот степену заштите који се добија вакцинацијом (Там и сар., 2007; Stowe и сар., 2009).

Иако епидемиолошки докази добијени на основу тридесет година дуге евалуације не указују на повезаност вакцинације против грипа и *GBS*-а, Комитет Института за медицину *WHO* је 2011. године ипак закључио да се ова повезаност са сигурношћу не може ни одбацити, посебно зато што се на годишњем нивоу врши антигенска реформулација вакцина против грипа и да због ових варијација из године у годину и процена потенцијалног ризика за развој *GBS* варира (*WHO*, 2012).

1.3. Патофизиолошка основа МС са освртом на функцију антиген презентујућих ћелија

Уопштено говорећи, МС се може дефинисати као хетерогени аутоимунски поремећај ЦНС-а. Према Међународном конзорцијуму за генетику мултипле склерозе, МС је хронично инфламаторно обољење ЦНСа које се карактерише бројним, изолованим подручјима у којима се испољавају запаљенске промене удружене са демјелинизацијом и глиозом (*International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*, 2007). Иако су фактори који доприносе хетерогености МС-а још увек до краја непознати у исто време постоји чврсто уверење да у основи болести леже комплексне генетски детерминисане карактеристике које су неизоставно под утицајем варијабли спољашње средине

као што су инфекције, климатске промене и сл. Данас више нема никакве сумње да су у патогенези демиелинизационих аутоимунских болести ЦНС-а људи (што је потврђено и на животињским моделима) укључене компоненте и ћелијског и хуморалног имунског одговора (Jovanova-Nesic и сар. 1993; Popović и сар. 1997) (слика 1.3). Патолошко-физиолошке студије показују да МС настаје као резултат имунолошке активности која је усмерена на деструкцију беле масе ЦНС-а а која се испољава као разградња мијелина на површини аксона и која такође може да доведе и до секундарног оштећења самих аксона. Плакови, патолошко обележје МС-а, су заправо мале овалне зоне демиелинизације које се могу јавити било где у белој маси. Зависно од развојног стадијума болести заступљеност имунских ћелија и имунореактивних супстанци, које се налазе унутар зонских оштећења, показује међусобна варирања (Noseworthy 1999; Noseworthy и сар. 2000).



Слика 1.3. Имунопатогенетски механизми у МС

На мишјем моделу МС-а недвосмислено је показано да су антиген презентујуће ћелије неопходан учесник у патогенези МС (McMahon и сар., 2005; Greter и сар., 2005). С обзиром да су ове ћелије учесници у више нивоа који се јављају у патогенези МС-а у науци постоји велики интерес за њихово изучавање. На основу резултата многих научних студија МС се примарно описује као болест у којој се имунски одговор испољава кроз презентацију антигена у контексту молекула главног хистокомпатибилног комплекса (енглески: *Major Histocompatibility Complex*; *MHC*) II класе. Периваскуларни макрофаги су веома бројне ћелије у ЦНС-у. Њихова локација у ткиву им омогућава да долазе у контакт са патогенима и да помажу у контроли и урођеног и адаптивног имунског одговора у ЦНС-у. Ове ћелије су нарочито бројне у активним демиелинизационим лезијама и карактерише их, и код људи и код глодара, виши ниво експресије *MHC* молекула II класе и CD45 молекула у односу на микроглију (Fabrick и сар., 2005). Иако се сматра да микроглија учествује у настајању оштећења у мозгу, њен стварни допринос у настајању инфламаторне демиелинизације мозга остаје и даље непотпуно разјашњен (Jovanova-Nesic и Shoefeld, 2007). Код људи у МС лезијама су експримирани *MHC* молекули II класе (Zeinstra и сар., 2000). У *in vitro* експериментима је показано да астроцити експримирају *MHC* II молекуле у одговору на стимулацију IFN- γ (Zeinstra и сар., 2006). Иако је акумулација дендритичних ћелија у ЦНС-у доказана (Matyszak и Perry, 1997; Serafini и сар, 2000; Suter и сар, 2000; Bailey и сар., 2007) механизми њиховог уласка у ЦНС нису познати и зато настављају да буду предмет савремених истраживања. Инфилтрација дендритичних ћелија у ЦНС-у може да изгледа и непотребна или чак сувишна с обзиром да се у њему већ налазе резидентне антиген презентујуће ћелије (микроглија и астроцити).

Познато је да су дендритичне ћелије професионалне антиген презентујуће ћелије, хематопоетског порекла, које на месту инфламације у периферним ткивима, након што бивају активирани инфламаторним сигнаlima и антигенима, захватају антигене и одлазе до Т зависних зона секундарних лимфних органа где сазревају до ћелија које су једине у стању да прераде и презентују антигене (тј. антигене пептиде) у контексту *MHC* молекула и

активирају „naive“ *T* лимфоците, тј. *T* лимфоците који нису претходно били у контакту са својим специфичним антигеном. Постоје два главна подтипа дендритичних ћелија: конвенционалне и плазмоцитне (Wu и Liu, 2007; Merad и сар. 2013; Boltjes и van Wijk 2014; Ludewig и сар., 2016). Сматра се да су плазмоцитне дендритичне ћелије кључне за активацију *B* лимфоцита и њихово диферентовање до плазмочита у одговору на вирусне инфекције. У стању имунолошке равнотеже ове антиген презентујуће ћелије су толерогене а толерогеност остварују учествовањем у делецији CD8+, индукцији анергије CD4+ *T* лимфоцита и стимулацијом развоја регулаторних *T* лимфоцита. Међутим постоје подаци који показују да након одговарајуће стимулације и плазмоцитне дендритичне ћелије активирају „naive“ CD4+ *T* лимфоците и усмеравају их у правцу Th1 ћелија. Овакви резултати указују да је улога плазмоцитних дендритичних ћелија у настанку и развоју (неуро)аутоимунских феномена још увек недовољно разјашњена.

Активација *T* лимфоцита се дешава у секундарним лимфним ткивима (лимфни чворови) у које мигрирају дендритичне ћелије након захватања антигена у периферним ткивима (Abbas и сар., 2007). И на моделу ЕАЕ показано је да се „naive“ *T* лимфоцити са мијелинским антигенима по први пут срећу у секундарним лимфним ткивима (Tomprkins и сар., 2002). Irla и сарадници (2010) су претпоставили да експресија *MHC II* молекула на плазмоцитним дендритичним ћелијама заправо представља природну заштиту од настанка ЕАЕ јер стимулише селективну експанзију регулаторних *T* лимфоцита специфичних за антигене мијелина.

Прилично поједностављена али функционално избалансирана подела CD4+ *T* лимфоцита на Th1 и Th2 субпопулацију и даље остаје практичан модел за изучавање патогенезе МС (Abbas и сар., 2007). Међутим, докази да постоје одступања од модела по коме је МС искључиво Th1 зависна болест су бројни. Тако је клонска експанзија CD8+ *T* лимфоцита који препознају антигене у контексту *MHC I* молекула нарочито изражена у активним лезијама док CD4+ лимфоцити доминирају у периваскуларном простору (Vabbe и сар., 2000). Садашњи подаци указују на то да је МС зависан и од Th1 и Th17 субпопулација, мада се оне по механизму дејства разликују једна од друге

(Bailey и сар., 2007, Kang и сар., 2010).

Различити патолошки, експериментални, клинички и имунолошки налази указују сви заједно на постојећу патогену улогу антитела у МС-у. *In vitro* налаз да су серумска аутоантитела, која препознају екстраћелијски мијелин олигодендроцитни гликопротеин (енглески: *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, MOG) који се налази у спољашњем слоју мијелинског омотача и који је због тога лако доступан антителима из циркулације, лизирајућа подржава став да она имају патогени потенцијал у МС (Zhou и сар., 2006). ЕАЕ је најинтензивније изучаван мишији модел МС-а (Denic и сар., 2011), а *MOG*-ом индукован ЕАЕ је много сличнији МС код људи него друге варијанте ЕАЕ код којих инфламација преоблада у односу на демиелинизацију (Compston и Coles, 2008). Све ово указује да су потребна даља истраживања да би се у потпуности разумела патогенеза настанка демиелинизације у ЦНС-у која је проузрокована антителима реактивним са антигенима мијелинског омотача у ЕАЕ и да се утврди да ли су ти механизми од значаја за МС.

1.4. Инфекција вирусом грипа и вакцинација против грипа као могући окидачи МС

МС је хронична, у основи аутоимунска неуролошка болест која се најчешће јавља код млађих особа и сматра се да од ње оболи 2,5 милиона људи широм света (Wingerchuk и сар., 2001). Иако је етиологија највећег броја аутоимунских болести још увек нејасна, данас је опште прихваћено да генетски, имунолошки, хормонски и фактори спољашње средине, појединачно или заједно, чине да се реакција имунског одговора помера ка патолошкој аутореактивности (Chen и сар., 2001). Фактори спољашње средине, посебно инфекције, се сматрају као могући, мада не и довољан разлог да би се изазвале нежељене аутоимунске реакције или довеле до погоршања постојећих аутоимунских болести (Ebers, 2008; Toplak и Avcin, 2009). Недавне студије су показале да је периферни одговор *B* лимфоцита блиско повезан са имунопатологијом МС-а тако што чини део активационо/ефекторских

механизма, учествује у проинфламаторним механизмима било повећаном секрецијом ИЛ-6 која се приписује меморијским *B* лимфоцитима или тако што подржава проинфламаторни Th17 одговор и учествује у регулацији ових процеса (von Büdingen и сар., 2015). Претпоставља се да аберантан одговор проинфламаторних цитокина секретованих од стране повремено активисаних *B* лимфоцита болесника са МС посредује у активацији проинфламаторних *T* лимфоцита што доводи до реактивације болести (Bar-Or и сар., 2010). С обзиром да су поремећаји и у ћелијском и у хуморалном имунском одговору од значја за патогенезу МС-а, повећана осетљивост на инфекције код оболелих од МС-а би се могла очекивати. Међутим, и поред тога што је поремећај на нивоу (ауто)имунског одговора код ових болесника евидентан, њихова способност адекватног имунског одговора на већину уобичајених вирусних и бактеријских инфекција изгледа да је очувана и инциденца уобичајених инфективних болести није повећана (Sibley и Foley, 1965; Morris, 1985). Ипак резултати неких истраживања показују да вирусне инфекције могу да доведу до реактивације (релапса) болести која се може видети код *relapse-remitting (RR)* форме МС, коју карактеришу раздобља активације и ремисије болести (Andersen и сар., 1993; Panitch и сар., 1994). Могуће објашњење за погоршање болести након инфекције вирусом грипа би могло да буде и губитак претходно описане протективне улоге дендритичних ћелија и следственог пораста броја активираних ћелија (Marks и сар., 2006). Због тога се сматра да је имунизација/вакцинација болесника са МС значајна не само за спречавање инфекције него и за спречавање релапса.

Ипак расправа о добробити вакцинације болесника са МС је још увек отворена (Gout; 2001.) јер су описани и клинички почетак болести и активација МС-а након примене одређених вакцина (Sibley 1965; Miller и сар., 1967; Yahr и Lobo-Antunes, 1972; Waisbren 1982). Нарочито је велика пажња усмерена, и велики број истраживања је урађен, са циљем да се утврди повезаност вакцина против хепатитиса *B* и МС-а. Пажња на ову вакцину је усмерена након што су у Француској и САД описани случајеви демиелинизације ЦНС-а који су се јавили неколико дана или недеља након вакцинације (Herroelen и сар., 1991; Nadler, 1993). Након описа ових случајева урађене су бројне епидемиолошке

студије и истраживања базирана на медицинским извештајима и ни једна од њих није показала повећани ризик од јављања демјелинизационих епизода или појаве МС код вакцинисаних у односу на невакцинисане особе (Ascherio и сар., 2001; DeStefano и сар., 2003; Mikaeloff и сар., 2007). У студијама у којима јесте показана узрочно-последична веза између вакцине против хепатитиса *B* и повећаног ризика од МС-а је наглашено да ова вакцина ипак не представља већи ризик за настанак МС (Fourrier и сар., 2001; Touzé и сар., 2002; Hernán и сар., 2004; Hocine и сар., 2007). У *National Academy of Sciences' Institute of Medicine* (САД) је након анализе релевантне научне литературе закључено да повезаност између вакцинације против хепатитиса *B* и демјелинизационих болести ЦНС-а не постоји (Lévy-Bruhl и сар., 2002; Schattner 2005). Осим овога, ни резултати студија у којима је испитиван могући утицај вакцине против хепатитиса *B* на релапс код особа са дијагностикованим МС нису показали да постоји повећан ризик од релапса након вакцинације (Confavreux и сар., 2001; Ozakbas и сар., 2006). Осим вакцине против хепатитиса *B*, испитиване су и вакцине против грипа, тетануса и малих богиња које су у широкој употреби и са могућим последицама за болеснике са МС. Резултати ових студија су показали да не постоји неки одређени пораст јављања МС као ни повећан ризик од релапса ове болести након вакцинације против грипа (Confavreux и сар., 2001).

Опште је познато да вакцине против вируса, за које је показано да су ефикасне у неутралисању инфективних агенаса, индукују настанак антитела специфичних за одговарајући тип и сој вируса (Fiore и сар., 2008). Још 1962. године Sibley и Foley (1965) су пратили двадесет четири болесника са МС након што су примили квадривалентну вакцину против грипа која је садржала три соја вируса *A* и један сој вируса *B*. Антитела на сва четири соја вируса су нађена код болесника са МС али и код контролне групе болесника са другим неуролошким обољењима. Пацијенти са МС су добро толерисали ову вакцину и није било уверљивих доказа о постојању нежељених реакција на вакцину. Ниво синтезе специфичних антитела након вакцинације против грипа код обе групе болесника је био сличан, а титар је порастао у просеку два до четири пута. У клиничкој студији под називом „*Influenza vaccination in MS*” коју су

урадили Moriabadi и сар. (2001.) показан је пораст синтезе специфичних антитела на вирус инфлуенце тип *A* две недеље након вакцинације и код болесника са МС и код здравих људи. Ови аутори су јасно показали да је стимулација имунског одговора након вакцинације била специфична за вирус, а не општа, јер није нађена повећана реактивност мијелин специфичних Т лимфоцита после имунизације. Укупни резултати ове студије су потврдили и ефикасност и безбедност примене вакцине против грипа код болесника са МС. Могућа улога неколико вируса, укључујући и вирус инфлуенце тип *A* је изучавана у опсервационој студији „случај-контрола“ у којој су анализирана 152 детета са МС и у којој је нађено да је титар неколико анти вирусних антитела укључујући и анти инфлуенца *A* антитела био већи код болесника са МС него у контролној групи. Овом студијом је наглашено да инфективни агенси учествују у формирању комплексне позадине МС, што се разликује од опште прихваћеног става о једном патогену као узрочнику тј. да „специфични вирус узрокује специфичну болест“ (Krone и сар., 2008). Анализом медицинске документације која је, између осталих вакцина, садржала и извештаје о вакцини против грипа није потврђена повезаност између вакцине против грипа и повећаног ризика од МС (DeStefano и сар., 2003; Hernán и сар., 2004). Резултати студија у којима је анализирано да ли вакцина против грипа утиче на ризик од егзацербације МС или од прогресије инвалидитета нису показале да постоји веза између вакцине против грипа и следственог погоршања болести (De Keyser и сар., 1998).

Осим изучавања повезаности општег ризика од појаве или релапса МС-а, у свега неколико студија је изучавано питање ефикасности примене вакцине код болесника са МС услед поремећаја у функцији имунског система код генетски предиспонираних особа, али било какав општи закључак није могао бити изведен на основу приказаних резултата (Miller и сар., 1997; Mokhtarian и сар., 1997).

Већ је дуго времена присутно размишљање да се механизам којим имунизација може да индукује МС поклапа са механизмима индукције и других аутоимунских болест као што је нпр. *GBS*. Теоријски говорећи, интензивирање имунског одговора које се нормално јавља након давања живих

атенуисаних вируса (мале богиње и варичела), инактивисаних вируса (сезонски грип и хепатитис А) или компоненте/делови вируса или бактерија (хепатитис В, HPV и пнеумокок), који се сврставају међу факторе спољашње средине, би могло да доведе и до индукције аберантног имунског одговора на сопствене антигене (Cahill и сар., 2010). Познато је да многе уобичајене инфекције пролазно индукују пораст у синтези аутоантитела. Сличан пораст у синтези аутоантитела је детектован и након давања различитих вакцина. Битно је нагласити да се ова аутоантитела нормално повећано синтетишу током имунског одговора на инфективне агенсе и да по правилу нису патогена већ имају битну имунорегулаторну улогу. Тако је показано да је појава IgM аутоантитела типа реуматоидног фактора одговорна за уклањање IgG у комплексу са антигеном у пнемонијама, и за смањење инфламације индуковане овим имунокомплексима (Mizutani и Mizutani, 1986). У складу са овим пролазним повећањем нивоа аутоантитела су и резултати већег броја кохортних студија који су показали да и код здравих особа након вакцинације против грипа долази до пролазног повећања синтезе аутоантитела (Toplak и сар., 2008; Perdan-Pirkmajer и сар., 2012). Ова аутоантитела обично нестају у периоду од два месеца након вакцинације (Borchers и сар., 2002), али је описано да у ретким случајевима могу да перзистирају дуже време. На основу резултата неколико објављених студија, уведено је да један од критеријума за утврђивање безбедности вакцине буде и одсуство стимулације продукције аутоантитела након вакцинације. Иако аутоантитела имају патогени потенцијал у неким болестима често није јасно да ли је њихова појава на одређене антигене који су од значаја за развој болести само епифеномен или аутоантитела сама по себи представљају узрочни фактор (Molina и Shoenfeld, 2005). И дан данас остаје нејасан патолошки значај аутоантителима посредованог аутоимунског енцефаломијелитиса код МС, без обзира што је показано да постоје значајани депозити аутоантитела у неким демиелинизационим лезијама (Lucchinetti и сар., 2000). Приказ случаја који су недавно публиковали Haruka Amano и сарадници (2014) подржавају гледиште да су анти-MOG антитела повезана са лонгитудинално екстензивним трансферзалним мијелитисом који је установљен након инфекције вирусом

грипа. Он се дефинише као лезија кичмене мождине која захвата три или више пршљена и класично је повезана са оптичким неуромијелитисом. Међутим, лезије кичмене мождине могу да се јаве и у неким другим аутоимунским и инфламаторним болестима које „нападају“ ЦНС, као што су МС, саркоидоза, *Sjögren*-ов синдром, као и неке друге инфективне болести које захватају и ЦНС (Trebst и сар., 2011). Клинички значај анти-MOG антитела за дијагнозу, третман и прогнозу болести још није у потпуности истражен и утврђен. Иако су ова аутоантитела нађена у читавом спектру болести повезаних са MOG-ом и код људи и код експерименталних животиња, потпуна и прецизна улога анти-MOG антитела у њиховој патогенези и даље остаје недовољно разјашњена (Amano и сар., 2014).

Механизми активације имунског одговора домаћина на инфекцију су идентични механизмима који се активирају након вакцинације (Tishler и Shoenfeld, 2004.). Међутим, патогени механизам који лежи у основи везе између вируса и МС је још увек непознат. С обзиром да вакцинација активира имунски систем и да се компоненте имунског одговора сматрају „главним играчима“ у МС-у, сматра се да је и код вакцинације као и код инфекција, молекулска мимикрија (сличност антигенских детерминанти инфективног агенса или вакцине и аутоантигена, тј мијелинских пептида) остаје најприхватљивији мада још увек само хипотетички механизам који покреће каскаду аутоимунског оштећења ткива и органа (Brocke и сар., 1998; Wucherpfennig, 2001; <http://www.acceleratedcure.org/>). Унакрсна реактивност антигенских рецептора Т лимфоцита је опште својство Т ћелијског препознавања које је неопходно да би се избалансирала потреба да се препознају страни антигени и да се смањи могућност губитка толеранције на сопствене антигене. У многим случајевима јављања аутоимунских феномена, нејасно је да ли је унакрсна реактивност само један епифеномен или настаје као резултат поремећаја способности Т лимфоцита да разликују сопствене од не-сопствених антигена кроз механизам ширење епитопа или „*epitope spreading*” (имунски одговор према антигенима који нису директан узрочник болести) (Mason, 1998; Pleister и Eckels, 2003; Wucherpfennig, 2004). Мора се међутим имати у виду да је за испољавање (аутоимунског) ефекта молекуларске

мимикрије потребно да прође неколико недеља након првог излагања антигену, а да је након наредног излагања истом антигену време потребно да се побуди (аутоимунски) одговор знатно краће (Agmon-Levin и сар., 2009). Други механизми, укључујући и путеве активације урођене имуности, којима се објашњава аутоимуност индукована вакцинама су: латентне вирусне инфекције које могу да перзистирају у циљном ткиву и да доведу до демиелинизације; соматске мутације варијабилних региона гена имуноглобулина; и абнормална производња цитокина покренута вакцинацијом (Shoenfeld и Aron-Maor, 2000; Agmon-Levin, 2009).

1.5. Утицај вакцине против грипа на учење и памћење код оболелих од мултипле склерозе

Моторна и сензорна дисфункција, затим промене у понашању као и измењене когнитивне функције јављају се као последица МС. На крају, важно је узети у обзир и чињеницу да се клинички евидентни поремећаји когнитивних функција почињу да јављају у раној фази обољења (Chiavallotti и DeLuca, 2008). Пад когнитивних функција се догоди код отприлике 65% пацијената оболелих од МС (Julian, 2011). Најчешћи симптоми међу оболелима који указују на когнитивну дисфункцију односе се на смањену способност концентрације, процес размишљања, оштећење краткотрајне и радне меморије. Међу овим симптомима поремећај памћења је најуобичајенија појава код оболелих (Drake и сар., 2006). Који је узрок поремећаја памћења код МС још увек није познато али неуролошке студије које показују постојање демиелинизационих промена у хипокампаљним структурама (део лимбичког система) указују да постојање патолошких процеса у хипокампусу не мора да буде у директној сразмери са когнитивним статусом (Roosendaal и сар., 2010). Sacco и сарадници (2015) такође кажу да се атрофија хипокампуса, беле масе у деловима мозга одмах испод кортекса као и сиве масе може јавити без обзира да ли пацијент има или нема изражене когнитивне проблеме. Alfredo и Mendez (2006) наглашавају са друге стране повезаност броја демиелинизационих

плакова у *coroni radiati* (снопови беле масе), *insuli* (важан регион у церебралном кортексу) и хипокампусу са оштећењима у когнитивним функцијама. Студије су нам до сада пружиле доказ да хипокампус игра важну улогу у делу меморије која се односи на способност обраде информација које долазе из простора око нас и тако регулише оријентацију и кретање у простору како код људи тако и код животиња (Abrahams и сар., 1997; Pouzet и сар., 2002). У сваком случају веза између хипокампуса и когнитивних функција остаје слабо истражена област код МС пацијената, као и патофизиолошки процеси који се налазе у основи симптоматологије која прати когнитивну дисфункцију. Растући број доказа добијених на ЕАЕ моделу указује да су поремећаји у учењу и памћењу који су хипокампус зависни повезани са раном активацијом микроглије, неуродегенеративним и синаптичким променама. Студије на животињским моделима могу да помогну бољем разумевању раних молекуларних и физиолошких догађаја у патогенези МС-а и да буду употребљени за постављање ране дијагнозе МС-а код особа код којих постоји позитивна породична анамнеза (Mandolesi и сар., 2015).

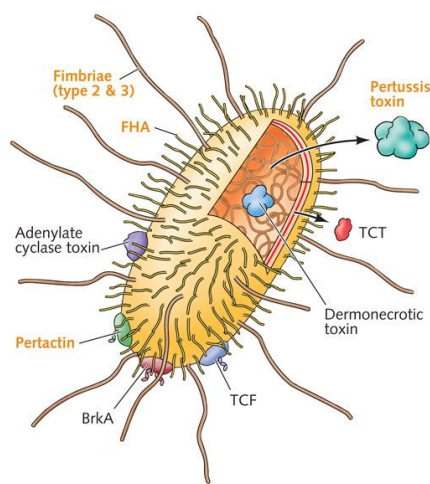
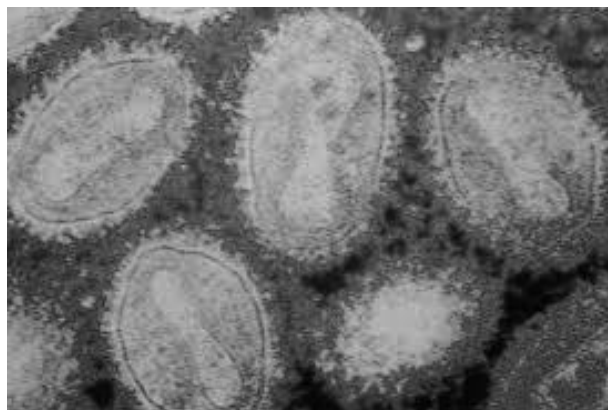
Неуролошки и когнитивни феномени повезани са инфекцијом изазваном вирусом инфлуенце су већ дуго позната чињеница, међутим механизми који леже у основи ове симптоматологије остају и даље нејасни. (Ravenhol и Foegel; 1982; Studahl, 2003; González-Duarte; 2010). За већину сојева вируса грипа укључујући и оне који су одговорни за пандемије се сматра да нису неуротропни, што сугерише да неуролошки симптоми који се вероватно јављају као последица инфекције вирусом инфлуенце нису настали директном инокулацијом вируса у делове мозга који су релевантни за очување когнитивних функција, већ је до неуроинфламације највероватније дошло као последица периферне вирусне инфекције (Schlesinger и сар, 1998; Kobasa и сар., 2007; Wang и сар., 2010). У последње време експерименти су били осмишљени тако да истраже утицај периферног пута инфекције на мозак и понашање и тако допринесу употпуњавању слике о овим догађајима а ради превенције инфламације и неуронских оштећења насталих вирусном инфекцијом изазваном периферним путем. Jurgens даље у својој докторској дисертацији (2012) показује да измењене когнитивне функције праћене

повећаном реактивношћу микроглије у хипокампусу мишева који су инфицирани вирусом инфлуенце као и инфлуенцом индуковане промене у морфологији неурона хипокампуса обезбеђују први доказ да неуроинфламација и промене у грађи хипокампалних неурона могу бити у основи функционалних оштећења која се односе на учење и памћење а која се дешавају током инфекције вирусом грипа.

