

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nastavno-naučnom veću

Komisiji za poslediplomsku nastavu-doktorske studije

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dr med. Jasmine Đuretić (rođena Đikić)

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 07.03.2019. godine, donelo je Odluku broj 366/2 kojom se imenuje Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Uticaj starenja na imunski odgovor i neuroinflamaciju: ispitivanja na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**“, kandidata dr med. Jasmine Đuretić, u sastavu:

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

Dr med. Jasmina Đuretić je zaposlena kao saradnik u nastavi na Katedri za Patobiologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kandidat je student doktorskih akademskih studija - modul farmakologija (podmodul imunofarmakologija), na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr med. Jasmine Đuretić (rođena Đikić) „Uticaj starenja na imunski odgovor i neuroinflamaciju: ispitivanja na modelu eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa“ sa literaturom sadrži 184 strana i organizovana je u šest poglavlja: Uvod (23 strane), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijal i metode (19 strana), Rezultati (74 strane), Diskusija (25 strana) i Zaključci (2 strane). Doktorska disertacija sadrži i rezime na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj poglavlja i potpoglavlja, spisak korišćene literature koja broji 393 reference, 1 tabelu i 40 slika.

U **UVODU** su pregledno izloženi relevantni literaturni podaci koji opisuju aktualna saznanja vezana za genetski uslovljene razlike u uticaju starenja na imunski odgovor i neuroinflamaciju, uključujući i autoimunsku inflamaciju. Posebno ističemo da je u ovom poglavlju ukazano na uzrasne razlike u prevalenci i kliničkom ispoljavanju multiple skleroze, kao najzastupljenije inflamatorne autoimunske bolesti centralnog nervnog sistema. Osim toga, izneti su podaci koji ukazuju na postojanje sojnih razlika u osetljivosti eksperimentalnih životinja na indukciju i razvoj eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE), najčešće korišćenog eksperimentalnog modela multiple skleroze, i naglašena je činjenica da još uvek nisu razjašnjeni ćelijski i molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi uzrasnih i individualnih/sojnih razlika u patogenezi i sledstveno kliničkom ispoljavanju EAE-a i humane bolesti - multiple skleroze. U ovom delu disertacije ukazano je i na izrazitu razliku u osetljivosti Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) pacova na indukciju EAE-a, kao i razlike u uticaju starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike različitih tipova imunskih ćelija ova dva soja pacova, što ih čini pogodnim za ispitivanje imunopatogenetskih i neuroinflamatornih mehanizama na kojima se temelje sojne i, moguće, uzrasne razlike, u patogenezi EAE-a.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA ove doktorske disertacije bili su da se ispita uticaj starenja na osetljivost ženki DA (u adultnom uzrastu izrazito osetljive na indukciju EAE-a) i AO (u adultnom uzrastu relativno rezistentne na indukciju ove bolesti) pacova na klinički ishod imunizacije homogenatom kičmene moždine u kompletnom Frojndovom adjuvansu (KFA) uz koadministraciju inaktivisane *Bordetella pertussis* (protokol koji kod adutnih životinja osetljivog soja dovodi do razvoja klinički manifestnog EAE-a) i definišu ćelijski i molekularni mehanizmi, koji bi mogli da budu odgovorni za moguće sojno zavisne starenjem uzrokovane razlike u osetljivosti na indukciju ove bolesti i u njenom kliničkom ispoljavanju.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** opisana je indukcija EAE-a kod ženki pacova DA i AO soja uzrasta 3-4 meseca (mladi adultni pacovi) i 24-26 meseci (stari pacovi) i evaluacija kliničke slike imunizovanih životinja. Indukcija EAE-a izvršena je intradermalnim ubrizgavanjem emulzije homogenata kičmene moždine u KFA uz koadministraciju inaktivisane *Bordetella pertussis*. Za evaluaciju neurološkog deficita korišćena je sledeća skala: 0, odsustvo znakova bolesti; 0,5, gubitak tonusa distalnog dela repa; 1, potpuni gubitak tonusa repa; 2, slabost zadnjih ekstremiteta; 3, oduzetost zadnjih ekstremiteta; 4, oduzetost zadnjih i prednjih ekstremiteta (kvadriplegija), praćena inkontinencijom mokraće i stolice, moribundno stanje. Opisan je i način izdvajanja i pripreme tkiva kičmene moždine za histopatološku analizu, a procena prisutnih znakova inflamatornog procesa na transverzalnim presecima tkiva kičmene moždine vršena je prema sledećoj skali: 0, bez prisutnih inflamatornih ćelija; 1, mali broj pojedinačnih inflamatornih ćelija; 2, organizovani perivaskularni inflamatorni ćelijski infiltrati; 3, ekstenzivni perivaskularni ćelijski infiltrati sa širenjem u okolni subarahnoidalni prostor i parenhim kičmene moždine. Dat je detaljan opis postupaka izolacije mononuklearnih ćelija iz kičmene moždine, slezine i drenirajućih limfnih čvorova, kao i postupka magnetnog izdvajanja CD11b⁺ ćelija iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine i CD4⁺ T-limfocita iz suspenzija mononuklearnih ćelija kičmene moždine/slezine/drenirajućih limfnih čvorova. Takođe, opisani su postupci kultivisanja mononuklearnih ćelija drenirajućih limfnih čvorova za analizu proliferacije CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita, kao i kultivisanje mononuklearnih ćelija kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova za analizu sinteze citokina nakon restimulacije mijelin baznim proteinom (MBP). Za određivanje procentualne