Иако су почетне студије показале да инфекција вирусом грипа може да доведе до ограничене способности учења кретања у простору и губитка меморије код одраслих мишева 7. дана од изазване инфекције, подаци који се односе на повезаност између МС и других аутоимунских обољења са вакцинацијом и даље остају неусаглашени. (Shoenfeld и Aron-Maor, 2000, Jurgens, 2012).

1.6. *Pertussis* вакцина као адјуванс у индуковању ЕАЕ

Bordetella pertussis је грам негативна аеробна бактерија из рода *Bordetella* позната као узрочник великог кашља (*pertussis*). Морфолошки, *B. pertussis* је инкапсулирани кокобацил величине 0,8-0,4 μm , није покретна и не формира споре. Главни фактор вирулентности је *pertussis* токсин (егзотоксин) а поред њега фактори вирулентности су филаментозни хемаглутинаин, петрактин, фимбрија, аденилатна циклаза и трахеални цитотоксин (слика 1.4). Ова бактерија је искључиво хумани патоген, не може да преживи у спољашњој средини, а природно станиште јој је респираторна мукоза људи. У XX веку велики кашаљ је био једна од најчешћих инфективних болести деце и по подацима из САД, ова болест је била и највећи узрочник смртности деце. Пре увођења вакцинације регистровано је и више од 200,000 оболелих годишње. Након увођења вакцинације 40-тих година прошлог века, инциденца великог кашља у САД је опала за 75%. Међутим процењује се да и данас од великог кашља умире 300 000 деце годишње, највише у земљама у развоју (Hamborsky и сар., 2015; Todar, <http://textbookofbacteriology.net/index.html>)



Слика 1.4. Грађа *B. pertussis*.

На схеми су посебно означене антигенске детерминанте које су коришћене за производњу вакцина.

(<http://justhevax.blogspot.rs/2012/08/100-certainty.html>;

<http://www.museumofhealthcare.ca/explore/exhibits/vaccinations/pertussis.html>)

Превенција имунизацијом, која је уведена као обавезна крајем осамдесетих година прошлог века, остаје најбољи начин одбране у борби против *pertussis-a*. Поред тога што се *Pertussis* вакцина сматра релативно безбедном вакцином она се убраја и међу најефектније адјувансе (Finger 1975). Дуго је већ познато да *pertussis* токсин може да појача одговор код одређених експерименталних аутоимунских болести изазваних на моделима глодара, као што је ЕАЕ модел (Munoz и сар., 1984). Један од механизма, који би могао да покуша да да одговор за адјувантни ефекат, могао би бити објашњен повећањем пропустљивости крвно-мождане баријере посредоване *pertussis* токсином, а што би омогућило продор патогених Т ћелија у ЦНС и развој ЕАЕ

(Kugler и сар., 2007). Механизам дејства *B. pertussis* и њених токсина је комплексан феномен (Kugler и сар., 2007). Да ли инфекција *B. pertussis* може сама за себе да погорша експериментално изазване аутоимунске болести није и даље утврђено, међутим и даље постоје спекулације да *pertussis* као болест може да буде код људи спољни фактор који доприноси погоршању МС (Carbonetti, 2010; Rubin и Glazer, 2016.).

Постоји и рад који показује да бактерије могу да играју и заштитну улогу у развоју аутоимунских болести. У тој студији је праћен ефекат више врста бактерија на развој ЕАЕ. Утврђено је да константно излагање сојева мишева, иначе осетљивих на ЕАЕ, бактеријама *Mycobacterium tuberculosis* или *Bordetella pertussis* чини мишеве високо отпорним на накнадно индуковање болест (Lehmann и Ven-Nun, 1992).

Термин (имунолошки) адјуванс односи се на агенс који може да подстакне имунску реакцију. Дејство адјуванса се описује као његова способност да појача имуногеност антигена а финална комбинација имуногена и адјуванса се зове адјувансна формулација. Адјуванси су били и остали широко истраживано поље за развој вакцина. У току су тестирања бројних синтетских адјуванаса за вакцине и за постизање ефикасних протокола имунизације за стварање антитела. У сваком случају већина традиционалних адјуванаса су бактеријског порекла што није изненађујуће када се зна да су бактерије и њихови продукти као инфективни агенси снажни стимулатори имунолошке одбране. Општи механизам дејства адјуванаса је повећање функције антиген презентујућих ћелија а што укључује повећану експресију МНС и костимулаторних молекула као и експресију релевантних цитокина као што су IL-1 и IL-12 који делују као позитивни регулатор ћелијског имунског одговора и IL-4 који је позитивни регулатор хуморалног имунског одговора. Други квалитет адјуванаса требало би да буде обезбеђивање постојаности антигена на одређеном месту. Као додатни адјуванс, поред класичне примене Фројндовога адјуванса, *B. pertussis* вакцина је потребна у индукцији ЕАЕ за постизање израженијих и поузданијих ефеката (Constantinescu и Hillard, 2011) нарочито код мишева који су прилично резистентни на индукцију ЕАЕ (Linthicum и Frelinger, 1982). Један од механизма посредованих *pertussis*

токсином је поменуто повећање пермеабилности крвно-мождане баријере које омогућава приступ патогеним ћелијама мозгу узрокујући ЕАЕ патологију. Сматра се да *pertussis* токсин узрокује транзиторно повећање пермеабилности ендотелних ћелија крвних судова мозга код људи и тако повећава трансмиграцију хуманих моноцита (Kugler и сар., 2007.). Други механизам преко кога токсин испољава своје дејство је стимулација експресије *P* селектина на ендотелним ћелијама што као последицу има повећану интеракцију леукоцита са ендотелом крвних судова мозга (Kerfoot и сар., 2004). Поред тога *pertussis* токсин индукује продукцију проинфламаторног IL-6 од стране антиген презентујућих ћелија, и стимулише настајање Th17 ћелија, који се данас сматрају главним патогеним ћелијама у ЕАЕ, (Chen и сар. 2001; Komiyama и сар., 2006). Ефекат *B. pertussis* токсина у појачавању активности ЕАЕ је у сваком случају комплексан феномен везан са бројним ензимским активностима *pertussis* токсина (Ben-Nun и сар., 1997) али постоје подаци који указују да структурни полипептиди овог токсина могу да буду укључени у његов протективни ефекат (Lehmann и Ben-Nun, 1992; Robbinson и сар., 1996). Ова двострука улога *pertussis* токсина уочена *in vivo* могла би да настане због разлике у локално расположивој концентрацији *pertussis* токсина. Тако је показано да при вишим концентрацијама *pertussis* токсина, долази до повећаног генерисања секундарног гласника *cAMP* који покреће унутарћелијске сигнале који за резултат имају смањену пермеабилност крвних судова (Brückener и сар., 2003).

2. ЦИЉЕВИ РАДА

Ова докторска дисертација је урађена са циљем давања доприноса у расветљавању актуелног питања добробити примене вакцине против грипа, и да понуди свој одговор на питање да ли и у којој мери ова вакцина утиче на могући развој или погоршање, и изазивање аутоимунских болести централног нервног система.

Непосредни циљеви ове дисертације су:

1. Вакцинисање C57BL/6 мишева комерцијално доступном вакцином против грипа (инактивисани вирус инфлуенце) и индукција ЕАЕ након вакцинације;
2. Испитивање улоге вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса индукованог ЕАЕ кроз праћење:
 - индукције синтезе антитела на антигене вируса грипа,
 - индукције синтезе антитела на MOG₃₅₋₅₅ пептид,
 - динамике развоја клиничких знакова болести,
 - појаве лезија у хипокампадној регији мозга,
 - експресије МНС молекула I и II класе у хороидном плексусу,
 - морфолошких промена у ткиву периферних лимфних органа, слезине и ингвиналних лимфних чворова, и експресије МНС молекула II класе,
 - ефеката вакцине на когнитивне функције, губитак меморије и способности учења.
3. Индуковање ЕАЕ код C57BL/6 мишева и испитивање ефеката различитих доза *Bordetella pertussis* вакцине као појачивача индукције ЕАЕ кроз праћење:
 - индукције синтезе антитела на MOG₃₅₋₅₅ пептид,
 - динамике развоја клиничких знакова болести,
 - појаве лезија у паренхиму и хипокампадној регији мозга,
 - експресије CD4 молекула и МНС молекула I и II класе у хипокампадној регији мозга.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал

MOG₃₅₋₅₅ пептид (Sigma Aldrich).

Bordetella pertussis бацили (British Reference reagent 88/522; National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertsforsshire, Велика Британија).

Комплетан Фројндов адјуванс (енглески: *Complete Freund's adjuvant; CFA*): садржи 1 mg/ml топлотом инактивисаних и лиофилизованих *Mycobacterium tuberculosis*; (Sigma Aldrich).

Вакцина против грипа: *Influenza split virion inactivated vaccine, Vaxigrip, Sanofi, Pasteur, SA*, Француска.

3.2. Експерименталне животиње

У експериментима су коришћени мишеви високосродног соја C57BL/6 старости 6-8 недеља, женског пола. Животиње су преузете из Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. Животиње су даље чуване и размножаване у виваријуму Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“ у Београду, под стандардним условима са константном температуром од 25°C, уз слободан приступ води и храни. Истраживања су обухватила три експериментална приступа која су спроведена у сагласности са упутствима (86/609/ЕЕС) Европског парламента и Савета о заштити животиња и са Законом о добробити животиња Републике Србије. Експерименте је одобрио Етички комитет за заштиту добробити огледних животиња Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“.

3.3. Праћење ефекта примене вакцине против грипа на развој клиничких знакова ЕАЕ и на когнитивне функције мишева.

3.3.1. Експериментални дизајн

Студија је рађена на 40 мишева. Укупно трајање експеримента је било 31 дан. Схема експеримента приказана је у табели 3.1.

Животиње су насумично подељене у 4 групе од по 10 животиња и то: 1) ЕАЕVСС, мишеви имунизовани MOG пептидом и вакцинисани вакцином против грипа; 2) ЕАЕ, мишеви имунизовани MOG пептидом; 3) VСС, мишеви вакцинисани вакцином против грипа и 4) IC, интактна контрола, нетретирани мишеви.

Мишевима из прве и треће групе (ЕАЕVСС и VСС, укупно 20 животиња) је четвртог дана експеримента интрамускуларно, глутеално, обострано, аплицирано 50 μ l вакцине против грипа која је у тој запремини садржала 15 μ g хемаглутинаина три соја вируса. Три дана касније, осмог дана експеримента, мишевима из прве и друге групе, (ЕАЕVСС и ЕАЕ, укупно 20 животиња) је индукован ЕАЕ истовременом апликацијом MOG₃₅₋₅₅ пептида и инактивисаних *Bordetella pertussis* бацила, који су служили као адјуванс. Инокулум за индукцију ЕАЕ (100 μ g MOG₃₅₋₅₅ пептида у CFA) је био апликован субкутано у слабински део десне стране тела (Suter и сар. 2000). Топлотом инактивисани бацили *B. pertussis* (1×10^9 у 150 μ l изотоничног фосфатног пуфера) су давани интраперитонеално, истовремено са апликовањем MOG₃₅₋₅₅ пептида, и два дана након прве апликације.

Од 40 мишева укључених у експеримент 24. дана након индукције ЕАЕ жртвовано је 32, а остали су удомљени. Пре жртвовања мишеви су анестезирани кетамином, крв је узета кардијалном пункцијом, а затим је урађена кардијална перфузија са изотоничним фосфатним пуфером која је праћена перфузијом 4% параформалдехидом у 0,1 М фосфатном пуферу. Ткиво мозга је извађено, учвршћено медијумом за криопрезервацију (Optimal cutting temperature compound; Kilik, Bio Optica, Италија) и до коришћења чувано на

-80°C. За анализа су такође узимани и слезина и ингвинални лимфни чворови који су до хистолошке и имунохистохемијске анализе чувани у 4% параформалдехиду.

Табела 3.1. Схема експеримента у коме је праћен ефекат примене вакцине против грипа на развој клиничких знакова ЕАЕ као и ефекат ове вакцине на когнитивне функције.

А	Б	<i>MWM</i>	<i>VCC</i>	<i>MOG</i>	Жртвовање
1		+			
2		+			
3		+			
4		+	+		
5		-			
6		-			
7		+			
8	1	-		+	
9	2	-			
10	3	-			
11	4	+			
12	5	-			
13	6	-			
14	7	-			
15	8	+			
16	9	+			
17	10	+			
18	11	+			
19	12	-			
20	13	-			
21	14	+	Појава клиничких знакова ЕАЕ		
22	15	+			
23	16	+			
24	17	+			
25	18	+	Пролазна слабост после <i>MWM</i> теста		
26	19	-			
27	20	-			
28	21	+			
29	22	+			
30	23	-			
31	24	-			+

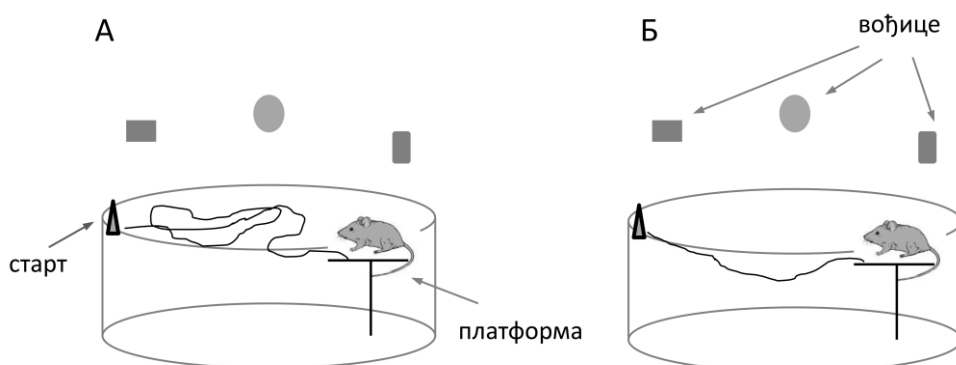
А: дани експеримента; Б: дани након индукције ЕАЕ *MOG*₃₅₋₅₅ пептидом; *MWM*: извођење теста меморије и просторне оријентације; *VCC*: имунизација вакцином против грипа; *MOG*: Индукција ЕАЕ.

3.3.2. Праћење ефекта примене вакцине против грипа на развој клиничких знакова ЕАЕ.

Клинички знаци ЕАЕ су праћени свакодневно, почевши од 7. дана након индукције ЕАЕ. Интензитет појаве клиничких знакова је нумерички оцењиван у сагласности са следећим критеријумима: (0) без клиничких знакова; (1) млитавост репа; (2) пареза задњих екстремитета; (3) парализа задњих екстремитета; (4) квадриплегија; (5) угинуће. Мишевима чији су клинички знаци били између вредности установљених као критеријум су додељиване интермедијерне вредности са променом од 0,5.

3.3.3. Праћење ефекта примене вакцине против грипа и индукције ЕАЕ на когнитивне функције.

Утицај вакцине против грипа и индукције ЕАЕ на когнитивне функције је испитиван Морисовим тестом воденог лавиринта (*енглески: Morris water maze (MWM) test*) (Logue и сар., 1997). Схематски приказ принципа теста дат је на слици 3.1.



Слика 3.1. Схема MWM теста. А) Путања коју миш прелази на почетку експеримента, тј. на почетку учења. Б) Путања коју миш прелази на крају експеримента.

MWM тест се користио за процену способности просторног учења мишева. У овом тесту миш се спуштао у базен, након чега је требало да уз

помоћ спољних оријентира нађе платформу која је зароњена испод површине воде, тј. невидљива, и изађе из воде. Након спуштања мишева посматрана је путања којом мишеви налазе платформу, а забележени су време за које су мишеви налазили платформу и њихова моторна функција. Након проналажења платформе мишеви су на њој остајали 10 sec. За мишеве који нису успели да за 120 sec нађу платформу се сматрало да нису испунили задатак и усмеревани су према платформи на којој су такође остајали 10 sec. После сваког теста мишеви су враћани у загрејане кавезе у којима су били и заштићени од ваздушних струјања. Мишеви су изводили по два теста пливања дневно.

3.4. Праћење ефекта имунизације инактивисаним *Bordetella pertussis* бацилима на развој клиничких знакова ЕАЕ.

3.4.1. Експериментални дизајн

Студија је рађена на 40 мишева. Животиње су насумично подељене у 4 групе од по 10 животиња и то: 1) ЕАЕ, мишеви имунизовани само хомогенатом кичмене мождине мишева у *CFA*; 2) ЕАЕ_{+adj}, имунизовани хомогенатом кичмене мождине мишева и адјувантном дозом *B. Pertussis*; 3) ЕАЕ_{+conc}, имунизовани хомогенатом кичмене мождине мишева и концентрованој дозом (еквивалент хумане дозе) *B. pertussis* вакцине и 4) ИС, интактна контрола - нетретирани мишеви.

Имунизација хомогенатом кичмене мождине миша је урађена по модификованој методи коју су описали Frei и сарадници (1997). На дан имунизације мишевима из прве три групе је даван инокулум од 300 μL суспензије коју су чинили 5.0 mg хомогената ресуспендованог у 150 μL изотоничног фосфатног пуфера и 150 μL *CFA*. Инокулум је даван субкутано, у леђа, у три порције од по 100 μL (једну у предњи део, и на леву и десну страну задњег дела леђа). Након два дана мишевима из прве групе је интраперитонеално аплицирано 10^{10} инактивисаних *B. pertussis* микроорганизама ресуспендованих у 300 μL изотоничног фосфатног пуфера. Мишевима из друге групе је интраперитонеално аплицирано 4×10^{10}

инактивисаних *B. pertussis* микроорганизама ресуспендованих у 300 μL изотоничног фосфатног пуфера што би био еквивалент хумане дозе (Mills и сар., 1998.). Клинички знаци су праћени и оцењивани на начин описан у делу 3.3.2.

Животиње су жртвоване 24. дана након имунизације. Пре жртвовања мишеви су анестезирани кетаминем, крв је узета кардиалном пункцијом, а затим је урађена кардијална перфузија са изотоничним фосфатним пуфером која је праћена перфузијом 4% параформалдехидом у 0,1 М фосфатном пуферу. Ткиво мозга је извађено, учвршћено медијумом за криопрезервацију и до коришћења чувано на -80°C .

3.5. Методе

3.5.1. Имуноензимски тестови (ELISA)

3.5.1.1. Детекција присуства IgG антитела на вирус инфлуенце у серумима мишева

Присуство IgG антитела на вирус инфлуенце је детектовано директним ELISA поступком, који је по модификованој процедури Voller-а и сарадника (1976) припремљен у лабораторији Биомедицинског центра Института Торлак.

Тест је рађен у микротитарским плочама са 96 места са равним дном (NUNC, Данска). Антиген, вирус инфлуенце, је у концентрацији од 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ растворен у изотоничном фосфатном пуферу, и у запремини од 50 μl наносен у бунариће микротитарских плоча. У контролне бунариће је наносено по 100 μl говеђег албумина раствореног у истом пуферу у концентрацији 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Плоче су инкубиране 16-18 сати на 4°C и за то време се антиген везао за плоче. Невезани антиген је уклоњен троструким испирањем плоча изотоничним фосфатним пуфером. Затим је неспецифично везивање блокирано додавањем 1% говеђег албумина раствореног у истом пуферу, у запремини од 200 μl по бунарићу. Након инкубације од 1 сата на 37°C , неvezани албумин је уклоњен четвороструким испирањем плоча пуфером за испирање (изотонични фосфатни пуфер са 0,05% нејонским детергентом Tween 20). У следећој фази, по 100 μl

серума разблаженог у односу 1:100 у изотоничном пуферу са 1% говеђим албумином је наношено у бунариће микротитарских плоча. Сви узорци серума су постављани у дупликату. Серуми су инкубирани 1 сат на 37° С, за које време су се формирали имунокомплекси између антигена везаних за плоче и серумских антитела. По завршеној инкубацији плоче су испране три пута, а затим је у сваки бунарић додато по 50 μ l 100x разблаженог секундарног антитела – поликлонска, зечја, пероксидазом обележена антитела према IgG миша (ДАКО, Данска). Инкубација са секундарним антителима је трајала 1 сат на собној температури. Затим су невезани молекули секундарног антитела уклоњени троструким испирањем а реакција антигена и антитела је визуелизована додавањем супстрата пероксидазе. Као супстрат пероксидазе коришћен је свеже припремљен раствор 1 mg/ml о-фенилендиамина (Sigma Aldrich, САД) у цитратном пуферу рН 5, у који је додато 12 μ l 12% H₂O₂ (50 μ l/бунарићу). Ензимска реакција се одвијала 15 min у мраку, након чега је заустављена додавањем 2M H₂SO₄. Апсорбанца реакционог производа на 492/620 nm је мерена на читачу микротитарских плоча Multiscan Ascent (Labsystems, САД).

3.5.1.2. Детекција присуства анти MOG IgG антитела у серумима мишева

Присуство анти MOG IgG антитела је детектовано директним ELISA поступком, који је по модификованој процедури Voller и сар. (1976) припремљен у лабораторији Биомедицинског центра Института Торлак лабораторији.

Тест је рађен у микротитарским плочама са 96 места са равним дном (NUNC, Данска). MOG₃₅₋₅₅ антиген је у концентрацији од 5 μ g/ml растворен у карбонатно/бикарбонатном пуферу рН 9,6, и у запремини од 50 μ l наношен у бунариће микротитарских плоча. У контролне бунариће је наношено по 100 μ l говеђег албумина раствореног у истом пуферу у концентрацији 10 μ g/ml. Плоче су инкубиране 16-18 сати на 4 °С, затим су три пута испране изотоничним фосфатним пуфером. Неспецифично везивање блокирано додавањем 1% говеђег албумина раствореног у истом пуферу, у запремини од 200 μ l по бунарићу. Након инкубације од 1 сата на 37°С, плоче су испране пуфером за

испирање (изотонични фосфатни пуфер са 0,05% Tween 20). У следећој фази, по 100 μl серума разблажених у односу 1:50 у изотоничном пуферу са 1% говеђим албумином је наношено у бунариће микротитарских плоча. Сви узорци серума су постављани у дупликату. Серуми су инкубирани 1 сат на 37° С, за које време су се формирали имунокомплекси између антигена везаних за плоче и серумских антитела. По завршеној инкубацији плоче су испране три пута, а затим је у сваки бунарић додато по 50 μl 100x разблаженог секундарног антитела – поликлонска, зечја, пероксидазом обележена антитела према IgG миша (ДАКО, Данска). Инкубација са секундарним антителима је трајала 1 сат на собној температури. Затим су плоче испране три пута, а рекација антигена и антитела је визуелизована додавањем супстрата пероксидазе. Као супстрат пероксидазе коришћен је свеже припремљен раствор 1 mg/ml о-фенилендиамина (Sigma Aldrich, САД) у цитратном пуферу рН 5, у који је додато 12 μl 12% H_2O_2 (50 μl /бунарићу). Ензимска реакција се одвијала 15 мин у мраку, након чега је заустављена додавањем 2М H_2SO_4 . Апсорбанца реакционог производа на 492/620 nm је мерена на читачу микротитарских плоча Multiscan Ascent (Labsystems, САД).

3.5.2. Имунохистохемијске анализе

3.5.2.1. Имунопероксидазна детекција МНС молекула II класе у слезини и лимфним чворовима

Ткива слезине и лимфних чворова која су фиксирана у формалдехиду и укалупљена у парафину су сечена микротомом (Microtome HM 450; Leica) на ткивне пресеке дебљине 5 μm . Ткивни пресеци су наношени на микроскопске плочице (Superfrost slides ThermoScientific, Немачка), депарафинизовани у ксилену и рехидрирани превођењем кроз серију етанолских раствора (2x100% 5min, 1x96% 5min, 1x70% 5min). Пре имунохистохемијског бојења ткивни пресеци су бојени хематоксилин-еозином да би се визуелизовала морфологија ткива. На ткивним пресецима који су коришћени за имунохистохемијску анализу, демаскирање антигена је урађено загревањем у микроталасној печници уз коришћење цитратног пуфера рН 6. Пресеци су испрани три пута

изотоничним TRIS пуфером (енгл: *tris buffered saline, TBS*), pH 7,5 а затим је активност ендогених пероксидаза заустављена инкубацијом у 0,3% H₂O₂ у метанолу, након чега су пресеци испрани 3 пута у изотоничном фосфатном пуферу, а неспецифично везивање је блокирано 10% нормалним зечјим серумом. Након поновљеног испирања ткивни пресеци су инкубирани, или 1 сат на собној температури или преко ноћи на 4°C, са анти-МНС II примарним антителом (клон ER-TR3; Serotec, Велика Британија). Примарно антитело је било разблажено 50x у TBS-у. Након инкубације невезано примарно антитело је уклоњено троструким испирањем у TBS-у након чега су ткивни пресеци инкубирани са 100x разблаженим секундарним антителом: пероксидазом коњугована поликлонска антитела зеца према IgG миша (DAKO, Данска). Инкубација је трајала 1 сат на собној температури. По завршеној инкубацији, пресеци су испрани и инкубирани 10 min са супстратом пероксидазе (0,6 mg/ml диамино-бензидин-тетрахлорид, у TBS-у, са додатком 0,012% H₂O₂). Одмах затим пресеци су испрани водом, благо контрастирани хематоксилином, дехидрирани серијом етанолских раствора, просветљени у ксилолу, и монтирани у *Canada balsam* медијуму. Као контрола су служили пресеци на које је уместо примарног антитела наносен нормални IgG пацова.

Ткивни пресеци су посматрани под увећањем објектива од 10x и 40x, светлосним микроскопом *BH2 research microscope* (Olympus Optical Co. LTD. Јапан) који је опремљен а Color View III дигиталном камером (Olympus). Фотографије су прављене помоћу Analysis Docu софтвера (Olympus).

3.5.2.2. Имунопероксидазна детекција MOG и МНС молекула I и II класе у ткиву мозга

Репрезентативни делови криоконзервираног ткива мозга су криотомом *Jung-Reichert Cryocut E* (Cambridge Instruments, Немачка) сечени на пресеке дебљине 5 µm који су затим наносени на микроскопске плочице (Superfrost slides, ThermoScientific, Немачка). Ткивни пресеци су осушени на ваздуху, и фиксирани у охлађеном ацетону, 10 min на -20°C. Фиксирани пресеци су испрани TBSom, а затим је активност ендогених пероксидаза заустављена инкубацијом у 0,3% H₂O₂ у метанолу. После три испирања у дестилованој води

неспецифично везивање је блокирано 10% нормалним зечјим серумом. Након поновљеног испирања ткивни пресеци су инкубирани 24 сата на 4°C, са 50x разблаженим примарним антителима на мишје-МНС молекуле II класе (клон ER-TR3; Serotec, Велика Британија), мишје МНС молекуле I класе и (клон 28-8-6 (RUO); BD Pharmingen, САД), или MOG (клон D-2; Santa Cruz Biotechnology Inc., САД).

После три испирања TBS-ом, ткивни пресеци су инкубирани са 100x разблаженим секундарним антителима: пероксидазом коњугована поликлонска антитела зеца према IgG пацова (ДАКО, Данска). Инкубација је трајала 1 сат на собној температури. По завршеној инкубацији, пресеци су испрани и инкубирани 10 min са супстратом пероксидазе (0,6 mg/ml диамино-бензидин-тетрахлорид, у TBS-у, са додатком 0,012% H₂O₂). Одмах затим пресеци су испрани водом, благо контрастирани хематоксилином, дехидрирани серијом етанолских раствора, просветљени у ксилолу, и монтирани у *Canada balsam* медијуму. Као контрола су служили пресеци на које је уместо примарног антитела наношен нормални IgG пацова.

Ткивни пресеци су посматрани под увећањем објектива од 10x, светлосним микроскопом *BH2 research microscope* (Olympus Optical Co. LTD. Јапан) који је опремљен а Color View III дигиталном камером (Olympus). Фотографије су прављене помоћу Analysis Docu софтвера (Olympus).

3.5.2.3. Имунофлуоресцентна детекција CD4 и МНС молекула II класе у ткиву мозга

Поступак припреме ткива, прављења ткивних пресека, фиксације, блокирања несспецифичног везивања и инкубације са примарним анти МНС II антителима је био идентичан описаном у делу 3.4.2.2.

После испирања примарног антитела ткивни пресеци су 90 min, на собној температури, инкубирани секундарним антителима: Родамином коњугована поликлонска антитела зеца на IgG пацова (Invitrogen, Life Technologies, САД). Секундарно антитело је било разблажено 100x у изотоничном фосфатном пуферу. Након завршене инкубације и троструког испирања у фосфатном пуферу ткивни пресеци су покривени медијумом за

монтажу (DAKO, Данска) и анализирани ласерским конфокалним микроскопом (*Laser Scanning Microscope, LSM META 510*; Carl Zeiss, Немачка) при увећању објектива 10 и 20x. Као контрола су служили пресеци на које је уместо примарног антитела наношен нормални IgG пацова.

3.6. Статистичка анализа

За статистичку обраду података коришћени су програмски пакети OriginPro8 и MicroSoft Excel. Подаци су анализирани Студентовим T тестом. Критеријум за значајност разлике је био на нивоу вероватноће $P = 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Ефекат инактивисане вакцине против грипа на C57BL/6 мишеве са ЕАЕ индукованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом

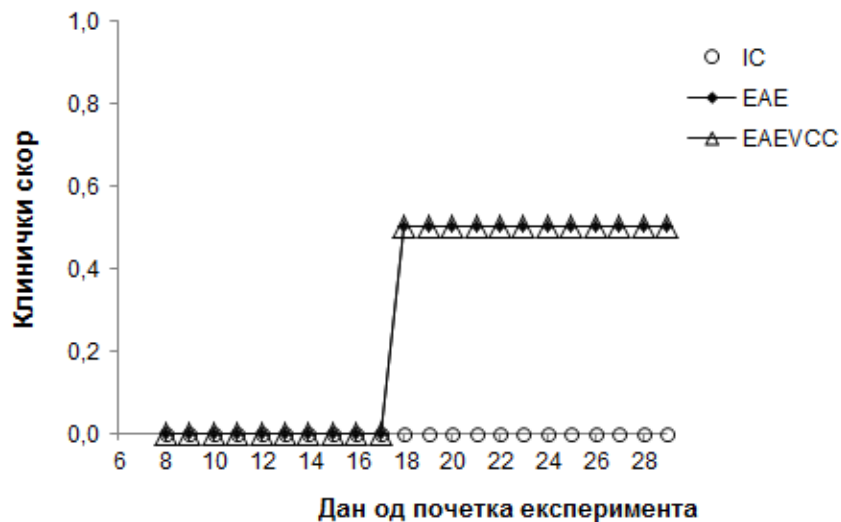
У првој групи експеримената испитиван је утицај вакцине против грипа код мишева код којих је након примања вакцине индукован ЕАЕ. Мишеви су подељени у 4 групе: мишеви вакцинисани против грипа код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕVСС), мишеви који нису добили вакцину али код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ), мишеви који су вакцинисани против грипа али код којих није индукован ЕАЕ (VСС) и нетретирани мишеви – интактна контрола (IC). Схема експеримента по данима приказана је у делу 3.3.1.

4.1.1. Клинички скор – моторна функција

Оцењивање моторне функције код ЕАЕ и ЕАЕVСС групе мишева је вршено према следећем критеријуму: (0) без промена; (1) млистав реп; (2) слабост задњих ногу; (3) комплетна парализа задњих ногу; (4) комплетна парализа предњих и задњих ногу (квадриплегија) и (5) угинуће. Мишеви са дефицитом у моторној функцији која је могла бити оцењена као оштећење а чија вредност би била између вредности установљених као критеријум се у том случају померала за градијент од 0,5.

Праћење клиничких знакова код мишева на дневној основи је почело 8. дана од индукције ЕАЕ (15. дан од почетка експеримента) закључно са 24. даном (31. дан од почетка експеримента) када су животиње жртвоване. Код 10 мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (из ЕАЕ и ЕАЕVСС) нису детектовани клинички знаци ЕАЕ. Први клинички знаци, запажени као снижен тонус мишића репа (оцена 0,5), појављују се 14. дана од индукције ЕАЕ (21. дан од почетка експеримента) и то код 6 од 10 мишева ЕАЕVСС групе и 4 од 10 мишева ЕАЕ групе. Код неких мишева из ЕАЕVСС и ЕАЕ групе слабост задњих ногу (оцена 2) запажена је први пут 18. дана од индукције ЕАЕ (25. дан од почетка експеримента) и то одмах по завршетку *MWM* теста и трајала је

само 2 сата и зато није утицала на комплетан клинички скор. Парализа, квадриплегија или угинуће није се десило ни у једном случају. У целини ток и клиничка слика код мишева код којих је индукован ЕАЕ се могу описати као благи. Ток појаве клиничких знакова ЕАЕ за ЕАЕ и ЕАЕVCC групу је приказан на слици 4.1.



Слика 4.1. Ток појаве клиничких знакова код мишева код којих је ЕАЕ индукован *MOG₃₅₋₅₅* пептидом.

4.1.2. Клинички параметар – тежина мишева

Резултати мерења тежине мишева 4. дана експеримента (непосредно пре вакцинације против грипа) и 30. дана експеримента показали су благ пораст тежине код све 4 групе (ЕАЕVCC, ЕАЕ, VCC и IC) мишева (табела 4.1). Ни индукција ЕАЕ ни вакцинација против грипа нису утицали на промену тежине мишева (у смислу губитка) у овом периоду.

Табела 4.1. Промена тежина мишева од 4. дана (непосредно пре вакцинације против грипа) до 30. дана експеримента.

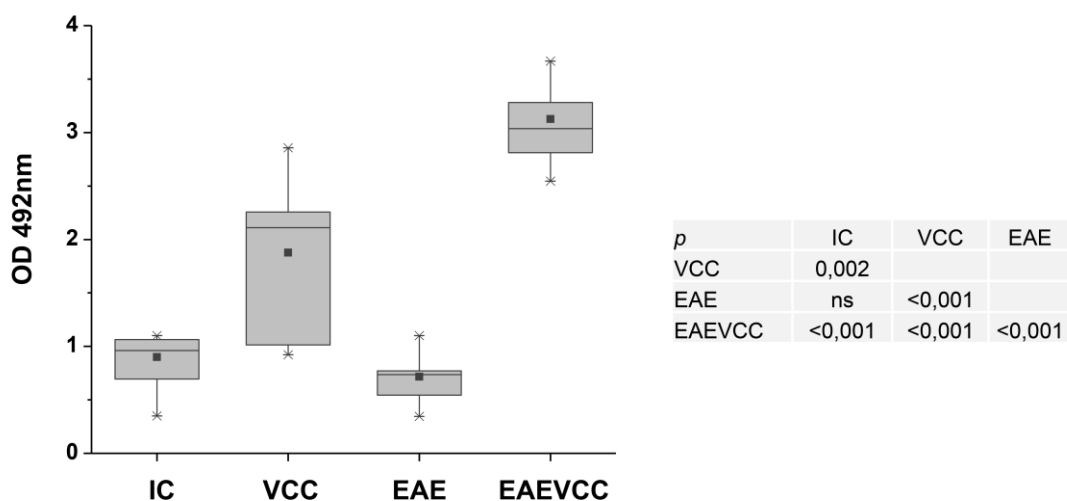
	Тежина (g)		Пораст тежине
	4. дан	30. дан	(%)
IC	19,5 ± 0,8 (18,4 - 20,6)	20,8 ± 0,9 (19,5 - 22,0)	7 ± 5 (0 - 18)
VCC	19,8 ± 1,0 (18,3 - 21,2)	21,3 ± 0,7 (20,1 - 22,4)	8 ± 6 (0 - 21)
EAE	19,9 ± 0,6 (18,9 - 20,7)	21,4 ± 0,5 (20,5 - 21,9)	8 ± 3 (3 - 13)
EAEVCC	20,4 ± 1,0 (18,8 - 21,6)	21,4 ± 0,9 (19,9 - 22,5)	5 ± 1 (1 - 7)

4.1.3. Титар серумских анти-инфлуенца антитела

Титар анти-инфлуенца (анти-НА) антитела је одређиван у серумима сакупљеним 31. дана експеримента, непосредно пре жртвовања. Резултати теста су приказани на слици 4.2 и прилогу 1. Мишеви VCC и EAEVCC групе су имали статистички значајно повећан титар ових антитела у односу на мишеве EAE и IC групе. И између група које су биле вакцинисане против грипа је постојала статистички значајна разлика у титру испитиваних антитела при чему је титар био већи код EAEVCC групе.

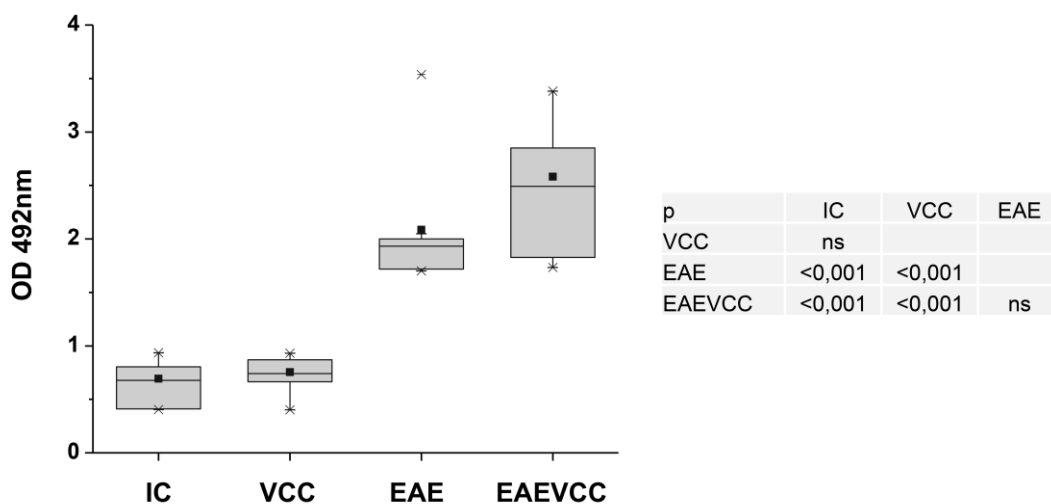
4.1.4. Титар серумских анти-MOG антитела

Титар анти-MOG антитела је такође одређиван у серумима сакупљеним на крају експеримента, непосредно пре жртвовања. Резултати теста су приказани на слици 4.3 и прилогу 2. Групе код којих је индукован EAE (EAE и EAEVCC) су имале значајно већи титар анти-MOG антитела у поређењу са групама код којих није био индукован EAE (IC и VCC).



Слика 4.2. Титар анти-инфлуенца (анти-НА) антитела у серумима испитиваних група мишева: IC, VCC, EAE и EAEVCC.

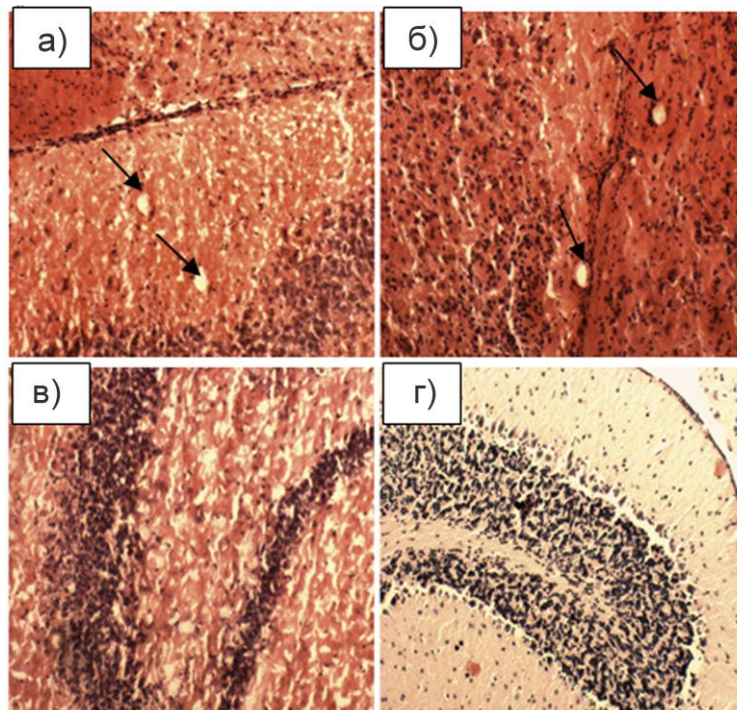
На хистограмима су приказани: средња вредност (■); медијана, као линија унутар хистограма; вредност унутар правоугаоника приказује опсег од 25% до 75% вредности анализираних група, граници означавају распон од минималне до максималне вредности, а (*) распон од 1% до 99% вредности анализираних група. Резултати Т-теста којим је одређена значајност разлике у титрима антитела између испитиваних група приказани су у табели поред слике. ns – разлика није статистички значајна, $p > 0,05$



Слика 4.3. Титар анти-MOG антитела у серумима испитиваних група мишева: IC, VCC, EAE и EAEVCC. Резултати Т-теста којим је одређена значајност разлике у титрима антитела између испитиваних група приказани су у табели поред слике. ns – разлика није статистички значајна, $p > 0,05$.

4.1.5. Хистолошка анализа хипокампадне регије

Хематоксилин-еозин бојењем (слика 4.4) ткивних пресека мозга мишева који су жртвовани 24. дана од индукције ЕАЕ (31. дан од почетка експеримента) уочене су мање промене типа лезија у хипокампусу ЕАЕVСС и ЕАЕ групе. Код VСС и IC групе ове лезије нису уочене.

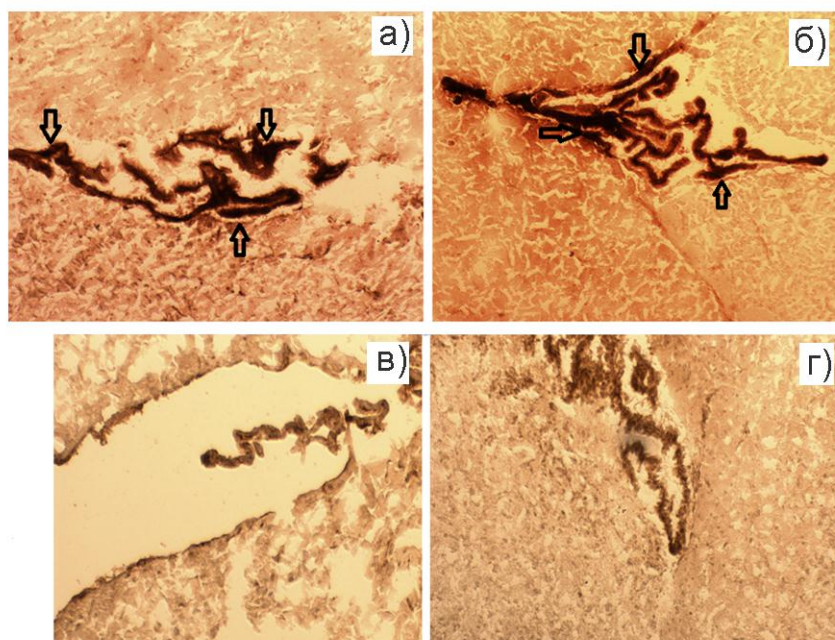


Слика 4.4. Хематоксилин-еозин бојење хипокампадне регије мозга; а) ЕАЕVСС, б) ЕАЕ, в) VСС и г) IC. Пресеци мозга свих мишева укључених у експеримент су анализирани и добијени резултати унутар сваке групе су били слични. Увећање објектива 10х. Лезије су означене стрелицама.

4.1.5.1. Хистолошка анализа: Експресија MHC I и MHC II молекула у хороидном плексусу

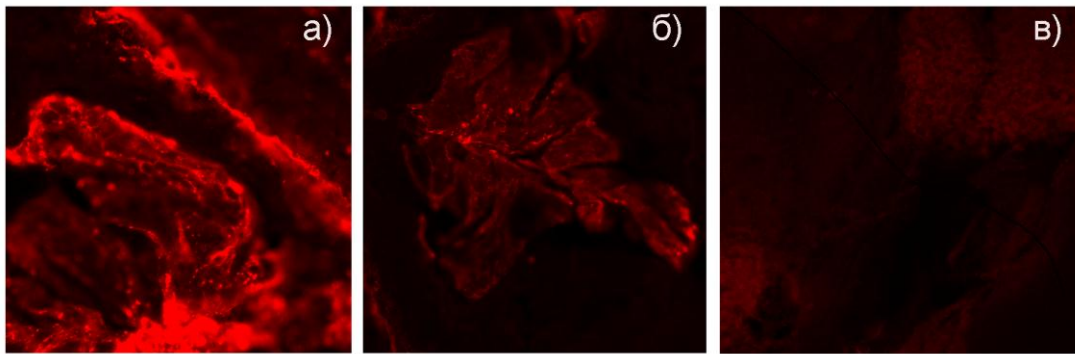
Имунопероксидазним бојењем моноклонским антителом на MHC молекуле II класе детектоване су ретке, слабо MHC II позитивне ћелије, у хороидном плексусу VСС и IC групе мишева. Код мишева код којих је био

индукован ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕVСС групе) *МНС* II позитивне ћелије су биле бројније и интензивније обојене (слика 4.5).



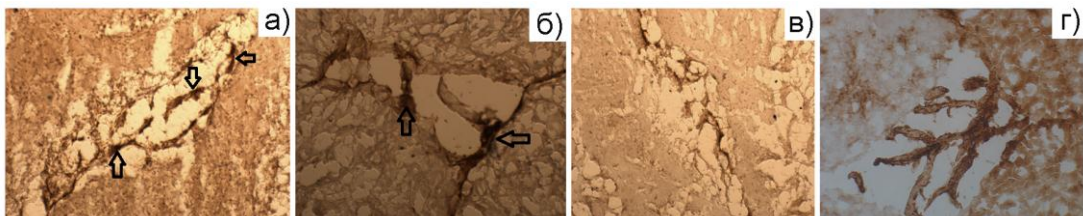
Слика 4.5. Експресија *МНС* молекула II класе у хороидном плексусу мишева: имунопероксидазно бојење; а) ЕАЕVСС, б) ЕАЕ, в) VCC, г) IC. Увећање објектива 10х. Стрелицама су означене снажно обојене *МНС* II позитивне ћелије.

У следећој фази рада, са циљем да се укаже на евентуалне разлике у интензитету експресије *МНС* II молекула у хороидном плексусу између мишева ЕАЕ и ЕАЕVСС групе, *МНС* II позитивне ћелије су визуелизоване имунофлуоресцентним бојењем и анализирале конфокалном микроскопијом. Овом високоосетљивом анализом уочен је повећан интензитет експресије *МНС* II у хороидном плексусу ЕАЕVСС групе у односу на ЕАЕ групу мишева (слика 4.6).



Слика 4.6. Експресија МНС молекула II класе у хороидном плексусу мишева: имунофлуоресцентно бојење и конфокална микроскопија; а) ЕАЕVСС, б) ЕАЕ, и в) IC. Увећање објектива 10х.

За разлику од МНС II позитивних ћелија, МНС I позитивне ћелије се након имунопероксидазног бојења виде као слабије обојене и појединачне и насумично распоређене кроз хороидни плексус код ЕАЕ и ЕАЕVСС групе мишева. Само врло ретке МНС I позитивне ћелије су се могле уочити у хороидном плексус VСС и IC групе мишева (слика 4.7).



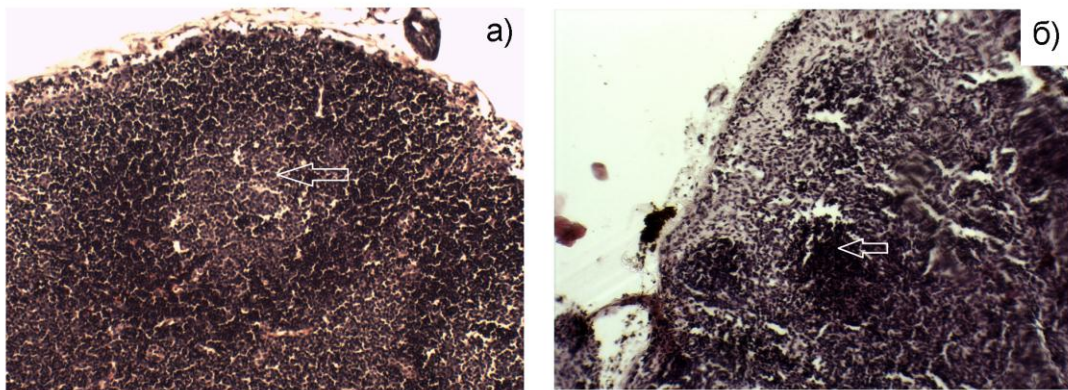
Слика 4.7. Експресија МНС молекула I класе у хороидном плексусу мишева: имунопероксидазно бојење; а) ЕАЕVСС, б) ЕАЕ, в) VСС, г) IC. Стрелицом су означене МНС I позитивне ћелије.

4.1.6. Хистолошка анализа лимфних чворова и слезине

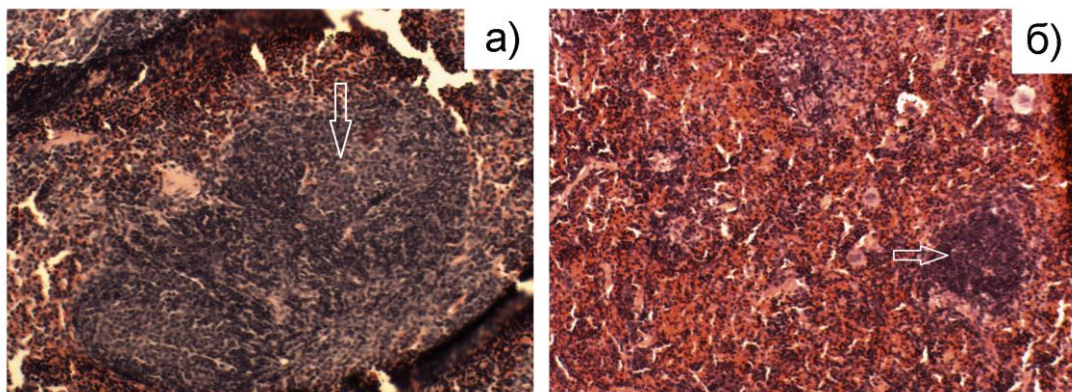
Хистолошка анализа периферних лимфних органа, лимфних чворова и слезине, код мишева са индукованим ЕАЕ, рађена је са циљем да се утврди да ли су постојали хистолошки знаци имунолошке активације у периферним лимфним органима.

4.1.6.1. Хематоксилин – еозин бојење

У кортексу ингвиналних лимфних чворова мишева са ЕАЕ су се уочавали формирану герминативни центри (слика 4.8а) у лимфним фоликулима као место експанзије В ћелијских клонова формираних у одговору на присуство антигена (највероватније MOG пептида). У белој пулпи слезине такође су се видели формирану герминативни центри у фоликулу (слика 4.9а). И у лимфним чворовима и слезини контролне IC групе (слика 4.8б и 4.9б) нису се уочавали герминативни центри.



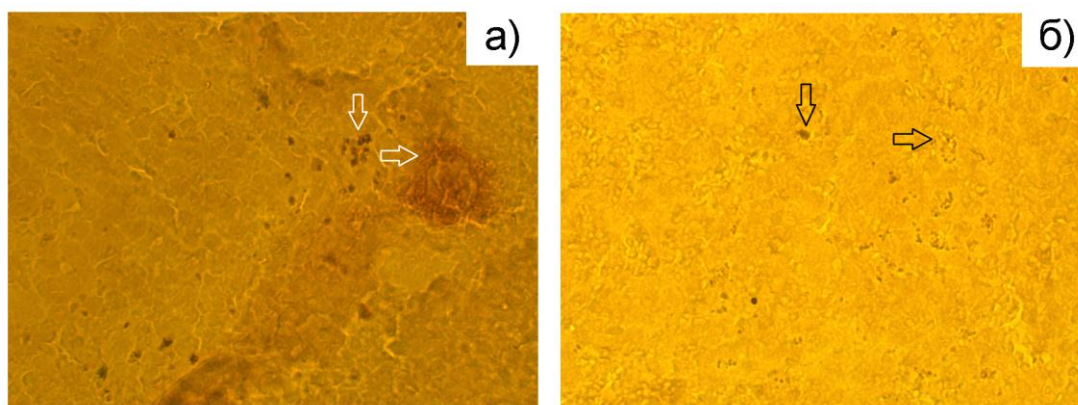
Слика 4.8. Кортекс лимфних чворова (а) мишева са ЕАЕ, који је индукован MOG₃₅₋₅₅ пептидом и (б) контролне групе (IC) мишева. Хематоксилин еозин бојење, увећање објектива 10х. Стрелица показује герминативни центар.



Слика 4.9. Бела пулпа слезине (а) мишева са ЕАЕ, који је индукован MOG₃₅₋₅₅ пептидом и (б) контролне групе (IC) мишева. Хематоксилин еозин бојење, увећање објектива 10х. Стрелица показује герминативни центар (а) и фоликул (б).

4.1.6.2. Експресија *MHC* II молекула

Имунопероксидазно бојење ткивних пресека слезине са моноклонским анти *MHC* II антителом показало је да, у односу на контролну (IC) групу мишева, већи број ћелија експримира *MHC* молекуле II класе и да је интензитет експресије снажнији (слика 4.10).



Слика 4.10. Експресија *MHC* молекула II класе у слезини мишева: имунопероксидазно бојење (а) мишева са ЕАЕ, који је индукован MOG_{35-55} пептидом и (б) контролне (IC) групе мишева. Увећање објектива 10x. Стрелицом су означене ретке *MHC* II позитивне ћелије.

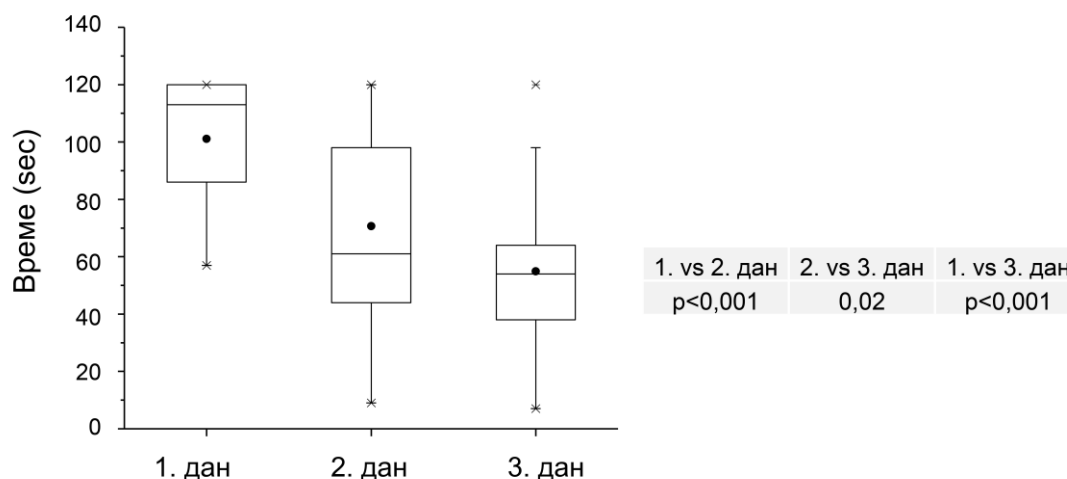
4.1.7. Утицај вакцине против грипа на просторно учење и памћење

- *MWM* тест

Стандардни *MWM* тест је коришћен за процену способности просторног учења мишева. Овај тест је подразумева да миш након спуштања у базен, нађе платформу која је зароњена у воду, тј невидљива, да би уз помоћ спољних оријентира изашао из воде. Когнитивна дисфункција процењује се на основу смањене способности учења и позивања меморије код миша, а што се огледа као продужавање потребног времена да нађе платформу.

4.1.7.1. Способност учења мишева у прва 3 дана експеримента, пре вакцинације

Пре имунизације вакцином против грипа, способност учења свих 40 мишева укључених у експеримент је праћена MWM тестом, у трајању од три дана. Сви мишеви укључени у експеримент су за ова три дана скратили време потребно за извршење задатка, тј. налажења платформе (слика 4.11, прилог 3). Ово је указало да код ове групе од 40 мишева није постојала видљива неспособност учења која би се огледала у немогућности савладавања теста, и сви мишеви су остали укључени у даљи експеримент.



Слика 4.11. Промена времена налажења платформе у MWM тесту у тродневном блоку тренирања мишева пре вакцинације против грипа.

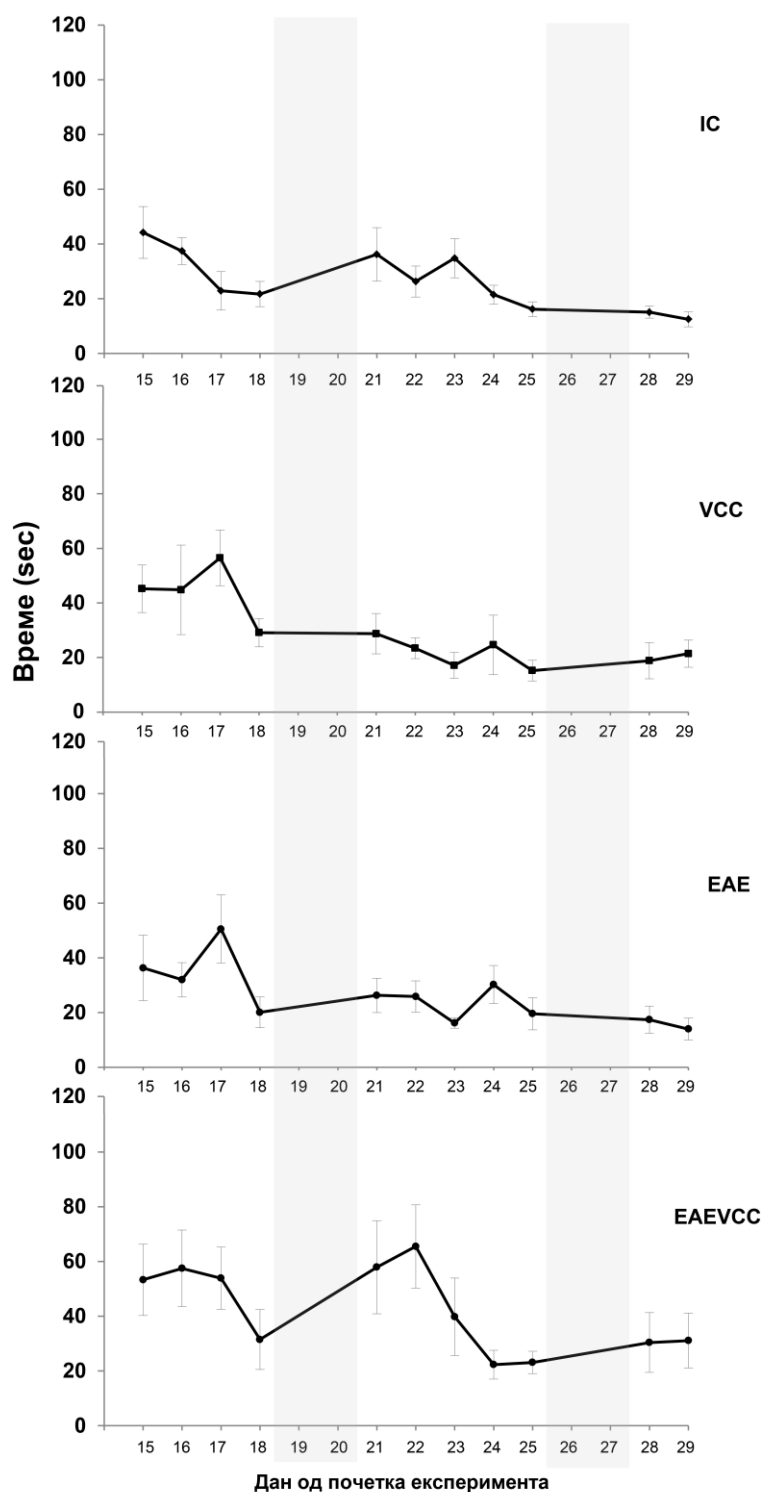
4.1.7.2. Праћење времена потребног за извршење задатка у MWM тесту са појавом клиничких знакова ЕАЕ.

С обзиром да смо клиничке знаке ЕАЕ пратили од 8. дана од индукције ЕАЕ (15. дан експеримента) па све до краја експеримента (слика 4.1), за тај временски период смо такође приказали и промене у времену извршавања задатка у MWM тесту (слика 4.12, прилози 4 и 5).

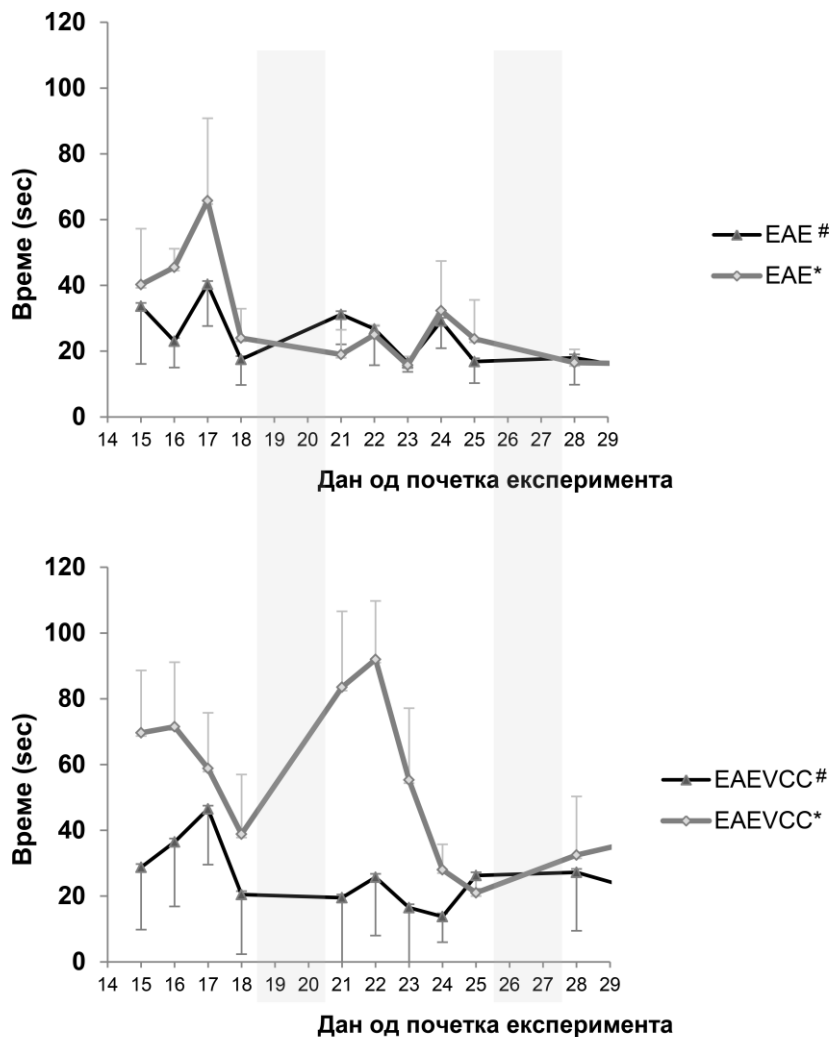
За групу контролних мишева (IC) значајно скраћење времена налажења платформе је детектовано 17. дана експеримента. За све остале третиране групе

мишева (VCC, EAE и EAEVCC) скраћење времена налажења платформе је детектовано дан касније тј. 18. дана експеримента. Код мишева IC, после паузе у извођењу теста, од 21. до 23. дана експеримента детектује се благи пораст у времену потребном за налажење платформе, да би се од 24. дана то време скратило и усталило до краја експеримента. Сличан тренд у времену потребном за налажење платформе су показали и мишеви VCC и EAE групе. Мишеви EAEVCC групе су одступали од овог тренда у промени времена налажења платформе. Код њих је пораст времена потребног да се нађе платформа био изражен после прве паузе у извођењу теста (између 18. и 21. дана), али се и код ове групе мишева 24. дана време скратило. Међутим после друге паузе (од 25. до 28. дана) опет се јавља пораст али доста блажи него после прве паузе.

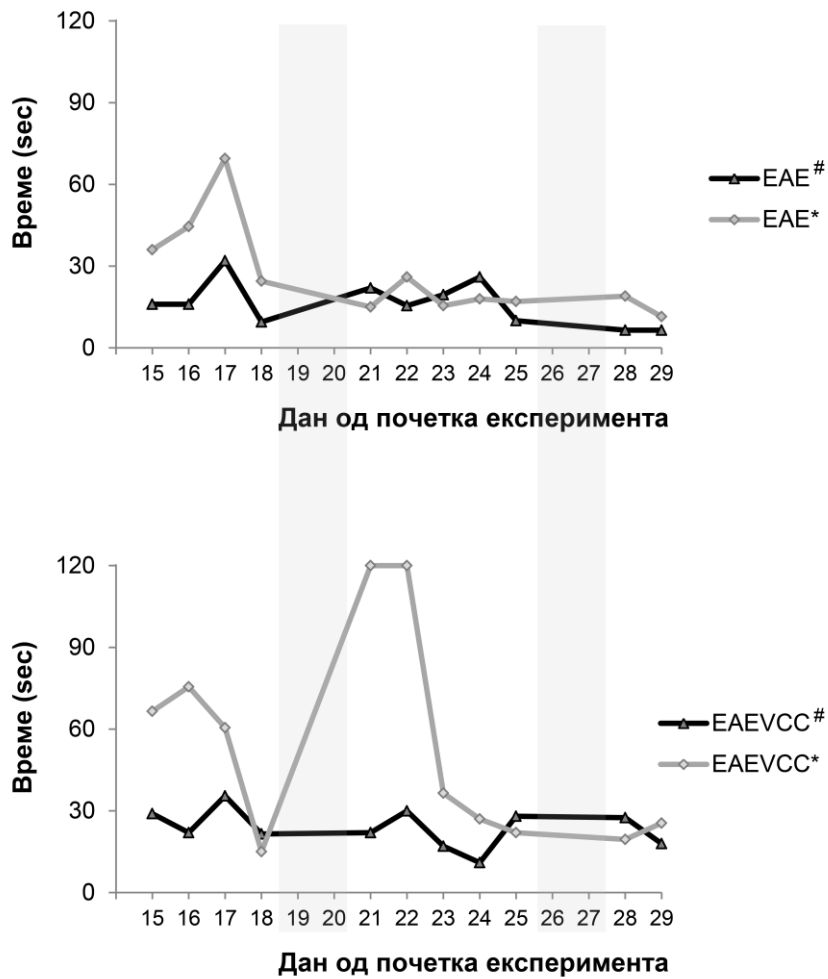
Због постојања великих индивидуалних варијација унутар EAE и EAEVCC група направљена је нова подела на основу присутних или одсутних клиничких знакова EAE код мишева из ових група: мишеви код којих се нису развили клинички знаци (EAE# и EAEVCC# групе) и мишеви код којих су се развили клинички знаци (EAE* и EAEVCC* групе). Резултати за овако формиране групе (средње вредност \pm стандардна грешка и медијана) приказани су на сликама 4.13, 4.14 и 4.15. На основу ових резултата се види да је пораст у времену налажења платформе (од 15. до 17. дана експеримента) постојао само код мишева који су развили клиничке знаке тј. код EAE* и EAEVCC* групе. Пораст времена детектован од 21. до 24. дана у целој EAEVCC (слика 4.12) је заправо био резултат пораста времена само код оних мишева који су развили клиничке знаке (EAEVCC*). Благи пораст времена (на граници статистичке значајности) који је детектован 29. дана експеримента за целу EAEVCC групу је такође био последица пораста времена само код оних мишева који су развили клиничке знаке (EAEVCC*).



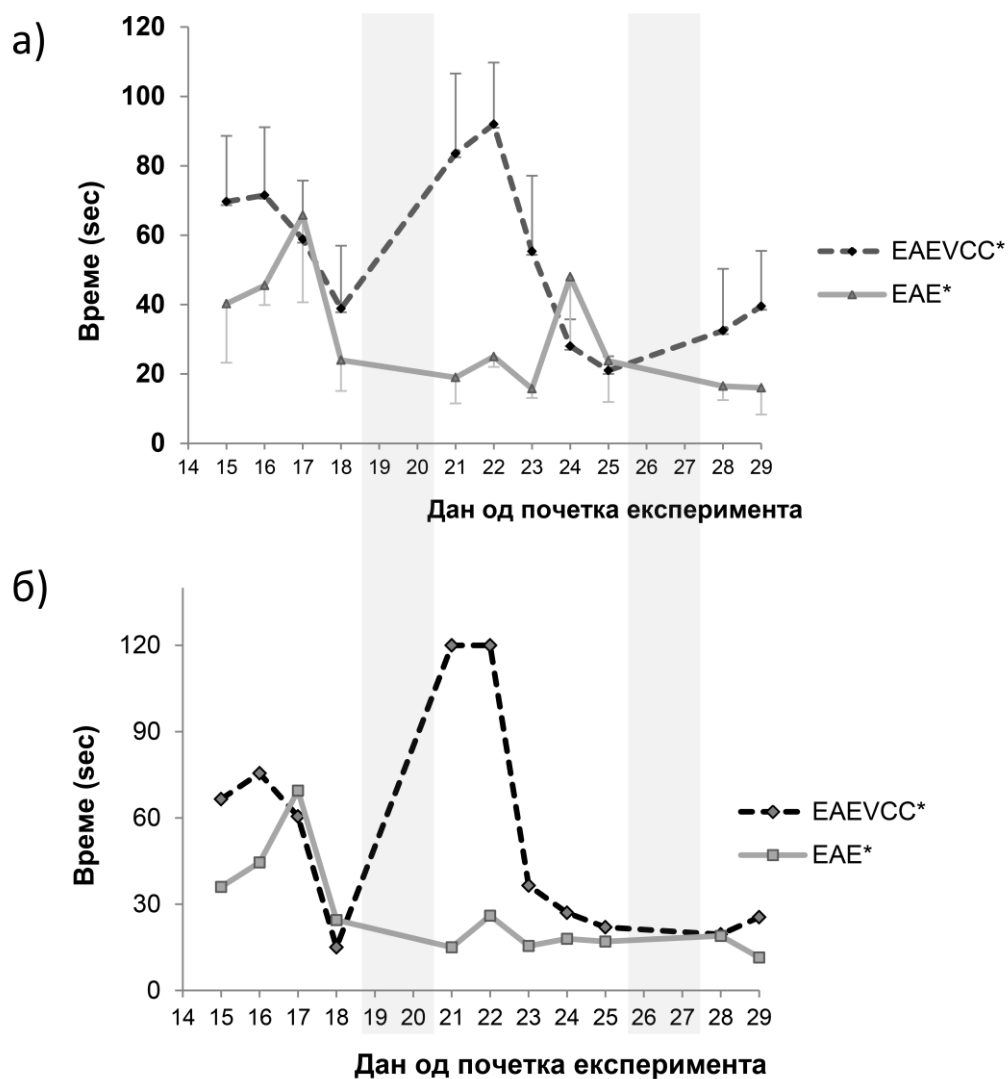
Слика 4.12. Праћење времена налажења платформе у MWM тесту од 15. до 29. дана експеримента, у периоду када је праћен и развој клиничких знакова EAE. Резултати су приказани као $\bar{x} \pm SE$ за сваку групу мишева: контролна група (IC), мишеви који су примили вакцину против грипа (VCC), мишеви код којих је индукован EAE (EAE), мишеви који су примили вакцину против грипа и код којих је индукован EAE (EAEVCC). Засенчено су означени дани када мишеви нису тестирани.



Слика 4.13. Праћење времена налажења платформе у MWM тесту од 15. до 29. дана експеримента, у периоду када је праћен и развој клиничких знакова EAE. Резултати су приказани као $\bar{x} \pm SE$ за групе мишева код којих је индукован EAE али нису развили клиничке знаке (EAE[#]), код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAE^{*}), који су примили вакцину против грипа и код којих је индукован EAE али нису развили клиничке знаке (EAEVCC[#]) и који су примили вакцину против грипа, код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAEVCC^{*}). Засенчено су означени дани када мишеви нису тестирани.



Слика 4.14. Праћење времена налажења платформе у MWM тесту од 15. до 29. дана експеримента, у периоду када је праћен и развој клиничких знакова EAE. Резултати су приказани као медијана за групе мишева код којих је индукован EAE али нису развили клиничке знаке (EAE[#]), код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAE^{*}), који су примили вакцину против грипа и код којих је индукован EAE али нису развили клиничке знаке (EAEVCC[#]) и који су примили вакцину против грипа, код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAEVCC^{*}). Засенчено су означени дани када мишеви нису тестирани.

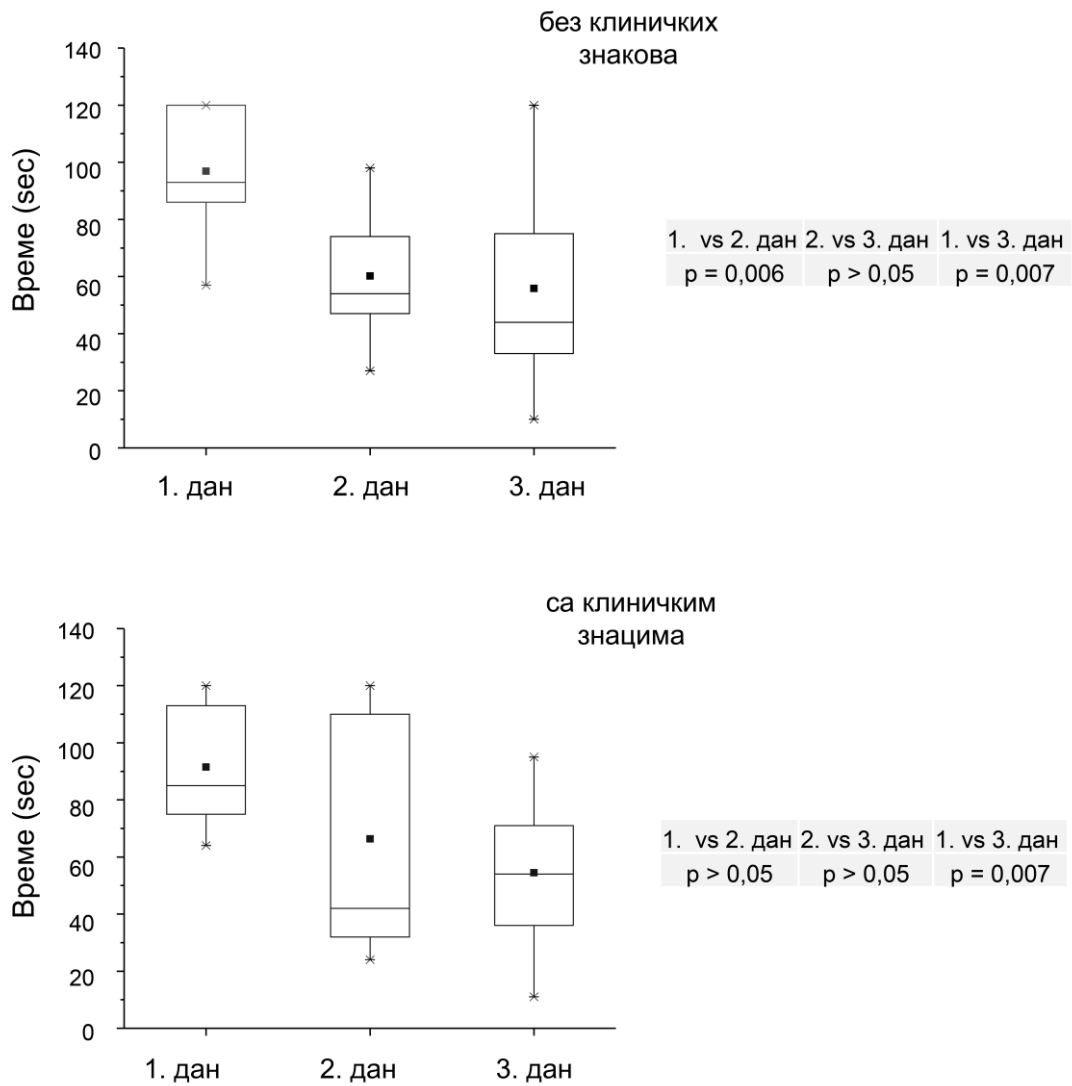


Слика 4.15. Праћење времена налажења платформе у MWM тесту од 15. до 29. дана експеримента, у периоду када је праћен и развој клиничких знакова EAE. Резултати су приказани као (а) $\bar{x} \pm SE$ и (б) медијана за групу мишева код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAE*) и групу мишева који су примили вакцину против грипа, код којих је индукован EAE и који су развили клиничке знаке (EAEVCC*). Засенчено су означени дани када мишеви нису тестирани.

4.1.7.3. Резултати ретроградне анализе за прва три дана експеримента за мишеве са индукованим ЕАЕ

С обзиром на велике разлике у времену налажења платформе који су показали мишеви код којих је индукован ЕАЕ зависно од тога да ли су развили или нису развили клиничке знаке проверили смо да ли је код ових мишева у периоду учења (прва три дана експеримента, пре почетка имунизације вакцином против грипа) постојала разлика у брзини решавања теста.

Резултати приказани на слици 4.16. и у прилогу 6 показују да је код групе мишева који су 8. дана имунизовани MOG_{35-55} пептидом али нису развили клиничке знаке ЕАЕ постојао континуирани напредак у учењу. Код групе која је развила клиничке знаке ЕАЕ, значајан напредак у учењу се показао тек трећег дана.



Слика 4.16. Ретроградна анализа способности учења током прва три дана експеримента (изражена као промена времена налажења платформе у MWM тесту) код мишева код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕVCC група) и који нису развили клиничке знаке (без клиничких знакова) и код мишева којима је индукован ЕАЕ и који су развили клиничке знаке (са клиничким знацима).

4.2. **Pertussis вакцина и индукција ЕАЕ код C57BL/6 мишева**

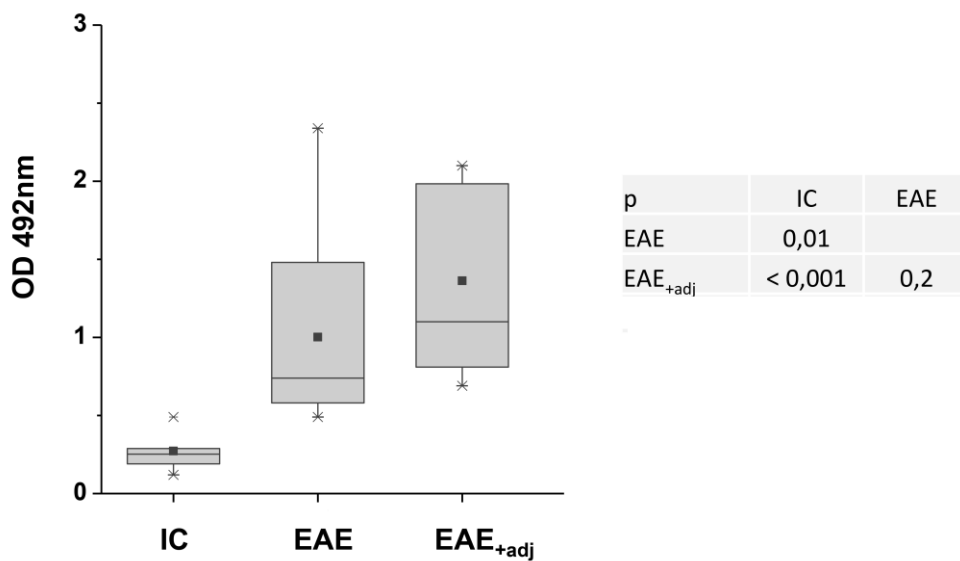
Bordetella pertussis вакцина (*pertussis* токсин) је у претходној групи експеримената коришћена као адјуванс за изазивање ЕАЕ (поглавље 4.1). Следећи експерименти су урађени са циљем утврђивања утицаја различитих доза *pertussis* вакцине на развој ЕАЕ код мишева којима је ЕАЕ индукован хомогенатом кичмене мождине. Мишеви су подељени у 4 групе: ЕАЕ, имунизовани само хомогенатом кичмене мождине мишева у СФА; ЕАЕ_{+adj}, имунизовани хомогенатом кичмене мождине мишева и адјувантном дозом *B. pertussis*; ЕАЕ_{+conc} имунизовани хомогенатом кичмене мождине мишева и концентрованој дозом (еквивалентом хумане дозе) *B. pertussis* вакцине и ИС, нетретирани мишеви – интактна контрола.

4.2.1. **Клинички скор – моторна функција**

Мишеви су праћени дневно почев од 7. дана од имунизације хомогенатом кичмене мождине. Код мишева из ЕАЕ и ЕАЕ_{+adj} први благи клинички знаци, запажени као парцијално снижење тонуса мишића репа (оцена 0.5), појављују се 20. дана од индукције ЕАЕ, и даље не прогредирају до тежих облика. Код ЕАЕ_{+conc} групе проблеми са задњим ногама јављају се већ после примене поновљене дозе *B. pertussis*, а 13. дана мишеви из ове групе су постали тургидни што је и резултирало леталним исходом код 8 мишева.

4.2.2. **Титар серумских анти - MOG антитела**

Статистички значајно повећан титар анти-MOG антитела, у односу на контролну групу мишева, је детектован код група код којих је индукован ЕАЕ и у којима није дошло до леталног исхода (ЕАЕ и ЕАЕ_{+adj}) (слика 4.17, прилог 7). Код ЕАЕ_{+conc} групе мишева број преживелих је био недовољан за статистичку анализу, али је и код њих титар анти-MOG антитела био висок (прилог 7).

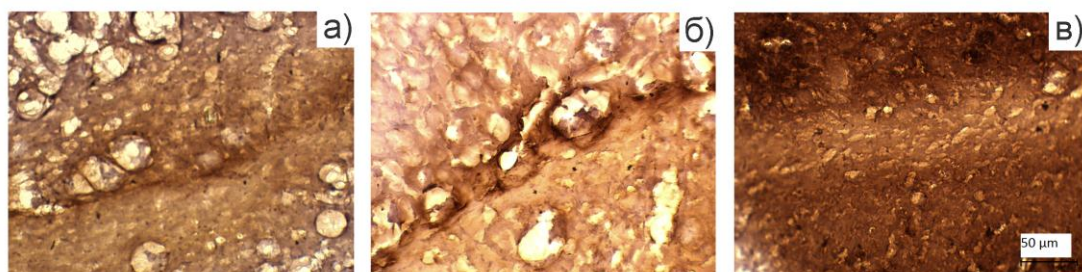


Слика 4.17. Титар анти-MOG антитела у серумима испитиваних група мишева: IC, EAE, и EAE_{+adj}. Резултати T-теста којим је одређена значајност разлике у титрима антитела између испитиваних група приказани су у табели поред слике. ns – разлика није статистички значајна, $p > 0,05$.

4.2.3. Хистолошка анализа хипокампадне регије

4.2.3.1. Детекција MOG антигена

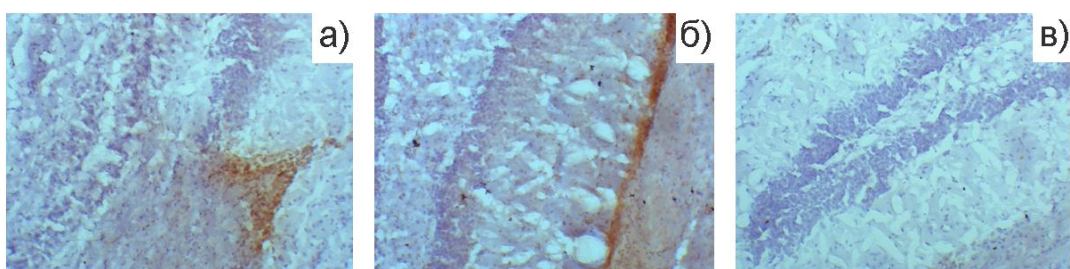
Имунопероксидазним бојењем показана је реактивност са моноклонским анти-MOG антителом у хипокампадној регији EAE и EAE_{+adj} групе мишева (слика 4.18).



Слика 4.18. Присуство MOG антигена у хипокампадној регији. Имунопероксидазно бојење (а) EAE, мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине, (б) EAE_{+adj}, мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине и адјувантном дозом *B. Pertussis* и (в) IC, интактна контрола, нетретирани мишеви.

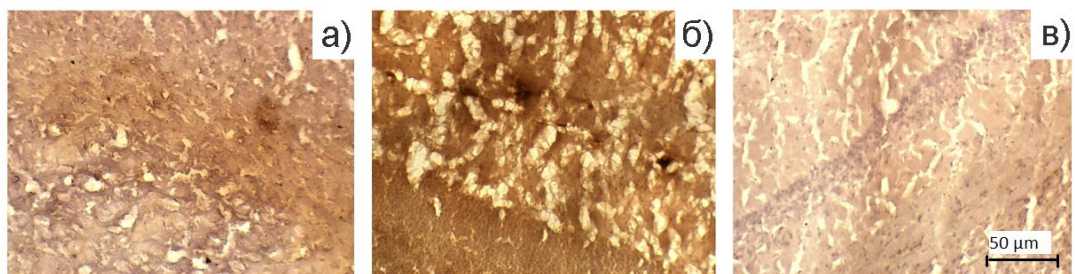
4.2.3.2. Експресија *MHC* молекула I и II класе

У хипокампадној регији контролне групе мишева (IC) имунопероксидазним бојењем није детектовано присуство *MHC* II позитивних ћелија (слика 4.19в). Бројне и изразито обојене *MHC* II позитивне ћелије су детектоване код обе групе код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕ_{+adj}) (слика 4.19а,б).



Слика 4.19. Експресија *MHC* II молекула у хипокампадној регији. Имунопероксидазно бојење (а) ЕАЕ, мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине, (б) ЕАЕ_{+adj}, мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине и адјувантном дозом *B. Pertussis* и (в) IC, интактна контрола нетретирани мишеви.

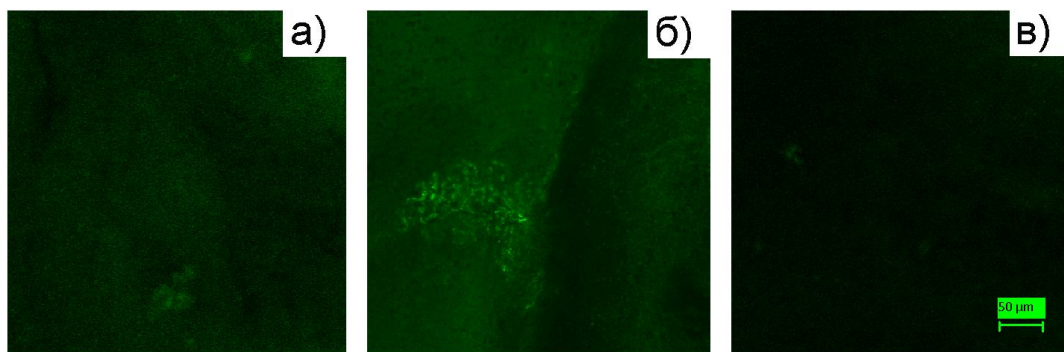
Истим типом имунохистохемијског бојења експресија *MHC* I молекула се видела као блажа и разубеђена позитивност код обе групе мишева код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕ_{+adj}) (слика 4.20а,б). Интензитет обојености код ових група је био сличан. Ретке *MHC* I позитивне ћелије су се могле уочити код контролне групе (IC) (слика 4.20в).



Слика 4.20. Експресија *MHC* I молекула у хипокампадној регији. Имунопероксидазно бојење (а) ЕАЕ мишева имунизовани хомогенатом кичмене мождине. (б) ЕАЕ_{+adj}, мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине и адјувантном дозом *B. Pertussis* и (в) IC, интактна контрола, нетретирани мишеви.

4.2.3.3. Експресија CD4 молекула

Експресија CD4 молекула у хипокампадној регији мозга мишева детектована је на основу реактивности са анти-CD4 моноклонским антителом и визуелизована имунофлуоресцентним бојењем и конфокалном микроскопијом. CD4 молекула је детектован код обе групе мишева са индукованим ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕ_{+adj}) (слика 4.21а,б). Ретке CD4 позитивне ћелије уочене су и код контролне групе (IC) (слика 4.21в).



Слика 4.21. Експресија CD4 молекула у хипокампадној регији. Имунофлуоресцентно бојење (а) ЕАЕ мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине, (б) ЕАЕ_{+adj} мишева имунизованих хомогенатом кичмене мождине и адјувантном дозом *B. Pertussis*, и (в) IC, интактна контрола, нетретирани мишеви.

5. ДИСКУСИЈА

5.1 Ефекат инактивисане вакцине против грипа на C57BL/6 мишеве са ЕАЕ индукованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом

Питање повезаности између примене савремених вакцина и настанка и одржања аутоимунских болести је веома актуелно и ова докторска дисертација се бави праћењем ефеката примене вакцине против грипа (вируса инфлуенце) на развој или погоршање знакова МС као демијелизационе болести централног нервног система. ЕАЕ најчешће је коришћен животињски модел за праћење МС који показује многе заједничке клиничке и патофизиолошке карактеристике са хуманом МС. Погодност животињског модела за развој ЕАЕ зависи и од изабраног антигена као и од врсте животиње. У овој студији смо користили иначе најчешће употребљаван сој мишева, C57BL/6, за који је познато да даје добар одговор на антигену стимулацију антигенима MOG протеина (Bittner и сар., 2014). У основном протоколу за индукцију ЕАЕ се користи једна доза од 200 µg MOG₃₅₋₅₅ пептида за имунизацију C57BL/6 мишева (Miller и сар., 2007). Овако индукована ЕАЕ се обично манифестује као хронична болест (Tompkins и сар., 2002) и са средњим клиничким скором од 1,5 (Montero и сар., 2004). У групи експеримената у којој је током рада на овој дисертацији испитиван утицај вакцине против вируса грипа код мишева код којих је након примања вакцине индукован ЕАЕ, ЕАЕ је индукован једном дозом од 100 µg MOG₃₅₋₅₅ у CFA, а као адјуванс уместо pertussis токсина коришћена је pertussis вакцина (модификована метода, Kuerten и сар., 2007). Сматрамо да је овакав измењен протокол имунизације могао да буде разлог за блажи ток болести који је доминирао клиничком сликом код мишева у нашој студији. Иако клинички знаци обољења нису били изражени код група са индукованим ЕАЕ, ипак је код мишева код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ, ЕАЕVCC) детектована значајно повећана продукција анти-MOG антитела и повећана експресија МНС молекула II класе у мозгу. Индивидуалне разлике у појављивању и у интензитету клиничких знакова обољења које су биле уочене унутар ЕАЕ група, како вакцинисаних тако и невакцинисаних јединки, могле

би бити објашњене интраиндивидуалном осетљивошћу мишева код којих је ЕАЕ индукован MOG_{35-55} пептидом, која постоји чак и код високо имбредних сојева експерименталних животиња. Значајно повећан титар анти-инфлуенца (анти-*HA*) антитела који је уочен после четири недеље од вакцинације против вируса грипа код вакцинисаних мишева и мишева којима је након вакцинације индукован ЕАЕ указују на постојање очуваног имунског одговора и код мишева код којих је био индукован ЕАЕ. У експериментима чији су резултати приказани у овом раду мишеви су били имунизовани једном дозом вакцине против грипа (*split virion*) која је садржала 15 μg *HA*. У неколико студија (Cox и сар., 2004; Novden и сар., 2005) показано је да *split* вакцине у дозама већим од 7,5 μg *HA* значајније повећавају концентрацију антитела у серуму и са овим подацима су у складу и наши резултати. Сматрамо да је посебно значајан податак да је већи титар анти-инфлуенца антитела детектован код мишева код којих је након вакцинације против грипа индукован ЕАЕ (ЕАЕVCC) у односу на групу мишева који су само примили вакцину против грипа (VCC). Иако је поремећај у балансу имунског система код пацијената са МС евидентан, имунски одговор на уобичајене вирусне и бактеријске инфекције показује да он није нарушен, тако да стопа уобичајених инфективних болести није повишена код МС пацијената (Sibley и Foley 1965; Morris, 1985). Подаци из старијих као и новијих студија показују да је ниво пораста анти-инфлуенца антитела после вакцинације против грипа код МС пацијената сличан нивоу пораста ових антитела код здравих вакцинисаних особа, односно да се код обе групе региструје пораст титра анти-инфлуенца антитела од 2-4 пута (Sibley и Foley 1965; Moriabadi, 2001). С обзиром да се подаци из литературе односе на измерене вредности анти-инфлуенца антитела код пацијената са МС, на исти начин би било могуће објаснити повећање титра анти-инфлуенца антитела и на ЕАЕ моделу. Такође, не треба искључити ни могућност синергистичког ефекта вакцине против грипа и MOG пептида на активацију хуморалног имунског одговора.

У нашој студији детектовали смо присуство анти- MOG реактивности IgG антитела и у серумима код мишева код којих није индукован ЕАЕ (контролни мишеви, IC, и мишеви вакцинисани против грипа, VCC). Међутим

код обе групе мишава код којих је индукован ЕАЕ (ЕАЕ и ЕАЕVСС) ниво анти-MOG антитела је био вишеструко повећан. Аутоимуност на MOG је део природног аутоимунског репертоара C57BL/6 мишева, с обзиром да се код њих IgG анти-MOG антитела природно стварају, независно од развоја ЕАЕ, и да то заправо може да буде разлог „способности“ овог соја мишева да развије ЕАЕ када се имунизација врши MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Quintana и Cohen, 2001). Резултати анализе профила реактивних аутоантитела IgM класе које су добили Mouthon и сарадници (1995) на протеине мишића, јетре, плућа, мозга и тимуса добијени у пулу серума C57BL/6 мишева старих једну и осам недеља показали су да је код одраслих јединки очуван оригинални аутореактивни репертоар који постоји и код новорођених јединки, што би могло да укаже на синтезу аутоантитела независну од стимулације спољашњим антигеном. Quintana и Cohen (2001) су такође детектовали анти-MOG антитела у серуму мишева код којих није био индукован ЕАЕ а што је подударно са нашим резултатима. Иако су подаци из литературе о учешћу *B* лимфоцита, плазма ћелија и антитела у развоју МС недвосмислени и јасни, резултати о њиховој улози у патогенези демиелинизационе болести добијени на ЕАЕ моделу остају и даље контрадикторни (Sekiguchi и сар., 2009; Lyons и сар., 1999, 2002; Lalive и сар., 2011). Tjalf и Focke Ziemssen су у свом раду из 2005., навели и своје непубликоване резултате у којима су показали, користећи ЕАЕ модел, да анти-MOG антитела значајно утичу на повећање миграције макрофага и активацију резидентне микроглије у МС лезијама. Наши резултати показују, као што смо раније рекли, да чак ни значајан пораст анти-MOG антитела не мора да буде праћен израженим клиничким знацима обољења (ЕАЕ, ЕАЕVСС) што и даље указује на нејасну улогу анти-MOG антитела у патогенези болести. Показано је такође у неким студијама на ЕАЕ моделу код којих је коришћен MOG пептид да присуство *B* лимфоцита или антитела није неопходно за индукцију ЕАЕ или демиелинизацију. Са друге стране изгледа да је за индукцију ЕАЕ целим MOG протеином, присуство *B* лимфоцита неизбежно (Wolf и сар. 1996; Lyons и сар., 1999, 2002). Иако постоји веза између титра овог антитела у серуму и активности болести она није директна (Paterson и сар., 1981; Linington и Lassmann, 1987) а само њихово присуство није довољно да утиче на интензитет

болести (Ichikawa и сар., 1996). У сваком случају новији подаци указују на комплексност хуморалног имунског система чија улога у патогенези, регулацији и репарацији ткива у МС је већ описана (Ziemssen и Ziemssen; 2005).

МС се примарно сматра обољењем у којем се имунски одговор на антигене одвија уз присуство *MHC* молекула II класе (Fabrick и сар., 2005) мада механизам који је посредован *MHC* молекулима класе I добија све више на значају (Wingerchuk и сар., 2001). Да Th1 модел објашњава само неке од имунолошких и патолошких карактеристика МС показује присуство већег броја CD8+/*MHC* I лимфоцита у активним демиелинизационим лезијама у односу на број CD4+ лимфоцита (CD4+ фенотип преобладава у периваскуларном простору) и да могу да играју важну улогу у патогенези МС (Vabbe и сар. 2000; Höftberger и сар., 2004). Показано је на моделу пацова и да анатомски одвојени делови мозга као што су мождано стабло и хипокампус, који имају веома различито неурорегулаторно окружење, могу да покажу локално различите модулације експресије *MHC* молекула II класе. Тако мождано стабло у поређењу са хипокампусом као и са другим деловима мозга, где су се могле видети модулације *MHC* молекула II класе специфичне за те локације, показује повећану експресију ових молекула већ при малим дозама IFN- γ који је аплициран интравентрикуларно. Ово би могло да значи да локално неурорегулаторно окружење може да има значај у дистрибуцији патолошких промена (плакова) као што је случај у МС (Phillips и сар., 1999). На нашим пресецима хипокампадне регије мозга обојеним хематоксилин-еозином уочене су лезије мањег обима код ЕАЕ и ЕАЕVCC група. Поред модулације експресије *MHC* молекула II класе условљена локалним неурорегулаторним окружењем у хипокампусу, још једно од објашњења (добијених на ЕАЕ моделу) би могло да буде управо слаба експресија *MHC* I класе молекула, самим тим и изостанак одговора CD8+/*MHC* I лимфоцита, који изгледа да могу бити укључени и у развој саме клиничке болести и оштећења ткива (Sun и сар., 2001). Иначе слабо обојене и ретке *MHC* I позитивне ћелије детектовали смо имунопероксидазним бојењем хороидног плексуса и код мишева код којих је само индукован ЕАЕ (ЕАЕ група) и мишева код којих је ЕАЕ индукован након

вакцинације против грипа (EAEVCC група). Ово би код EAEVCC групе са своје стране могло да се допуни податком да је могуће да вируси избегну контроли имунског система у мозгу и да иако су присутни не долази до индукције експресије *MHC I* молекула на неуронима (нпр. *girus dentatus* хипокампуса) или ћелијама неуронског типа као што су епителне ћелије хороидног плексуса (Joly и сар. 1991; Oldstone и сар, 1997; Irwin и сар., 1999). Само врло ретке *MHC I* позитивне ћелије су се могле видети код вакцинисаних (VCC) и код контролне (IC) групе.

Запажено је да ниво експресије и *MHC I* и *MHC II* молекула може да зависи и од фазе експеримента у којој се посматра. Типично је за ЕАЕ да се знаци болести јаве између 9. и 14. дана после имунизације и да се плато постигне за 3 до 5 дана од почетка јављања клиничких знакова код сваког миша. На овом нивоу се одржава 1 до 3 дана а затим наступа постепени опоравак (Miller и сар., 2007). Almolda и сарадници (2010) су на ЕАЕ моделу, анализом пресека кичмене мождине, показали повећану активност микроглије (повећана експресија *MHC I* и *II* молекула) током индуктивне фазе као и у фази опоравка, где уз учешће различитих костимулаторних молекула и њихових рецептора (CTLA-4; B7.2) у фази опоравка микроглија инхибише активност лимфоцита, активира Трег лимфоците и на тај начин промовише имунолошку толеранцију. Ово може да буде једно од објашњења за: 1) значајну експресију *MHC* молекула II класе у хороидном плексусу код ЕАЕ и EAEVCC група 24. дана од индукције ЕАЕ, 2) лезије у хипокампусу које нису великог обима и 3) клиничке знаке релативно ниског укупног скорa. Резултати две студије (McMenamin, 1999; McMenamin и сар., 2003) показују да се у фиброваскуларној строми хороидног плексуса налазе и ћелије које припадају моноцитно-макрофагној лози (макрофаги и дендритичне ћелије), које експримирају *MHC* молекуле II класе, и указују на заправо идеалну позицију ових ћелија за захватање антигена из цереброспиналне течности, било да су егзогеног (бактерије, вируси) или ендогеног (нпр. мијело-базни протеин) порекла. Све ово употпуњује значај хороидног плексуса у иначе већ широком дијапазону његових улога у процесима успостављања, надзирања и одржавања биохемијског и ћелијског статуса ЦНС-а, како у нормалним тако и у

патолошким условима.

Иако смо имунопероксидазним бојењем и код мишева код којих је индукован ЕАЕ и код мишева код којих је ЕАЕ индукован након вакцинације против грипа показали значајну експресију *MHC* молекула II класе, имунофлуоресцентно бојење визуелизовано конфокалном микроскопијом је ипак указало на разлике у интензитету експресије *MHC* II молекула, и показало да је тај интензитет био јачи код ЕАЕVCC у односу на ЕАЕ групу. Познато је да *Bordetella pertussis* повећава пропустљивост крвно-мождане баријере омогућавајући улазак имуских ћелија у централни нервни систем (Brückener и сар., 2003), а Amiel (1976) објашњава да треба да претходно постоји инфламаторни одговор, у овом случају ЕАЕ, на изазвану лезију да би *B. pertussis* значајније утицала на повећање пермеабилности крвних судова. Иако *pertussis* токсин не утиче на функцију баријере хороидног плексуса, хороидни плексус је повезан са крвно-можданом баријером тако што формира крвно-ликворну баријеру. Ова повећана пропустљивост би могла да, поред МОГ антигена, олакша и улазак и антигена вируса грипа што би могло да објасни повећану експресију *MHC* II молекула код ЕАЕ-вакцинисане групе мишева у односу на ЕАЕ. Потребно је нагласити да ова повећана експресија није допринела увећању укупног клиничког скорa, тј. тежине болести.

Показано је да експресија *MHC* II молекула у мононуклеарним ћелијама које инфилтрирају хороидни плексус код мишева инфицираних неуротропним вирусом беснила (авирулентни вирус) достиже максималан ниво 8. дана од имунизације а затим постепено опада, и може се још увек детектовати 20. дана (Irwin и сар., 1999). С обзиром да су неки од сојева вируса грипа доказано неуротропни, на овај начин би могла да се објасни слаба експресија *MHC* II молекула 28. дана од вакцинације вирусом против грипа код групе мишева која је била само вакцинисана (VCC).

МС утиче на моторне и сензорне функције, затим на понашање као и на когнитивне функције (Chiaravalloti и сар., 2008). Студије са људима и на анималним моделима су указале на важну улогу хипокампуса за просторно учење (Abrahams и сар., 1997; Pouzet и сар., 2002). Познато је да је појава лезија у хипокампусу током развоја ЕАЕ у блиској вези са погоршањем способности

учења, памћења и просторне оријентације. Logue и сарадници (1997) су демонстрирали да C57BL/6 и DBA/2 сојеви мишева користе хипокампус за извођење задатка који *MWM* тест поставља као услов, и који је идентификован као хипокампус-зависан тест. Један део нашег експеримента се односио на праћење ефеката примене вакцине против грипа у смислу губитка меморије и појаве као и прогресије моторне дисфункције код C57BL/6 мишева употребом *MWM* теста. Иако озбиљни нежељени ефекти после примене вакцине против грипа код људи нису уобичајени, појава појачане осетљивости на месту убода се често може видети. Могуће је такође да се јави бол у мишићима, грозница и осећај нелагодности (Nichol и сар., 1996). Нежељени ефекти било да су у питању локалне промене, на месту где је извршена вакцинација, или генерализоване промене које би се одразиле на активност мишева у нашем експерименту, а који су могли бити потенцијални узрок моторне дисфункције и тако утицати на резултат током извођења задатка мишева укључених у *MWM* тест, нису били уочени. Сви мишеви који су били укључени у *MWM* тест су у прва три дана учења, пре спроведене вакцинације против грипа, показали у укупном резултату статистички значајну способност учења. Мишеви су затим подељени у четири групе (EAE, EAEVCC, VCC и IC) и после спроведене вакцинације и индукције EAE, од 8. дана од индукције EAE (15. дан експеримента), када смо почели да пратимо и клиничке знаке, па све до краја експеримента праћене су и промене у извршавању задатка у *MWM* тесту. Тренд скраћења времена у налажењу платформе се запажа код свих група с тим што се статистички значајно скраћење времена бележи 17. дана код нетретираних, а 18. дана код осталих група (EAE, EAEVCC и VCC). Благи пораст у времену потребном за налажење платформе се бележи после прве паузе у извођењу теста од 21. до 23. дана код нетретиране групе. Од 24. дана до краја експеримента време се скратило и остаје устаљено до краја експеримента. Сличан тренд је постојао и код вакцинисаних мишева и мишева EAE групе. Код мишева из групе EAEVCC постоји значајно одступање од овог тренда, а које се огледало у продуженом времену налажења платформе одмах после прве паузе између 18. и 21. дана. Ипак, и код ове групе мишева се време налажења платформе скратило до краја експеримента. Клинички знаци у виду сниженог

тонуса мишића репа су се јавили код 50 % мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (EAE, EAЕVСС). С обзиром на постојање интраиндивидуалних разлика унутар EAE и EAЕVСС група направљена је нова подела на основу присутних или одсутних клиничких знакова EAE. Оваква подела је показала да су за продужење времена у укупном резултату за дату групу били одговорни мишеви који су развили клиничке знаке EAE. За благи пораст времена 29. дана експеримента за целу EAЕVСС групу које је било на граници статистичке значајности су такође били одговорни мишеви са присутним клиничким знацима. Тренд скраћења времена потребног за налажење платформе уз краћа транзиторна погоршања је карактеристика мишева у све четири групе. Између мишева EAE групе са клиничким знацима и мишева EAЕVСС групе са клиничким знацима разлика која је била близу статистичке значајности се појавила 21. дана, после паузе у извођењу теста, а статистички значајна разлика се појавила само 22. дана. Урађена је ретроградна анализа да би се видело да ли су мишеви који су у току експеримента развили клиничке знаке били и у прва три дана учења, пре почетка имунизације вакцином против грипа, спорији у извршавању задатка. Овом анализом је показано да се напредак у учењу ових мишева јавио тек трећег дана, за разлику од мишева који нису развили клиничке знаке обољења код којих је напредак у учењу био континуиран. Sun и сарадници (1998) су код пацијената са дијагностикованим МС у поређењу са здравим контролама установили постојање генералног снижења церебралног метаболизма; церебралне циркулације и искористљивости кисеоника у сивој и белој маси. Ово снижење метаболизма је могло да укаже да функционалне промене кортекса не морају да буду узроковане само лезијама у белој маси већ да могу бити и последица функционалних промена у белој маси тј. без видљивих оштећења. Још увек је мали број студија које говоре у прилог постојања везе између података који се односе на функционалне догађаје и когниитивних функција. Ово запажање је делимично било подржано и од других аутора (Husted и сар., 1994) који су указали на биохемијске промене у МС лезијама, а без видљивих оштећења беле масе. Овај ефекат је био израженији код пацијената са очекивано сниженом интелигенцијом која је узрокована деменцијом. Иако се ове студије односе на

МС код људи, могле би да послуже као основа за објашњење зашто су мишеви који су касније развили клиничке знаке показали спорост у учењу и пре почетка имунизације. Данас се такође фокус са физичког помера више у правцу потенцијалног побољшања менталног здравља или одржавања когнитивних функција што треба да обезбеди бољи квалитет живота (Sharma и сар., 2010).

Зашто сви мишеви истог инбредног соја не развију исте клиничке манифестације и зашто прогресија болести није иста, није познато (Costa и сар., 2003). У сваком случају ЕАЕ карактеристике и јачина експресије болести су под контролом неколико генских локуса (Encinas и сар. 1996; Encinas и сар., 2001). До данас је идентификовано 16 региона мишјег генома који учествују у контроли ЕАЕ (Butterfield и сар., 2000). Сугерише се да спољна средина може више од генетске предиспозиције да утиче на хетерогеност ЕАЕ форми код генетски идентичних мишева (Costa и сар., 2003). Важно је узети у обзир и чињеницу да на процену очуваности когнитивних функција код експерименталних животиња може да утиче и стрес изазван пливањем или другим факторима који долазе из спољашње средине што доводи до њиховог кочења и одлагања извршавања задатка (D'Hooge и De Deyn, 2001; Holscher, 1999).

Дендритичне ћелије су најснажније антиген-презентујуће ћелије које једине могу да презентују антигене „naive“ Т лимфоцитима и да на тај начин иницирају Т зависни имунски одговор (Steinman, 1991). Акумулација дендритичних антиген-презентујућих ћелија у ЦНС-у је несумњиво потврђена (Matyszak и Perry 1996; Serafini и сар. 2000; Suter и сар. 2000; Bailey и сар. 2007). Добро је познато да се активација Т лимфоцита дешава у лимфним чворовима у које дендритичне ћелије мигрирају након захватања антигена у периферним токовима и где, трансформисане у зреле интердигиталне ћелије, CD4⁺ Т лимфоцитима презентују антигене у форми комплекса антигених пептида и *MHC* молекула II класе. Потпуно у складу са овим „класичним“ начином активације је и чињеница да се у ЕАЕ моделу „naive“ Т лимфоцити са мијелинским антигенима срећу у периферним лимфним ткивима (Tomprkins и сар. 2002). Опет у складу са „класичним“ начином активације ћелија

адаптивног имунског одговора, су и наши резултати који су показали да се у одговору на субкутано аплициран MOG₃₅₋₅₅ пептид, у слезини мишева формирају герминативни центри. У њима се као резултат интеракције дендритичних ћелија, Th ћелија и B лимфоцита одиграва активација B лимфоцита, афинитетно сазревање њихових антигених рецептора и преуређење изотипа имуноглобулина (Abbas, 2013). У складу са оваквим класичним начином активације B лимфоцита су били и наши резултати који су показали да постоји позитивна корелација између формирања герминативних центара у периферним лимфним ткивима и високог титра анти-MOG специфичних IgG антитела у серуму мишева са ЕАЕ индукованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

Поред формирања герминативних центара чије присуство смо детектовали бојењем ткивних пресека слезине хематоксилин-еозином, имунопероксидазним бојењем смо детектовали значајно повећану експресију *MHC* молекула II класе у слезинама мишева са индукованим ЕАЕ. Конститутивна експресија *MHC* молекула II класе је особина три категорије „професионалних“ антиген-презентујућих ћелија: дендритичних ћелија, B лимфоцита и ћелија моноцитно-макрофагне лозе. У овом моменту не можемо да са сигурношћу закључимо која од ове три категорије ћелије је одговорна за детектовану повећану експресију *MHC* молекула II. Irla и сарадници (2010) су показали да постоји озбиљно погоршање клиничке слике ЕАЕ индукованог MOG₃₅₋₅₅ пептидом или рекомбинантним MOG протеином код мишева којима је експресија *MHC* II молекула на плазмоцитним дендритичним била онемогућена инактивацијом *MHC* II трансактиватор гена. Након индукције ЕАЕ, плазмоцитне дендритичне ћелије се акумулирају у секундарним лимфним органима где регулаторним CD4⁺ Т лимфоцитима презентују MOG пептиде у контексту *MHC* II молекула. Irla и сарадници (2010) сматрају да експресија *MHC* II молекула на плазмоцитним дендритичним ћелијама заправо представља природан механизам заштите од ЕАЕ јер стимулише селективну експанзију мијелин-специфичних природних регулаторних Т лимфоцита у периферним лимфним ткивима и на тај начин инхибирају „*priming*“ енцефалитогених Т лимфоцита. Исти аутори су показали да модулација експресије *MHC* II молекула на плазмоцитним дендритичним ћелијама нема

утицај на следећу, ефекторну фази која се дешава у ЦНС-у. На основу ових резултата смо и ми претпоставили да плазмоцитне дендритичне ћелије представљају везу између благих клиничких знакова ЕАЕ које смо детектовали у овом раду и експресије *MHC* молекула II класе у секундарним лимфним органима.

5.2. Pertussis вакцина и индукција ЕАЕ код C57BL/6 мишева

Иако је структура и функција *pertussis* токсина до сада темељно истраживана и токсин често коришћен у биохемијским и фармаколошким студијама, његова улога у настанку системских обољења још увек није у потпуности разјашњена, нарочито ако се *pertussis* токсин посматра као инструмент у развоју неуролошких компликација које се повремено јављају као секвеле *pertussis* обољења. Досадашња истраживања су указала, као што је и раније напоменуто, да у патогенези неуролошких поремећаја која су повезана са *pertussis*-ом, он учествује тако што нарушава интегритет мождане баријере (Brückener и сар., 2003). *Pertussis* токсин је често употребљаван у имунолошким студијама да потпомогне настајање аутоимунских болести код експерименталних животиња (Munoz 1985). ЕАЕ модел је широко прихваћен модел за праћење развоја МС (Brückener и сар., 2003). Базични протокол за активну индукцију ЕАЕ подразумева обавезну примену *pertussis* токсина заједно са хомогенатом кичмене мождине или мозга код генетски предиспонираних лабораторијских животиња, са интактним мијелобазним преотеином (МВР) или његовим имунодоминантним епитопом МВР₈₄₋₁₀₄ код SJL мишева као и за индукцију болести заједно са MOG₃₅₋₅₅ пептидом код C57BL/6 мишева (Miller и сар., 2007). Ћелијска *pertussis* вакцина (Pw) садржи активне резидуалне бактеријске токсине који посредују у одређеним неуролошким ефектима, а што је запажено после вакцинације, за разлику од ацелуларне *pertussis* вакцине (Pa) у којој постоји *pertussis* токсин као имуноген али је ослобођен од активног бактеријског токсина (Donnelly и сар., 2001). У овом делу експеримената је током рада на овој дисертацији на ЕАЕ моделу

испитиван утицај две различите дозе ћелијске *pertussis* вакцине, адјувантне доза (10^{10} *pertussis* микроорганизама у 0.3 ml) као и концентроване *pertussis* вакцине (4×10^{10} *pertussis* микроорганизама у 0.3 ml), на развој клиничких знакова, титар антитела и експресију CD4 и *MHC* молекула I и II класе у мозгу C57BL/6 мишева. Знајући да профилактичко вакцинисање деце против *pertussis*-а носи изванредан ризик од појаве неуролошких компликација Amiel (1976) је у својој студији на мишјем моделу испитивао ефекат примене једне као и две дозе *Bordetella pertussis* вакцине (4×10^{10} *pertussis* микроорганизама у 0.1 ml) на пермеабилност крвних судова мозга код здравих и код мишева са претходно ледираним мозгом (нпр. оштећења изазвана хлађењем). Летални исход је био забележен код појединих мишева код којих су пре третмана *pertussis* вакцином била изазвана цереброваскуларна оштећења. Забележено је и да није постојала статистичка значајност између примене једне или две (временски размак апликације 24 часа) дозе *pertussis* вакцине на летални исход мишева са претходно ледираним мозгом. Друга група аутора је запазила да примена ниже дозе пертусигена (хистамин-сензибилишући фактор) и имунизација хомогенатом кичмене мождине у истом дану доводи до тешке клиничке слике (између 11. и 13. дана) и високог степена смртности код мишева указујући да поред величине дозе, саме осетљивости појединих сојева мишева и време давања адјуванса значајно утиче на развој или ток болести (ЕАЕ) (Munoz и сар., 1984). Током нашег испитивања две различите дозе *pertussis* вакцине, примена концентроване вакцине интраперитонеално у два пута са размаком од 48 часова довела је одмах после примене друге дозе до парезе задњих екстремитета, а 13. дана од индукције ЕАЕ дошло је до леталног исхода осам од десет мишева (ЕАЕ_{екв}). Иако су у овој групи два миша преживела, овај број није био довољан за статистичку анализу добијених података. Иначе Lee и Olitsky (1955) су били први који су објавили да интраперитонеална примена *B. pertussis* појачава експресију ЕАЕ код мишева. Linthicum и сарадници (1982) су показали да је индекс васкуларне пермеабилности мозга и кичмене мождине мишева са развијеним ЕАЕ, после примљене две дозе ћелијске суспензије *B. pertussis* са размаком од 48 часова, 14. дана од сензибилизације хомогенатом кичмене мождине био скоро

двосртруко већи у поређењу са здравим мишевима. Исто тако запажено је да је индекс пермеабилности код мишева са ЕАЕ био већи него у случају третмана само са *B. pertussis*. Amiel (1976) објашњава да је потребно да постоји претходно инфламаторни одговор на изазвану лезију да би *B. pertussis* значајније утицала на повећање пермеабилности крвних судова. Интравенско убризгавање топлотом убијених 4×10^{10} *pertussis* микроорганизама изазива мерљив пораст у пермеабилности крвних судова у мозгу здравих мишева. За разлику од интравенског, за интраперитонеално убризгавање 4×10^{10} *B. pertussis* организама није показано да постиже овакав ефекат на пермеабилност крвних судова мозга здравих мишева (Amiel, 1976). Пут администрације као и временски размак давања *B. pertussis* после примене антигена (нпр. хомогенат кичмене мождине) може да утиче на интензитет развоја клиничких знакова и хистолошких промена код ЕАЕ. Тако се интравенско давање показало као најефектнији пут за постизање изражене клиничке слике и хистолошких промена код ЕАЕ у 100% тестираних животиња. За друге путеве администрације, интраперитонеално, интрамускуларно и субкутано, се показало да дају блажу клиничку слику у развоју ЕАЕ али да, и поред тога, хистолошке промене могу бити скоро истог интензитета као и код интравенског пута (Linthicum и сар., 1982).

Телије *B. pertussis* проузрокују спектар биолошких ефеката код мишева као што су појава шока, анафилактичка осетљивост, повећана васкуларна сензитивност на вазоактивне аminer (серотонин и хистамин) као и генерализована имуноадјуватна активност (Munoz и Bergman, 1977). Непостојање адекватног животињског модела ограничава истраживање механизма који доводе до неуролошких поремећаја код људи код примене Рw вакцине. Ипак на животињском моделу је показано да је неуролошки одговор после поновљене примене Рw код енцефалопатије индуковане са говеђим албумином (Steinmann и сар., 1982) био резултат стимулативног ефекта *pertussis* токсина на појаву анафилаксе током сензибилизације са овим албумином (Munoz и сар., 1987; Redhead и сар., 1987).

Развој благе форме ЕАЕ је карактеристичан за C57BL/6 мишеве који су имунизовани хомогенатом кичмене мождине (Frei и сар., 1997). У нашем

експерименту код две групе мишева, од којих је код једне индукован ЕАЕ без додатка *pertussis* вакцине и код друге групе која је примила интраперитонеално адјувантну дозу *pertussis* вакцине (10^{10} *pertussis* микроорганизама у 0,3 ml), праћењем клиничких знакова почев од 7. дана од индукције ЕАЕ могао се запазити развој благе форме болести праћен парцијалним губитком тонуса мишића репа (20. дан од индукције) и са средњим клиничким скором од 0,5. Frei и сарадници (1997) такође у својим резултатима показују да код C57BL/6 мишева који су били имунизовани са хомогенатом кичмене мождине и примили топлотом инактивисану *B. pertussis* (10^{10}), инактивација гена за фактор некрозе тумора (TNF- α) и лимфотоксин (LT- α), за које се сматра да су укључени у догађаје који доводе до инфламаторне демиелинизације (Selmaj и сар., 1991; Langrish и сар., 2005), није утицала на тежину болести. Наиме, и мишеви са инактивисаним и мишеви са функционалним генима за ова два цитокина су развили благу форму ЕАЕ са средњим клиничким скором од 1.

Иако је имунизација наших мишева била са хомогенатом кичмене мождине који садржи различите мијелинске протеине (МВР, МОГ, протео-липидни протеин; РLP) детекција антитела у серуму се односила на присуство анти-МОГ антитела зато што је ово антитело повезано и са енцефалитогеним Т ћелијском одговором и са демиелинизацијом (Bernard и сар., 1997), а локализација на површини мијелинског омотача чини га лако доступним за антитело. Иако се може запазити нешто већи титар анти-МОГ антитела код групе која је примила адјувантну дозу (10^{10} *pertussis* микроорганизама у 0.3 ml) *pertussis* вакцине у односу на групу која није примила, статистички значајна разлика између ове две групе мишева не постоји. Такође бројне и изразито обојене МНС II позитивне ћелије су детектоване код обе групе мишева код којих је индукован ЕАЕ. Иако клинички знаци обољења нису били изражени код група са индукованим ЕАЕ (са и без *pertussis* вакцине) резултати показују значајно повећану продукцију анти-МОГ антитела у серуму ових група и повећану експресију МНС молекула II класе у мозгу. О самом значају присутног серумског анти-МОГ антитела као и експресије МНС II молекула на развој клиничких знакова као и о његовом учешћу у патогенези демиелинизационе болести детаљније је дато објашњење у делу експеримента

који је укључивао вакцину против грипа.

У принципу нађено је да сви ћелијски типови присутни унутар активних демиелинизационих лезија у МС експримирају *MHC* молекуле класе I (Höftberger и сар., 2004). Имунопероксидазно бојење пресека хипокампадне регије показује слабо обојене и разуђене *MHC* I позитивне ћелије код обе ЕАЕ групе (са и без *pertussis* вакцине) што одговара клиничкој слици.

Као додатни адјуванс *B. pertussis* вакцина је потребна у индукцији ЕАЕ за постизање израженијих и поузданијих ефеката (Constantinescu и Hillard, 2005) нарочито код мишева који су прилично резистентни на индукцију ЕАЕ (Linthicum и Frelinger, 1982). Један од механизма посредованих *pertussis* токсином је већ поменуто повећање пермеабилности крвно-мождане баријере које омогућава приступ патогеним ћелијама мозгу узрокујући ЕАЕ патологију. Једна новија студија је нпр. показала да је *pertussis* токсин узроковао транзиторно повећање пермеабилности ендотелних ћелија крвних судова мозга код људи и тако повећао трансмиграцију хуманих моноцита (Kugler и сар., 2007). Друга студија описује постизања повећане пермеабилности преко појачане експресије *P-selektina* на ендотелним ћелијама што као последицу има повећану интеракцију леукоцита са ендотелом крвних судова мозга (Kerfoot и сар., 2004). Друге студије сугеришу да *pertussis* токсин погоршава аутоимунску болест преко ефеката које испољава на имунске ћелије и њихов одговор (Carbonetti, 2010; Chen и сар., 2006). Поред тога *pertussis* токсин индукује продукцију IL-6 од стране антиген презентујућих ћелија, промовише настајање Th17 ћелија, на које се већ данас гледа као на могуће главне патогене ћелије у ЕАЕ, и тако појачава ефекат ЕАЕ (Chen и сар. 2007; Komiyama и сар., 2006). Ефекат *B. pertussis* токсина у појачавању активности ЕАЕ у основи остаје комплексан феномен везан са бројним ензимским активностима. Иако је ензимска активност *S1* субјединице *pertussis* токсина очигледно неопходна за индукцију болести (Ben-Nun и сар., 1997) постоје и подаци са друге стране који имплицирају да *S1* и *B-oligomer* субјединице (Lehmann и Ben-Nun, 1992; Robinson и сар., 1996) могу да буду укључене у протективни ефекат *pertussis* токсина код ЕАЕ. Ова двострука улога *pertussis* токсина уочена *in vivo* могла би да буде резултат одређене локално расположиве концентрације *pertussis*

токсина јер при вишим концентрацијама *pertussis* токсина повећан ниво *cAMP* (посредник у индуковању пермеабилности) је доводио до смањења пермеабилности крвних судова (Brückener и сар., 2003). И поред бројних података који документују улогу *pertussis* токсина као појачивача ЕАЕ, наши резултати показују да између мишева који су примили адјувантну дозу *pertussis* вакцине и оних који нису, није примећена значајнија разлика у испољавању клиничких знакова болести, иако је CD4 експресија била израженија код ЕАЕ групе са *pertussis* вакцином.

Имунофлуоресцентно бојење пресека хипокампадне регије детектује интензивнију CD4 позитивност код ЕАЕ са *pertussis* вакцином. CD4 молекули су примарно експримирани на површини Т помажућих лимфоцита као и на површини Т регулаторних ћелија (Reinherz и сар. 1979; Sakaguchi, 2000). Под одређеним експерименталним условима као што је изазивање ЕАЕ могуће је било индуковати експресију CD4 и у микроглија/макрофагној популацији, мада његова улога у овим ћелијама остаје непозната. CD4 експресија у овим популацијама ћелија може се знатно разликовати у зависности да ли се ради о индуктивној фази, постигнутом врху или фази опоравка код ЕАЕ, тако да макрофаге показују експресију у свим фазама, али највише током индуктивне и на врхунцу; периваскуларне ћелије испољавају CD4 молекуле током развоја ЕАЕ; а микроглија само током фазе опоравка и са дугим временом преживљавања. Очигледно различита динамика активности ових ћелија током праћења болести (фазе болести су испраћене у периоду од 10.-21. дана), која је уочена на овом моделу, је блиско повезана и са знацима обољења (Almolda и сар., 2009) а што може да пружи објашњење о могућим догађајима везаним за експресију CD4 молекула и интензитету испољавања клиничких знакова и у нашем случају где је праћење развоја клиничких знакова било између 7. и 24. дана од имунизације.

Расправа о томе да ли вакцинација доноси више штете или користи и даље траје, али је и даље само спекулативна јер, нити су предности вакцинације оповргнуте било каквим научним доказима, нити је повезаност вакцинације са аутоимунским болестима засигурно доказана. Резултати

добијени у овој докторској дисертацији дају за право оној струји истраживача и медицинских стручњака која се бори да докаже добробити вакцинације. Промене уочене кроз праћење анализираних параметара код ЕАЕ и ЕАЕ-вакцинисаних група у укупном резултату не показују да је примена вакцине против грипа била покретач или значајније утицала на развој ЕАЕ, а појединачно уочене разлике односиле би се на интраиндивидуалне разлике мишева унутар ових група. Morigabadi (2001) заједно са својим сарадницима улази у расправу о значају вакцинације против вируса грипа на општу стимулацију имунског одговора код МС пацијената у којој негира њено учешће у својству генералног стимулатора тј. стимулатора аутореактивних ћелија, јер није показано да након имунизације постоји повећана реактивност мијелин специфичних Т лимфоцита.

Без обзира на постојање (највећим делом научно незаснованих) другачијих спекулација, медицинска струка и наука сматрају да су савремене вакцине намењене за хуману употребу, укључујући и вакцину против грипа, безбедне и ефикасне и за болеснике са аутоимунским болестима, код којих вакцинација не само да спречава акутизацију природним путем настале инфекције већ спречава, што је још важније, и појаву релапса код болесника који су у ремисији. Данас је јасно да имунизација сама по себи није довољна за покретање аутоимунских болести и да су генетски, имунолошки и хормонски фактори такође укључени у настанак болести. Због овако комплексне позадине која лежи у основи већине аутоимунских болести и улога вакцине против грипа као фактора „окидања“ остаје и даље донекле предмет супротстављених ставова. Наставак ове врсте истраживања на животињским моделима је неопходан да би се у потпуности објаснила патофизиологија демијелинизационих процеса у ЦНС-у као и да би се објаснили патогенетски механизми који леже у основи неуролошких стања/догађаја потенцијално узрокованих вакцином против грипа. Такође, базирано на сазнањима из базичних истраживања неопходано је непрекидно, у складу са њима, развијати и нове технологија за припрему активних компоненти вакцина (имуногена) али и тзв. неактивних компоненти вакцина као што су адјуванси, стабилизатори и остало.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу изложених циљева и представљених резултата, изведени су следећи закључци:

Закључци на основу резултата експеримената у којима је испитивана улога вакцине против грипа у регулацији ЕАЕ

1. Након вакцинисања C57BL/6 мишева комерцијално доступном вакцином против грипа (инактивисани вирус инфлуенце) успешно је индукуван ЕАЕ субкутаном апликацијом MOG₃₅₋₅₅ пептида.
2. Код половине мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом нису детектовани клинички знаци ЕАЕ. Код друге половине мишева детектовани су само благи клинички знаци (млитавост мишића репа).
3. Вакцинацијом против грипа је индукована повећана синтеза антитела на *НА* антиген вируса грипа. Титар ових антитела је био значајно већи код мишева којима је након вакцинације био индукован и ЕАЕ.
4. Мишеви код којих је индукован ЕАЕ су имали значајно већи титар анти-MOG антитела у односу на мишеве код којих није био индукован ЕАЕ. Вакцина против грипа није утицала на титар анти-MOG антитела.
5. Код мишева код којих је индукован ЕАЕ уочене су мање промене типа лезија у хипокампусу. Код мишева који су примили вакцину против грипа пре индукције ЕАЕ примећено је додатно повећано присуство лезија.
6. У хороидном плексусу мишева код којих је био индукован ЕАЕ детектоване су бројније и интензивније обојене *МНС* II позитивне ћелије у односу на мишеве код којих није био индукован ЕАЕ. Снажнија експресија *МНС* II молекула је детектована код мишева код којих је вакцинација против грипа претходила индукцији ЕАЕ.
7. У хороидном плексусу мишева код којих је индукован ЕАЕ, независно од тога да ли су примили вакцину против грипа, детектују се слабо обојене појединачне *МНС* I позитивне ћелије.
8. У кортексу ингвиналних лимфних чворова и белој пулпи слезине мишева са ЕАЕ формирају се герминативни центри. У ткиву слезине ових мишева детектује се већи број ћелија које снажно експримирају *МНС* молекуле II класе.

9. Код мишева који су примили вакцину против грипа као и код мишева код којих је индукован ЕАЕ, са или без претходне вакцинације против грипа, али који нису развили симптоме болести, нису уочене значајне промене когнитивних функција, способност учења као ни губитак меморије. Код мишева који су примили вакцину против грипа и који су након индукције ЕАЕ развили симптоме болести, уочено је транзитorno погоршање когнитивних функција. Ретроградном анализом показанао је да су ови мишеви имали смањену способност учења и пре вакцинације и индукције ЕАЕ.

Закључци на основу резултата експеримената у којима је испитиван ефекат различитих доза *Bordetella pertussis* вакцине као појачивача индукције ЕАЕ

10. C57BL/6 мишеви код којих је ЕАЕ индукован само хомогенатом кичмене мождине и мишеви код којих је за изазивања ЕАЕ коришћена и адјувантна доза *pertussis* вакцине, развили су благе форме ЕАЕ, без уочених разлика између ове две групе. За разлику од адјувантне дозе, примена концентроване дозе *pertussis* вакцине изазвала је морталитет од 80%.
11. У серумима свих мишева са индукованим ЕАЕ детектован је повећан титар анти-MOG антитела. У хипокампаљној регији ових мишева детектована је реактивност са анти-MOG антителом. Такође, уочене су бројне и изразито обојене МНС II позитивне ћелије, док је реактивност са анти МНС I антителима била слаба. И експресија CD4 молекула је детектована у ћелијама хипокампаљне регије. Примена адјувантне дозе *pertussis* вакцине није довела до промене у реактивности ћелија хипокампаљне регије са анти-MOG, анти-MНС II, анти-MНС I и анти CD4 антителима.

Промене уочене кроз праћење анализираних параметара код мишева са индукованим ЕАЕ и код мишева код којих је ЕАЕ индукован након вакцинације против грипа не показују да је примена вакцине била покретач или значајније утицала на развој ЕАЕ, а појединачно уочене разлике односиле би се на интраиндивидуалне разлике мишева унутар испитиваних група.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology (7th edition), Saunders, Elsevier Comp, Philadelphia, PA. 2013.
- Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia*. 1997; 35(1):11-24.
- Agmon-Levin N, Kivity S, Shoenfeld Y. Influenza Vaccine and Autoimmunity. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11:183-185.
- Alfredo A, Mendez M. Multiple sclerosis: neurobehavioral aspects. *MedLink Neurology*. 2006. http://www.medmerits.com/index.php/article/multiple_sclerosis_neurobehavioral_aspects.
- Almolda B, Costa M, Montoya M, González B, Castellano B. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J Neuroimmunol*. 2009; 209(1-2):65-80.
- Almolda B, González B, Castellano B. Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol*. 2010; 223(1-2):39-54.
- Amano H, Miyamoto N, Shimura H, Sato DK, Fujihara K, Ueno S, Nakamura R, Ueno Y, Watanabe M, Hattori N, Urabe T. Influenza-associated MOG antibody-positive longitudinally extensive transverse myelitis: a case report. *BMC Neurol*. 2014; 14:224 doi: 10.1186/s12883-014-0224-x.
- Amiel SA. The effects of Bordetella pertussis vaccine on cerebral vascular permeability. *Br J Exp Pathol*. 1976; 57(6):653-62.
- Andersen O, Lygner PE, Bergström T, Andersson M, Vahlne A. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol*. 1993; 240(7):417-22.
- Aron-Maor A, Shoenfeld Y. Vaccination and autoimmunity. Из: Shoenfeld Y, Rose N (уредници) *Infection and autoimmunity*. Elsevier Publication, Amsterdam, The Netherlands. 2004; p.105-116.
- Ascherio A, Zhang S, Hernan M, Olek M, Coplan P, Brodovicz K, Walker AM. Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2001;

344:327-332.

- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+)T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000; 192(3):393-404.
- Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4(+) T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol*. 2007; 8(2):172-80.
- Bardage C, Persson I, Ortqvist A, Bergman U, Ludvigsson JF, Granath F. Neurological and autoimmune disorders after vaccination against pandemic influenza A (H1N1) with a monovalent adjuvanted vaccine: population based cohort study in Stockholm, Sweden. *BMJ*. 2011; 343:d5956 doi: 10.1136/bmj.d5956.
- Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, Calabresi PA, Waubant E, Hauser SL, Zhang J, Smith CH. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 2010; 67(4):452-61.
- Ben-Nun A, Mendel I, Kerlero de Rosbo N. Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by pertussis toxin: the protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997; 109(2):120-5.
- Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 1997; 75(2):77-88.
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*. 2014; (86) doi: 10.3791/51275.
- Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol*. 2014; 5:131 doi: 10.3389/fimmu.2014.00131.
- Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Silva J Jr, Gershwin ME. Vaccines, viruses, and voodoo. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002; 12(3):155-68.
- Brocke S, Hausmann S, Steinman L, Wucherpfennig KW. Microbial peptides and

- superantigens in the pathogenesis of autoimmune diseases of the central nervous system. *Semin Immunol.* 1998; 10(1):57-67.
- Brückener KE, el Bayâ A, Galla HJ, Schmidt MA. Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 9):1837-46.
- Cahill JF, Izzo A, Garg N. Immunization in patients with multiple sclerosis. *Neurol Bull.* 2010; 2:17-21.
- Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 2010; 5(3):455-69.
- Chen X, Howard OM, Oppenheim JJ. Pertussis toxin by inducing IL-6 promotes the generation of IL-17-producing CD4 cells. *J Immunol* 2007; 178:6123–6129.
- Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, Howard OM. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36(3):671-80.
- Chen J, Deng YM. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology* 2009; 6:30 doi: 10.1186/1743-422X-6-30.
- Chen RT, Pless R, Destefano F. Epidemiology of autoimmune reactions induced by vaccination. *J Autoimmun.* 2001; 16(3):309-18.
- Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008; 7:1139–1151.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372:1502-1517.
- Confavreux C, Suissa S, Saddinger P, Bourdès V, Vukusic S; Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group. Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group. *N Engl J Med.* 2001; 344(5):319-26.
- Constantinescu CS, Hilliard BA. Adjuvants in EAE. Из: Lavi E и Constantinescu CS (уредници) *Experimental Models of Multiple Sclerosis*, Springer, 2005; p.73-78.
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4):1079-106.
- Conti F, Rezai S, Valesini G. Vaccination and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 2008; 8:124-128.

- Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG35–55 peptide in C57BL6/J strain of mice. *J Autoimmun.* 2003; 20(1):51-61.
- Cox RJ, Hovden AO, Bragstad K, Haaland IM, Haaheim LR. Comparison of the humoral immune response to split and whole virus vaccines in mice. *International Congress Series* 2004; 1263:632–635.
- D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 36(1):60-90.
- De Keyser J, Zwanikken C, Boon M. Effects of influenza vaccination and influenza illness on exacerbations in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1998; 159(1):51-3.
- DeDiego ML, Anderson CS, Yang H, Holden-Wiltse J, Fitzgerald T, Treanor JJ, Topham DJ. Directed selection of influenza virus produces antigenic variants that match circulating human virus isolates and escape from vaccine mediated immune protection. *Immunology.* 2016; 148(2):160-73.
- Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1):21-9.
- DeStefano F, Verstraeten T, Jackson LA, Okoro CA, Benson P, Black SB, Shinefield HR, Mullooly JP, Likosky W, Chen RT; Vaccine Safety Datalink Research Group, National Immunization Program, Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinations and risk of central nervous system demyelinating diseases in adults. *Arch Neurol.* 2003; 60(4):504-9.
- Dieleman J, Romio S, Johansen K, Weibel D, Bonhoeffer J, Sturkenboom M; VAESCO-GBS Case-Control Study Group. Guillain-Barre syndrome and adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: multinational case-control study in Europe. *BMJ.* 2011; 343:d3908. doi: 10.1136/bmj.d3908.
- Donnelly S, Loscher CE, Lynch MA, Mills KHG. Whole-Cell but Not Acellular Pertussis Vaccines Induce Convulsive Activity in Mice: Evidence of a role for toxin-induced interleukin-1 β in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infect Immun.* 2001; 69(7):4217-23.
- Drake MA, Carrá A, Allegri RF, Luetic G. Differential patterns of memory

- performance in relapsing, remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Neurol India*. 2006; 54(4):370-6.
- Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008; 7:268-277.
- Encinas JA, Lees MB, Sobel RA, Symonowicz C, Weiner HL, Seidman CE, Seidman JG, Kuchroo VK. Identification of genetic loci associated with paralysis, inflammation and weight loss in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol*. 2001; 13(3):257-64.
- Encinas JA, Weiner HL, Kuchroo VK. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 1996; 45(6):655-69.
- 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.
- Finger H. Bordetella pertussis as adjuvant. Из: Neter E, Milgrom F (уредници). *The immune system and infectious diseases*. 1975; p.132-166. 4th Int Convoc Immunol., Buffalo, N.Y., 1974. S. Karger, Basel.
- Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, Bresee JS, Cox NS; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm Rep*. 2008; 57(RR-7):1-60.
- Fourrier A, Bégaud B, Alperovitch A, Verdier-Taillefer MH, Touzé E, Decker N, Imbs JL. Hepatitis B vaccine and first episodes of central nervous system demyelinating disorders: a comparison between reported and expected number of cases. *Br J Clin Pharmacol*. 2001; 51(5):489-90.
- Frei K, Eugster HP, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. Tumor necrosis factor and lymphotoxin are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 1997; 185(12):2177-82.
- Gelderblom HR. Structure and Classification of Viruses. Из: Baron S (уредник) *Medical Microbiology* 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996; Chapter 41.

- González-Duarte A, Magaña Zamora L, Cantú Brito C, García-Ramos G. Hypothalamic abnormalities and Parkinsonism associated with H1N1 influenza infection. *J Neuroinflammation*. 2010; 7:47. doi: 10.1186/1742-2094-7-47.
- Gout O. Vaccinations and multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2001; 22(2):151-4.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*. 2005; 11(3):328-34.
- Grohskopf LA, Sokolow LZ, Olsen SJ, Bresee JS, Broder KR, Karron RA. Prevention and Control of Influenza With Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015-16 Influenza Season.. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015; 64(30):818-25.
- Hamborsky J, Kroger A, Wolfe C. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2015.
- Hernán MA, Jick SS, Olek MJ, Jick H. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 2004; 63(5):838-42.
- Herroelen L, de Keyser J, Ebinger G. Central nervous system demyelination after immunization with recombinant Hepatitis B vaccine. *Lancet*. 1991; 338(8776):1174-5.
- Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002; 20(25-26):3068-87.
- Hocine MN, Farrington CP, Touzé E, Whitaker HJ, Fourrier A, Moreau T, Tubert-Bitter P. Hepatitis B vaccination and first central nervous system demyelinating events: reanalysis of a case-control study using the self-controlled case series method. *Vaccine*. 2007; 25(31):5938-43.
- Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol*. 2004; 14(1):43-50.
- Holscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res*. 1999; 100(1-2):225-35.
- Holvast B, Huckriede A, Kallenberg CG, Bijl M. Influenza vaccination in systemic

lupus erythematosus: safe and protective? *Autoimmun Rev.* 2007; 6(5):300-5.

Hovden AO, Cox RJ, Haaheim LR. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scand J Immunol.* 2005; 62(1):36-44.

<http://www.acceleratedcure.org/sites/default/files/curemap/phase2-pathogens-vaccinations.pdf> Accelerated Cure Project for Multiple Sclerosis. 2008. Analysis of vaccinations as a possible cause of Multiple Sclerosis. Accelerated Cure Project, Inc.

<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>

<http://justthevax.blogspot.rs/2012/08/100-certainty.html>

<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.ht>

https://www.123rf.com/photo_25154199_diagram-of-influenza-virus-particle-structure.html

<https://www.pinterest.com/pin/271412315015558171/>

Hurwitz ES, Schonberger LB, Nelson DB, Holman RC. Guillain-Barré syndrome and the 1978-1979 influenza vaccine. *N Engl J Med.* 1981; 304(26):1557-61.

Husted CA, Goodin DS, Hugg JW, Maudsley AA, Tsuruda JS, de Bie SH, Fein G, Matson GB, Weiner MW. Biochemical alterations in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter detected by in vivo 31P and 1H spectroscopic imaging. *Ann Neurol.* 1994; 36(2):157-65.

Ichikawa M, Johns TG, Liu J, Bernard CC. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35–55. *J Immunol.* 1996; 157(2):919-26.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357(9):851-62.

Irla M, Küpfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, Lalive PH, Fontana A, Reith W, Hugues S. MHC class II-restricted antigen presentation by

- plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med*. 2010; 207(9):1891-905.
- Irwin DJ, Wunner WH, Ertl HC, Jackson AC. Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *J Neurovirol*. 1999; 5(5):485-94.
- Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science*. 1991; 253(5025):1283-5.
- Jovanova-Nesic K, Shoenfeld Y. Autoimmunity in the brain: the pathogenesis insight from cell biology. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1107:142-54.
- Jovanova-Nesic K, Nikolic V, Jankovic BD. Locus ceruleus and immunity II: suppression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus. *Int J Neurosci*. 1993; 68(3-4):289-94.
- Julian LJ. Cognitive functioning in multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2011; 29(2):507-25.
- Jurgens HA. Influenza infection induces neuroinflammation and impacts hippocampal structure and function, PhD thesis, Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA. 2012.
- Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, Liu C, Giltiay N, Qin H, Liu L, Qian W, Ransohoff RM, Bergmann C, Stohlman S, Tuohy VK, Li X. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 2010; 32(3):414-25.
- Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC, Bonder C, James WG, Robbins SM, Kubes P. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. 2004; 173(11):7070-7.
- Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, Kawaoka Y. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature*. 2007; 445(7125):319-23.
- Komiyama Y1, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental

- autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 177(1):566-73.
- Krone B, Pohl D, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Oeffner F, Grange JM, Gärtner J, Hanefeld F. Common infectious agents in multiple sclerosis: a case-control study in children. *Mult Scler.* 2008; 14(1):136-9.
- Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, Lehmann PV. MP4- and MOG:35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol.* 2007; 189(1-2):31-40.
- Kügler S, Böcker K, Heusipp G, Greune L, Kim KS, Schmidt MA. Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol.* 2007; 9(3):619-32.
- Laliv PH, Molnarfi N, Benkhoucha M, Weber MS, Santiago-Raber ML. Antibody response in MOG35–55 induced EAE. *J Neuroimmunol.* 2011; 240-241:28-33.
- Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Из: Knipe DM, Howley PM (уредници). *Fields Virology* 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. 2001; p.1487–1531.
- 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.
- Lasky T, Terracciano GJ, Magder L, Koski CL, Ballesteros M, Nash D, Clark S, Haber P, Stolley PD, Schonberger LB, Chen RT. The Guillain-Barré syndrome and the 1992-1993 and 1993-1994 influenza vaccines. *N Engl J Med.* 1998; 339(25):1797-802.
- Lee JM, Olitsky PK. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955; 89(2):263-6.
- Lehmann D, Ben-Nun A. Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 1992; 5(6):675-90.
- Lévy-Bruhl D, Desenclos JC, Rebière I, Drucker J. Central demyelinating disorders and hepatitis B vaccination: a risk-benefit approach for pre-adolescent vaccination in France. *Vaccine.* 2002; 20(16):2065-71.

- Linington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titer to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol.* 1987; 17(1):61-9.
- Linthicum DS, Frelinger JA. Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J Exp Med.* 1982; 156(1):31-40.
- Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A. Acute experimental encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of *Bordetella pertussis* is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol.* 1982; 73(2):299-310.
- Logue SF, Paylor R, Wehner JM.. Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci.* 1997; 111(1):104-13.
- 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 Jun;47(6):707-17.
- Ludewig P, Gallizioli M, Urra X, Behr S, Brait VH, Gelderblom M, Magnus T, Planas AM. Dendritic cells in brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1862(3):352-67.
- Luke TC, Kilbane EM, Jackson JL, Hoffman SL. Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Ann Intern Med.* 2006; 145(8):599-609.
- Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol.* 2002; 32(7):1905-13.
- Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol.* 1999; 29(11):3432-9.
- Mandolesi G, Grasselli G, Musumeci G, Centonze D. Cognitive deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis: neuroinflammation and synaptic degeneration. *Neurol Sci.* 2010; 31(Suppl 2):S255-9.

- Marks DJ, Mitchison NA, Segal AW, Sieper J. Can unresolved infection precipitate autoimmune disease? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006; 305:105-25.
- Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Immunol Today*. 1998; 19(9):395-404.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*. 2004; 78(22):12665-7.
- Matyszak MK, Perry VH. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*. 1996; 74(2):599-608.
- 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.
- McMenamin PG. 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.
- McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res*. 2003; 313(3):259-69.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A.. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:563-604.
- Mikaeloff Y, Caridade G, Rossier M, Suissa S, Tardieu M. Hepatitis B vaccination and the risk of childhood-onset multiple sclerosis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007; 161(12):1176-82.
- Miller AE, Morgante LA, Buchwald LY, Nutile SM, Coyle PK, Krupp LB, Doscher CA, Lublin FD, Knobler RL, Trantas F, Kelley L, Smith CR, La Rocca N, Lopez S. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of influenza immunization in multiple sclerosis. *Neurology*. 1997; 48(2):312-4.
- Miller H, Cendrowski W, Shapira K. Multiple sclerosis and vaccination. *Br Med J*.

1967; 2(5546):210-3.

- Miller SD, Karpus WJ, Davidson ST. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr Protoc Immunol*. 2007 May; Chapter: Unit-15.1.
- Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1998; 66(2):594-602.
- Mizutani H, Mizutani H. Immunoglobulin M rheumatoid factor in patients with mycoplasmal pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1986; 134(6):1237-40.
- Mokhtarian F, Shirazian D, Morgante L, Miller A, Grob D, Lichstein E. Influenza virus vaccination of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1997; 3(4):243-7.
- Molina V, Shoefeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2005; 38(3):235-45.
- Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, Cohen I. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun*. 2004; 23(1):1-7.
- Moriabadi NF, Niewiesk S, Kruse N, Jung S, Weissbrich B, ter Meulen V, Toyka KV, Rieckmann P. Influenza vaccination in MS: absence of T-cell response against white matter proteins. *Neurology*. 2001; 56(7):938-43.
- Morris JA. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet*. 1985; 2(8449):273.
- Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(9):3839-43.
- Munoz JJ, Peacock MG, Hadlow WJ. Anaphylaxis or so-called encephalopathy in mice sensitized to an antigen with the aid of pertussigen (pertussis toxin). *Infect Immun*. 1987; 55(4):1004-8.
- Munoz JJ, Bernard CC, Mackay IR. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell Immunol*. 1984; 83(1):92-100.
- Munoz JJ. Biological activities of pertussigen (pertussis toxin). *ИЗ: Sekura RD, Moss*

- J, Vaughan M (уредници). *Pertussis Toxin*. New York: Academic Press. 1985; p.1-18.
- Munoz JJ, Bergman RK. *Bordetella pertussis: Immunological and other biological activities*. New York: Marcel Dekker. 1977.
- Murphy BR, Webster RG. *Orthomyxoviruses*. Из: Fields BN, Knipe DM (уредници). *Fields Virology*. Raven Press Ltd: New York. 1990; p.1091-1152.
- Nadler JP. Multiple sclerosis and hepatitis B vaccination. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(5):928-9.
- Nichol KL, Margolis KL, Lind A, Murdoch M, McFadden R, Hauge M, Magnan S, Drake M. Side effects associated with influenza vaccination in healthy working adults. A randomized, placebo-controlled trial. *Arch Intern Med*. 1996; 156(14):1546-50.
- Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*. 1999; 399(6738 Suppl):A40-7.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000; 343(13):938-52.
- Oldstone MB. How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. *Virology*. 1997; 234(2):179-85.
- Ozakbas S, Idiman E, Yulug B, Pakoz B, Bahar H, Gulay Z. Development of multiple sclerosis after vaccination against hepatitis B: a study based on human leucocyte antigen haplotypes. *Tissue Antigens*. 2006; 68(3):235-8.
- Palese P, Compans RW. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol*. 1976; 33(1):159-63.
- Panitch HS. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1994; 36 Suppl:S25-8.
- Paterson PY, Day ED, Whitacre CC. Neuroimmunologic diseases: effector cell responses and immunoregulatory mechanisms. *Immunol Rev*. 1981; 55:89-120.
- Perdan-Pirkmajer K, Thallinger GG, Snoj N, Čučnik S, Žigon P, Kveder T, Logar D, Praprotnik S, Tomšič M, Sodin-Semrl S, Ambrožič A. Autoimmune response following influenza vaccination in patients with autoimmune inflammatory rheumatic disease. *Lupus*. 2012; 21(2):175-83.

- Phillips LM, Simon PJ, Lampson LA. Site-specific immune regulation in the brain: differential modulation of major histocompatibility complex (MHC) proteins in brainstem vs. hippocampus. *J Comp Neurol.* 1999; 405(3):322-33.
- Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu Rev Med.* 2013; 64:189-202.
- Pleister A, Eckels DD. Cryptic infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2003; 2(3):126-32.
- Popović M, Jovanova-Nesić K, Popović N, Ugresić N, Kostić V, Rakić L. Humoral and cell-mediated immune responses following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Int J Neurosci.* 1997; 89(3-4):165-76.
- Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, Rawlins JN. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res.* 2002; 133(2):279-91.
- Quintana FJ, Cohen IR. Autoantibody patterns in diabetes-prone NOD mice and in standard C57BL/6 mice. *J Autoimmun.* 2001; 17(3):191-7.
- Ravenholt RT, Foege WH. 1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism. *Lancet.* 1982; 2(8303):860-4.
- Redhead K, Robinson A, Ashworth LA, Melville-Smith M. The activity of purified *Bordetella pertussis* components in murine encephalopathy. *J Biol Stand.* 1987; 15(4):341-51.
- Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(8):4061-5.
- Robbinson D, Cockle S, Singh B, Strejan GH. Native, but not genetically inactivated, pertussis toxin protects mice against experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 1996; 168(2):165-73.
- Roosendaal SD, Hulst HE, Vrenken H, Feenstra HE, Castelijns JA, Pouwels PJ, Barkhof F, Geurts JJ. Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function. *Radiology.* 2010; 255(2):595-604.
- Rubin K, Glazer S. The potential role of subclinical *Bordetella Pertussis* colonization in the etiology of multiple sclerosis. *Immunobiology.* 2016; 221(4):512-5.
- Sabin AB, Wright AM. Acute ascending myelitis following a monkey bite, with the

- isolation of a virus capable of reproducing the disease. *J Exp Med.* 1934; 59(2):115-36.
- Sacco R, Bisecco A, Corbo D, Della Corte M, d'Ambrosio A, Docimo R, Gallo A, Esposito F, Esposito S, Cirillo M, Lavorgna L, Tedeschi G, Bonavita S. Cognitive impairment and memory disorders in relapsing-remitting multiple sclerosis: the role of white matter, gray matter and hippocampus. *J Neurol.* 2015; 262(7):1691-7.
- Safranek TJ, Lawrence DN, Kurland LT, Culver DH, Wiederholt WC, Hayner NS, Osterholm MT, O'Brien P, Hughes JM. Reassessment of the association between Guillain-Barré syndrome and receipt of swine influenza vaccine in 1976-1977: results of a two-state study. Expert Neurology Group. *Am J Epidemiol.* 1991; 133(9):940-51.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000; 101(5):455-8.
- Schattner A. Consequence or coincidence? The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. *Vaccine.* 2005; 23(30):3876-86.
- Schlesinger RW, Husak PJ, Bradshaw GL, Panayotov PP. Mechanisms involved in natural and experimental neuropathogenicity of influenza viruses: evidence and speculation. *Adv Virus Res.* 1998; 50:289-37.
- Sejvar JJ, Kohl KS, Gidudu J, Amato A, Bakshi N, Baxter R, Burwen DR, Cornblath DR, Cleerhout J, Edwards KM, Heininger U, Hughes R, Khuri-Bulos N, Korinthenberg R, Law BJ, Munro U, Maltezou HC, Nell P, Oleske J, Sparks R, Velentgas P, Vermeer P, Wiznitzer M; Brighton Collaboration GBS Working Group. Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine.* 2011; 29(3):599-612.
- Sekiguchi Y, Ichikawa M, Takamoto M, Ota H, Koh CS, Muramatsu M, Honjo T, Agematsu K. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are not involved in the severity of chronic non-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett.* 2009; 122(2):145-9.
- Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and

- tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* 1991; 87(3):949-54.
- 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.
- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 2010; 87(17-18):521-36.
- Shoenfeld Y, Aron-Maor A. Vaccination and autoimmunity-'vaccinosis': A dangerous liaison? *J Autoimmun.* 2000; 14(1):1-10.
- Sibley WA, Foley JM. Infection and immunization in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1965; 122:457-66.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9:271-96.
- Steinman L, Sriram S, Adelman NE, Zamvil S, McDevitt HO, Urich H. Murine model for pertussis vaccine encephalopathy: linkage to H-2. *Nature.* 1982; 299(5885):738-40.
- Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol.* 2010 Feb; Chapter 15:Unit 15.1.
- Stowe J, Andrews N, Wise L, Miller E. Investigation of the temporal association of Guillain-Barré syndrome with influenza vaccine and influenza-like illness using the United Kingdom General Practice Research Database. *Am J Epidemiol.* 2009; 169(3):382-8.
- Studahl M. Influenza virus and CNS manifestations. *J Clin Virol.* 2003; 28(3):225-32.
- 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.
- Sun X, Tanaka M, Kondo S, Okamoto K, Hirai S. Clinical significance of reduced cerebral metabolism in multiple sclerosis: a combined PET and MRI study. *Ann Nucl Med.* 1998; 12(2):89-94.
- Suter T, Malipiero U, Otten L, Ludewig B, Muehlethaler-Mottet A, Mach B, Reith W, Fontana A. Dendritic cells and differential usage of the MHC class II

- transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur J Immunol.* 2000; 30(3):794-802.
- Tam CC, O'Brien SJ, Petersen I, Islam A, Hayward A, Rodrigues LC. Guillain-Barré syndrome and preceding infection with campylobacter, influenza and Epstein-Barr virus in the general practice research database. *PLoS One.* 2007; 2(4):e344.
- Tishler M, Shoenfeld Y. Vaccination may be associated with autoimmune diseases. *Isr Med Assoc J.* 2004; 6(7):430-2.
- Todar K. Bordetella pertussis and whooping cough. Из: Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/index.html>.
- Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC, Ting JP, Van Kaer L, Miller SD. 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.
- Toplak N, Avcin T. Influenza and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173:619-26.
- Toplak N, Kveder T, Trampus-Bakija A, Subelj V, Cucnik S, Avcin T. Autoimmune response following annual influenza vaccination in 92 apparently healthy adults. *Autoimmun Rev.* 2008; 8(2):134-8.
- Touzé E, Fourrier A, Rue-Fenouche C, Rondé-Oustau V, Jeantaud I, Bégaud B, Alperovitch A. Hepatitis B vaccination and first central nervous system demyelinating event: a case-control study. *Neuroepidemiology.* 2002; 21(4):180-6.
- Trebst C, Raab P, Voss EV, Rommer P, Abu-Mugheisib M, Zettl UK, Stangel M. Longitudinal extensive transverse myelitis - it's not all neuromyelitis optica. *Nat Rev Neurol.* 2011; 7(12):688-98.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ.* 1976; 53(1):55-65.
- von Büdingen HC, Palanichamy A, Lehmann-Horn K, Michel BA, Zamvil SS. Update on the Autoimmune Pathology of Multiple Sclerosis: B-Cells as Disease-Drivers and Therapeutic Targets. *Eur Neurol.* 2015; 73(3-4):238-46.
- Vucic S, Kiernan MC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome: an update. *J Clin Neurosci.* 2009; 16(6):733-41.

- Waisbren BA. Swine-influenza vaccine. *Ann Intern Med.* 1982; 97(1):149.
- Wang GF, Li W, Li K. Acute encephalopathy and encephalitis caused by influenza virus infection. *Curr Opin Neurol.* 2010; 23(3):305-11.
- WHO (World Health Organization). New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009; 84(25):249-57.
- WHO (World Health Organization). Observed rate of vaccine reactions, Influenza vaccine. WHO, Immunization, Vaccines and Biologicals Department Quality, Safety & Standards Global Vaccine Safety. 2012.
http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Influenza_Vaccine_rates
- Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab Invest.* 2001; 81(3):263-81.
- WIPO (World Intellectual Property Organization). Patent Landscape Report on Vaccines for Selected Infectious Diseases. Patent Landscape Reports Project. 2012.
- Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996; 184(6):2271-8.
- Wu L1, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 2007; 26(6):741-50.
- Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest.* 2001; 108(8):1097-104.
- Wucherpfennig KW. T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol Immunol.* 2004; 40(14-15):1009-17.
- Yahr MD, Lobo-Antunes J. Relapsing encephalomyelitis following the use of influenza vaccine. *Arch Neurol.* 1972; 27(2):182-3.
- Yoon SW, Webby RJ, Webster RG. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014; 385:359-75.
- Zeinstra E, Wilczak N, Streefland C, De Keyser J. Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. *Neuroreport.* 2000; 11(1):89-91.
- Zeinstra, E., N. Wilczak, D. Chesik, L. Glazenburg, F. G. Kroese, and J. De Keyser. 2006. Simvastatin inhibits interferon-gamma-induced MHC class II up-regulation

in cultured astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2006 Jul 21;3:16.

Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, Hartung HP, Stadelmann C, Hemmer B. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(50):19057-62.

Ziemssen T, Ziemssen F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun Rev*. 2005; 4(7):460-7.

8. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Појединачне вредности титра анти НА антитела код испитиваних група мишева.

anti HA	IC	VCC	EAE	EAEVCC
OD _{492/620nm}	0,923	2,259	0,738	3,097
	1,088	2,258	0,865	2,812
	0,695	1,014	0,737	3,567
	1,100	2,111	0,640	2,544
	1,064	2,859	0,345	3,281
	1,019	2,255	0,545	3,003
	0,349	0,921	1,101	3,669
	0,962	1,338	0,771	3,037
\bar{x}	0,900	1,877	0,717	3,126
SD	0,242	0,652	0,208	0,349
SE	0,085	0,231	0,074	0,123
медијана	0,990	2,183	0,737	3,067
минимум	0,349	0,921	0,345	2,544
максимум	1,100	2,859	1,101	3,669

Прилог 2. Појединачне вредности титра анти-MOG антитела код испитиваних група мишева.

anti MOG	IC	VCC	EAE	EAEVCC
OD _{492/620nm}	0,411	0,403	2,047	2,493
	0,912	0,736	1,998	2,467
	0,720	0,740	1,700	1,734
	0,673	0,869	1,750	2,850
	0,805	0,931	3,538	2,581
	0,678	0,664	1,932	3,321
	0,404	0,913	1,719	1,828
	0,937	0,773	2,001	3,382
\bar{x}	0,692	0,753	2,085	2,582
SD	0,189	0,159	0,564	0,566
SE	0,067	0,056	0,199	0,200
медијана	0,699	0,756	1,965	2,537
минимум	0,404	0,403	1,700	1,734
максимум	0,937	0,931	3,538	3,382

Прилог 3. Време налажења платформе у МВМ тесту у прва три дана есперимента, пре имунизације против грипа.

Редни број	Време (sec)		
	1. дан	2. дан	3. дан
1	120	54	98
2	72	98	26
3	70	60	95
4	93	58	10
5	120	44	44
6	89	27	75
7	75	91	11
8	64	36	54
9	57	70	54
10	76	110	85
11	86	54	56
12	120	32	53
13	105	120	71
14	85	120	36
15	120	76	42
16	114	74	33
17	89	28	24
18	113	24	56
19	98	47	120
20	118	42	60

Редни број	Време (sec)		
	1. дан	2. дан	3. дан
21	120	49	115
22	120	72	59
23	63	58	48
24	92	31	59
25	120	120	97
26	118	9	7
27	86	60	55
28	120	103	61
29	120	119	27
30	120	116	83
31	120	84	56
32	67	120	9
33	120	80	60
34	120	120	50
35	93	40	41
36	114	62	38
37	120	48	52
38	120	61	44
39	86	90	64
40	120	120	67
\bar{x}	101	71	55
SD	21	33	27
SE	3	5	4
медијана	114	62	55
минимум	57	9	7
максимум	120	120	120

Прилог 4. Време налажења скривене платформе у МWM тесту од 15. до 29. дана експеримента.

IC група

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
IC	31	120	71	78	30	40	47	27	17	18	17	30
IC	32	56	43	13	9	23	22	19	25	5	16	3
IC	33	16	43	25	6	14	12	57	44	24	12	16
IC	34	35	21	3	18	7	27	61	4	16	21	11
IC	35	20	37	37	48	31	60	73	29	31	25	20
IC	36	24	17	17	32	26	35	20	14	9	12	5
IC	37	49	38	27	7	45	26	44	22	14	22	19
IC	38	54	37	19	36	36	27	26	21	18	17	6
IC	39	36	45	4	23	118	3	6	12	5	3	8
IC	40	32	22	6	8	22	4	15	27	22	6	7
\bar{x}		44	37	23	22	36	26	35	22	16	15	13
SD		30	16	22	15	31	18	22	11	8	7	9
SE		9	5	7	5	10	6	7	3	3	2	3
медијана		35	38	18	21	29	27	27	22	17	17	10
минимум		16	17	3	6	7	3	6	4	5	3	3
максимум		120	71	78	48	118	60	73	44	31	25	30

T тест у оквиру IC групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,3	0,01	0,05	0,5	0,09	0,5	0,07	0,02	0,01	0,005
16. дан		0,01	0,04	0,9	0,1	0,8	0,02	0,004	0,002	0,000
17. дан			0,9	0,3	0,5	0,2	0,9	0,3	0,3	0,06
18. дан				0,2	0,5	0,1	1,0	0,3	0,2	0,1
21. дан					0,5	0,9	0,2	0,1	0,09	0,05
22. дан						0,2	0,5	0,08	0,03	0,02
23. дан							0,1	0,02	0,02	0,009
24. дан								0,1	0,2	0,05
25. дан									0,7	0,2
28. дан										0,3

VCC група

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
VCC	21	57	21	29	3	14	20	18	19	3	7	8
VCC	22	13	6	85	30	17	7	5	9	4	11	34
VCC	23	72	17	21	25	35	46	23	12	13	14	19
VCC	24	20	5	76	36	7	29	28	11	14	4	26
VCC	25	10	10	120	28	26	25	11	6	42	36	54
VCC	26	66	24	70	20	9	18	4	7	11	6	3
VCC	27	30	120	56	58	51	40	52	23	27	21	6
VCC	28	82	7	16	40	82	19	20	8	5	10	12
VCC	29	29	120	39	8	12	12	6	31	13	72	32
VCC	30	73	120	53	43	34	18	4	120	20	7	20
\bar{x}		45	45	57	29	29	23	17	25	15	19	21
SD		28	52	32	16	23	12	15	34	12	21	16
SE		9	16	10	5	7	4	5	11	4	7	5
медијана		44	19	54	29	22	20	15	12	13	11	20
минимум		10	5	16	3	7	7	4	6	3	4	3
максимум		82	120	120	58	82	46	52	120	42	72	54

T тест у оквиру VCC групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	1,0	0,5	0,1	0,08	0,04	0,02	0,1	0,02	0,07	0,09
16. дан		0,6	0,3	0,4	0,2	0,1	0,13	0,09	0,1	0,2
17. дан			0,03	0,10	0,02	0,01	0,08	0,001	0,01	0,002
18. дан				1,0	0,4	0,1	0,7	0,04	0,2	0,3
21. дан					0,5	0,1	0,8	0,1	0,4	0,5
22. дан						0,08	0,9	0,09	0,6	0,8
23. дан							0,5	0,8	0,8	0,5
24. дан								0,4	0,7	0,8
25. дан									0,6	0,2
28. дан										0,7

ЕАЕ група

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
ЕАЕ	1	17	6	9	6	56	9	21	26	3	7	4
ЕАЕ	2	15	32	14	4	25	16	21	45	30	6	26
ЕАЕ	4	30	21	22	6	19	15	6	6	9	6	9
ЕАЕ	5	120	58	83	54	62	100	18	26	43	51	29
ЕАЕ	6	7	10	72	13	16	101	23	12	5	35	4
ЕАЕ	9	13	11	42	22	9	67	10	60	11	3	4
*ЕАЕ	3	60	35	120	13	39	25	13	94	10	5	38
*ЕАЕ	7	11	58	89	36	8	31	22	67	4	17	9
*ЕАЕ	8	12	37	4	5	7	27	10	12	24	23	3
*ЕАЕ	10	78	52	50	42	22	17	18	18	57	21	14
\bar{x}		36	32	51	20	26	41	16	37	20	17	14
SD		38	20	39	18	20	35	6	29	19	16	13
SE		12	6	12	6	6	11	2	9	6	5	4
медијана		16	34	46	13	21	21	18	26	11	12	9
минимум		7	6	4	4	7	9	6	6	3	3	3
максимум		120	58	120	54	62	101	23	94	57	51	38

T тест у оквиру ЕАЕ групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,7	0,3	0,1	0,3	0,8	0,1	1,0	0,1	0,1	0,05
16. дан		0,1	0,03	0,5	0,5	0,03	0,7	0,05	0,04	0,01
17. дан			0,02	0,09	0,5	0,02	0,2	0,06	0,02	0,001
18. дан				0,5	0,1	0,5	0,1	1,0	0,7	0,4
21. дан					0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,05
22. дан						0,05	0,8	0,1	0,02	0,05
23. дан							0,04	0,6	0,8	0,6
24. дан								0,2	0,1	0,02
25. дан									0,7	0,4
28. дан										0,6

ЕАЕВСС група

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
ЕАЕВСС	11	29	19	25	12	23	3	15	8	45	51	23
ЕАЕВСС	15	43	17	27	26	10	40	25	7	4	29	13
ЕАЕВСС	16	29	25	44	27	24	22	7	14	22	3	6
ЕАЕВСС	19	14	85	90	17	21	38	19	26	34	26	32
*ЕАЕВСС	12	12	7	23	12	11	120	14	8	20	5	11
*ЕАЕВСС	13	120	120	84	17	120	40	58	42	36	21	32
*ЕАЕВСС	14	120	120	58	62	120	32	5	11	26	6	7
*ЕАЕВСС	17	89	98	63	13	120	120	120	53	10	120	110
*ЕАЕВСС	18	44	31	120	120	120	120	120	39	10	18	58
*ЕАЕВСС	20	33	53	5	9	10	120	15	15	24	25	19
\bar{x}		53	58	54	32	58	66	40	22	23	30	31
SD		41	44	36	35	54	48	45	17	13	35	32
SE		13	14	11	11	17	15	14	5	4	11	10
медијана		38	42	51	17	24	40	17	15	23	23	21
минимум		12	7	5	9	10	3	5	7	4	3	6
максимум		120	120	120	120	120	120	120	53	45	120	110

T тест у оквиру ЕАЕVСС групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,6	1,0	0,2	0,6	0,6	0,4	0,03	0,1	0,2	0,2
16. дан		0,8	0,2	1,0	0,7	0,3	0,02	0,03	0,1	0,1
17. дан			0,04	0,8	0,5	0,2	0,005	0,03	0,2	0,07
18. дан				0,2	0,09	0,6	0,5	0,5	0,9	1,0
21. дан					0,7	0,2	0,03	0,08	0,2	0,09
22. дан						0,1	0,01	0,04	0,06	0,03
23. дан							0,3	0,3	0,6	0,6
24. дан								0,9	0,4	0,2
25. дан									0,6	0,5
28. дан										0,9

ЕАЕ# група, без симптома

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
ЕАЕ#	1	17	6	9	6	56	9	21	26	3	7	4
ЕАЕ#	2	15	32	14	4	25	16	21	45	30	6	26
ЕАЕ#	4	30	21	22	6	19	15	6	6	9	6	9
ЕАЕ#	5	120	58	83	54	62	100	18	26	43	51	29
ЕАЕ#	6	7	10	72	13	16	101	23	12	5	35	4
ЕАЕ#	9	13	11	42	22	9	67	10	60	11	3	4
\bar{x}		34	23	40	18	31	51	17	29	17	18	13
SD		43	20	31	19	22	43	7	20	16	20	12
SE		18	8	13	8	9	18	3	8	7	8	5
медијана		16	16	32	10	22	16	20	26	10	7	7
минимум		7	6	9	4	9	9	6	6	3	3	4
максимум		120	58	83	54	62	101	23	60	43	51	29

T тест у оквиру ЕАЕ# групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,4	0,7	0,2	0,9	0,4	0,4	0,8	0,3	0,3	0,2
16. дан		0,2	0,4	0,4	0,2	0,5	0,6	0,1	0,5	0,05
17. дан			0,0	0,6	0,1	0,1	0,5	0,1	0,02	0,08
18. дан				0,3	0,1	0,9	0,3	0,9	1,0	0,6
21. дан					0,4	0,1	0,9	0,2	0,2	0,07
22. дан						0,1	0,3	0,1	0,04	0,08
23. дан							0,2	1,0	0,9	0,5
24. дан								0,2	0,4	0,1
25. дан									0,9	0,1
28. дан										0,5

ЕАЕ* група, са симптомима

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
*ЕАЕ	3	60	35	120	13	39	25	13	94	10	5	38
*ЕАЕ	7	11	58	89	36	8	31	22	67	4	17	9
*ЕАЕ	8	12	37	4	5	7	27	10	12	24	23	3
*ЕАЕ	10	78	52	50	42	22	17	18	18	57	21	14
\bar{x}		40	46	66	24	19	25	16	48	24	17	16
SD		34	11	50	18	15	6	5	39	24	8	15
SE		17	6	25	9	7	3	3	20	12	4	8
медијана		36	45	70	25	15	26	16	18	17	19	12
минимум		7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
максимум		120	58	120	54	62	101	23	94	57	51	38

T тест у оквиру ЕАЕ* групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,8	0,4	0,4	0,2	0,5	0,2	0,8	0,3	0,3	0,2
16. дан		0,5	0,02	0,1	0,05	0,003	0,9	0,2	0,01	0,08
17. дан			0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,08
18. дан				0,7	0,9	0,3	0,4	1,0	0,5	0,6
21. дан					0,6	0,7	0,2	0,8	0,8	0,2
22. дан						0,09	0,3	0,9	0,2	0,4
23. дан							0,2	0,6	0,9	1,0
24. дан								0,5	0,3	0,1
25. дан									0,5	0,7
28. дан										1,0

ЕАЕVСС# група, без симптома

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
ЕАЕVСС#	11	29	19	25	12	23	3	15	8	45	51	23
ЕАЕVСС#	15	43	17	27	26	10	40	25	7	4	29	13
ЕАЕVСС#	16	29	25	44	27	24	22	7	14	22	3	6
ЕАЕVСС#	19	14	85	90	17	21	38	19	26	34	26	32
\bar{x}		29	37	47	21	20	26	17	14	26	27	19
SD		12	33	30	7	6	17	8	9	18	20	11
SE		6	16	15	4	3	9	4	4	9	10	6
медијана		29	22	36	22	22	30	17	11	28	28	18
минимум		14	17	25	12	10	3	7	7	4	3	6
максимум		43	85	90	27	24	40	25	26	45	51	32

T тест у оквиру ЕАЕVСС# групе

p	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,7	0,4	0,2	0,4	0,8	0,1	0,2	0,9	0,9	0,4
16. дан		0,05	0,4	0,4	0,5	0,3	0,2	0,6	0,7	0,2
17. дан			0,2	0,2	0,2	0,1	0,06	0,3	0,4	0,1
18. дан				0,8	0,6	0,5	0,3	0,6	0,5	0,8
21. дан					0,6	0,7	0,3	0,4	0,5	0,9
22. дан						0,3	0,2	1,0	0,9	0,5
23. дан							0,7	0,3	0,3	0,8
24. дан								0,2	0,3	0,4
25. дан									0,9	0,3
28. дан										0,4

ЕАЕVСС# група, са симптомима

	Р.Б.	15. дан	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
*ЕАЕVСС	12	12	7	23	12	11	120	14	8	20	5	11
*ЕАЕVСС	13	120	120	84	17	120	40	58	42	36	21	32
*ЕАЕVСС	14	120	120	58	62	120	32	5	11	26	6	7
*ЕАЕVСС	17	89	98	63	13	120	120	120	53	10	120	110
*ЕАЕVСС	18	44	31	120	120	120	120	120	39	10	18	58
*ЕАЕVСС	20	33	53	5	9	10	120	15	15	24	25	19
\bar{x}		70	72	59	39	84	92	55	28	21	33	40
SD		46	48	41	44	57	43	53	19	10	44	39
SE		19	20	17	18	23	18	22	8	4	18	16
медијана		67	76	61	15	120	120	37	27	22	20	26
минимум		12	7	5	9	10	32	5	8	10	5	7
максимум		120	120	120	120	120	120	120	53	36	120	110

T тест у оквиру ЕАЕVСС* групе

р	16. дан	17. дан	18. дан	21. дан	22. дан	23. дан	24. дан	25. дан	28. дан	29. дан
15. дан	0,7	0,6	0,3	0,4	0,6	0,6	0,06	0,04	0,2	0,2
16. дан		0,6	0,3	0,5	0,6	0,6	0,06	0,04	0,1	0,2
17. дан			0,2	0,1	0,3	0,8	0,07	0,09	0,3	0,3
18. дан				0,2	0,06	0,6	0,6	0,4	0,8	1,0
21. дан					0,8	0,2	0,03	0,05	0,09	0,09
22. дан						0,2	0,02	0,02	0,03	0,04
23. дан							0,3	0,2	0,4	0,6
24. дан								0,5	0,8	0,3
25. дан									0,6	0,4
28. дан										0,4

Прилог 5. Резултати Т теста – Поређење група мишева по време налажења скривене платформе у МWM тесту од 15. до 29. дана експеримента.

15. дан	IC	VCC	EAE	15. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,9			VCC	0,9				
EAE	0,6	0,6		EAE#	0,6	0,5			
EAEVCC	0,6	0,6	0,3	EAE*	0,8	0,8	0,8		
				EAEVCC#	0,3	0,3	0,8	0,5	
				EAEVCC*	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1
16. дан	IC	VCC	EAE	16. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,7			VCC	0,7				
EAE	0,5	0,5		EAE#	0,1	0,3			
EAEVCC	0,2	0,6	0,1	EAE*	0,4	1,0	0,07		
				EAEVCC#	0,9	0,8	0,4	0,6	
				EAEVCC*	0,05	0,3	0,05	0,3	0,2
17. дан	IC	VCC	EAE	17. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,01			VCC	0,01				
EAE	0,07	0,7		EAE#	0,2	0,3			
EAEVCC	0,03	0,9	0,8	EAE*	0,04	0,7	0,3		
				EAEVCC#	0,1	0,6	0,8	0,5	
				EAEVCC*	0,04	0,9	0,4	0,8	0,6
18. дан	IC	VCC	EAE	18. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,3			VCC	0,3				
EAE	0,8	0,3		EAE#	0,6	0,2			
EAEVCC	0,4	0,8	0,4	EAE*	0,8	0,6	0,6		
				EAEVCC#	0,9	0,3	0,8	0,7	
				EAEVCC*	0,3	0,5	0,3	0,7	0,4

21. дан	IC	VCC	EAE	21. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,5			VCC	0,5				
EAE	0,4	0,8		EAE#	0,7	0,8			
EAEVCC	0,3	0,1	0,1	EAE*	0,3	0,5	0,4		
				EAEVCC#	0,3	0,5	0,3	1,0	
				EAEVCC*	0,05	0,02	0,06	0,06	0,06
22. дан	IC	VCC	EAE	22. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,7			VCC	0,7				
EAE	0,3	0,2		EAE#	0,1	0,07			
EAEVCC	0,03	0,03	0,2	EAE*	0,9	0,8	0,3		
				EAEVCC#	1,0	0,8	0,3	0,9	
				EAEVCC*	0,001	0,000	0,1	0,02	0,02
23. дан	IC	VCC	EAE	23. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,05			VCC	0,05				
EAE	0,02	0,9		EAE#	0,08	0,9			
EAEVCC	0,8	0,1	0,1	EAE*	0,1	0,9	0,9		
				EAEVCC#	0,1	0,8	1,0	0,9	
				EAEVCC*	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
24. дан	IC	VCC	EAE	24. дан	IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
VCC	0,8			VCC	0,8				
EAE	0,1	0,4		EAE#	0,3	0,8			
EAEVCC	0,9	0,9	0,2	EAE*	0,07	0,3	0,3		
				EAEVCC#	0,2	0,6	0,2	0,1	
				EAEVCC*	0,4	0,8	0,9	0,3	0,2

25. дан		IC	VCC	EAE	25. дан		IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
	VCC	0,8				VCC	0,8				
	EAE	0,6	0,5			EAE#	0,9	0,8			
	EAEVCC	0,2	0,2	0,6		EAE*	0,4	0,4	0,6		
						EAEVCC#	0,2	0,2	0,4	0,9	
						EAEVCC*	0,3	0,3	0,6	0,8	0,6
28. дан		IC	VCC	EAE	28. дан		IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
	VCC	0,6				VCC	0,6				
	EAE	0,7	0,9			EAE#	0,7	0,9			
	EAEVCC	0,2	0,5	0,3		EAE*	0,7	0,8	0,9		
						EAEVCC#	0,1	0,5	0,5	0,4	
						EAEVCC*	0,2	0,4	0,5	0,5	0,8
29. дан		IC	VCC	EAE			IC	VCC	EAE#	EAE*	EAEVCC#
	VCC	0,1				VCC	0,1				
	EAE	0,8	0,3			EAE#	1,0	0,3			
	EAEVCC	0,09	0,4	0,1		EAE*	0,6	0,3	0,7		
						EAEVCC#	0,3	0,7	0,5	0,8	
						EAEVCC*	0,05	0,2	0,1	0,3	0,3

Прилог 6. Време налажења скривене платформе у МВМ тесту у периоду учења, у прва три дана експеримента: Ретроградна анализа мишева код којих је индукован ЕАЕ и који јесу или нису развили симптоме.

	ЕАЕ без симптома			ЕАЕ са симптомима		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
	120	54	98	70	60	95
	72	98	26	75	91	11
	93	58	10	64	36	54
	120	44	44	76	110	85
	89	27	75	120	32	53
	57	70	54	105	120	71
	86	54	56	85	120	36
	120	76	42	89	28	24
	114	74	33	113	24	56
	98	47	120	118	42	60
\bar{x}	97	60	56	92	66	55
SD	22	20	34	21	40	26
SE	5	4	7	5	9	6
медијана	96	56	49	87	51	55
минимум	57	27	10	64	24	11
максимум	120	98	120	120	120	95

Прилог 7. Појединачне вредности титра анти-MOG антитела код испитиваних група мишева.

anti MOG	IC	EAE	EAE_{+adj}	EAE_{+conc}
OD _{492/620nm}	0,260	0,760	2,100	0,900
	0,260	0,580	1,100	1,070
	0,120	0,540	0,810	
	0,252	0,660	2,030	
	0,470	2,340	0,770	
	0,490	1,480	1,500	
	0,288	0,800	0,896	
	0,234	0,490	1,740	
	0,160	0,740	0,690	
	0,190	1,630	1,984	
\bar{x}	0,272	1,002	1,362	
SD	0,115	0,579	0,542	
SE	0,041	0,205	0,191	
медијана	0,256	0,750	1,300	
минимум	0,120	0,490	0,690	
максимум	0,490	2,340	2,100	

Биографија

Ирина Масловарић је рођена у Београду 1965. године. Медицински факултет у Београду уписала је 1985., а дипломирала 1991. године. Специјализацију из Имунологије на Медицинском факултету Универзитета у Београду започела је 1996. године, а специјалистички испит је положила 1999. године. Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду уписала је 2013. године. У звање истраживач сарадник изабрана је 2014. године.

Од 1992. до 1999. године радила је у Институту за трансфузију крви Републике Србије, у Одељењу за припрему компоненти крви. Од 2000. до 2002. године била је запослена у Институту за медицинска истраживања у Београду. У том периоду била је сарадник на пројекту „Регулаторни пептиди, цитокини и фактори раста неуроендокриноимунолошке осовине у онтогенези, онкогенези и инфламацији дигестивног тракта“ (2002-2004; Пројекат 1752) који је финансиран од Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије у оквиру Основних истраживања. Од 2008. до 2010. је радила као лекар специјалиста имунологије у ТiМ S поликлинници, у Београду. Од 2012. до 2013. године радила је као стручни сарадник у Биомедицинском центру Института за вирусологију, вакцине и серуме, Торлак у Београду. Од 2008. обавља функцију лекара Савеза Србије за дизање тегова и секретар је Клуба дизача тегова Црвена Звезда. Члан је Удружења за медицину спорта Србије. Била је координатор научног пројекта „Утицај анаеробног вежбања на функционалне карактеристике ћелија периферне крви“ који је финансирало Министарство омладине и спорта Републике Србије а који је реализован у сарадњи Клуба дизача тегова „Црвена Звезда“, Института за медицинска истраживања и Завода за спорт и медицину спорта Републике Србије.

Као резултат досадашње научноистраживачке активности др Ирина Масловарић је у последњих пет година објавила седам радова у међународним научним часописима и има једно саопштење на научном скупу међународног значаја и три саопштења на скуповима националног значаја. У већини ових радова приказани су резултати веома актуелних студија којима је испитван могући утицај вакцинације на појаву аутоимунских обољења. Осим ових радова, др Ирина Масловарић је коаутор једног поглавља у научној монографији међународног значаја.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Ирина Масловарић**

Број индекса: Б 3028/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису

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

Потпис аутора

У Београду, 12. ОКТОБАР 2016.

Ирина Масловарић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Ирина Масловарић**

Број индекса: Б 3028/2013

Студијски програм: Биологија (анимална и хумана физиологија)

Наслов рада: **Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**

Ментори: др Драгана Марковић, и др Предраг Вујовић, доцент

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 12. ОКТОБАР 2016.

Ирина Масловарић

Изјава о коришћењу

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

Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 12. ОКТОБАР 2016.


Урош Масловар