zastupljenosti i broja određenih subpopulacija T-limfocita i ćelija urođene imunosti, i za analizu njihove aktivacije, proliferacije, apoptoze, sinteze citokina, fagocitoze i endocitoze korišćene su fluorescentne boje i odgovarajuća monoklonska/poliklonska antitela, koja su bila ili obeležena fluorohromima ili su sekundarno, u sklopu imunofenotipizacije, obeležavana korišćenjem odgovarajućih sekundarnih antitela ili reagenasa (za biotinizovana antitela) za koje su bili vezani fluorohromi. Za prikupljanje podataka za analizu korišćen su analogni FACSCalibur i digitalni FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) protočni citofluorometri, a za određivanje zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju određeni molekul/antigen korišćen je softverski program FlowJo software v.7.8 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, SAD). Metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*engl.* quantitative real-time polymerase chain reaction, RTq-PCR) ispitivana je, u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine/drenirajućih limfnih čvorova ekspresija informacionih ribonukleinske kiseline (iRNK) za: a) citokine - interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-23/p19, koji su neophodni za usmeravanje i održavanje diferencijacije T pomoćničkih 17 (*engl.* T helper 17, Th17) ćelija, sa ključnom ulogom u razvoj EAE-a u modelu koji je korišćen (Komiyama i sar, 2006; Damsker i sar, 2010), b) IL-17, c) IL-12/p35, citokina značajnog za diferencijaciju Th1 ćelija (Prochazkova i sar, 2012) i d) interferon (IFN)- γ . Istom metodom u CD11b⁺ ćelijama kičmene moždine ispitana je ekspresija iRNK za transformišući faktora rasta- β (*engl.* transforming growth factor β , TGF- β) i enzim hem oksigenazu (HO-1), kao i ekspresija iRNK za CD44 u CD4⁺ T-splenocitima. Za ispitivanje koncentracije citokina IL-17A i IFN- γ u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine korišćena je metoda enzimske imunoadsorpcije (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

Za određivanje statističke značajnosti razlika između eksperimentalnih grupa korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (*engl.* two-way analysis of variance, two-way ANOVA) i Bonferroni test za *post hoc* poređenja. Studentov t-test za neuparene uzorke (*engl.* unpaired Student's t-test) korišćen je kako bi se utvrdila statistička značajnost razlika u ekspresiji CD44 molekula na CD4⁺ T-splenocitima i u zastupljenosti CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u okviru CD4⁺ T-splenocita kod DA pacova. Razlike su smatrane statistički značajnim za p vrednost $\leq 0,05$. Za statističku analizu

podataka korišćen je statistički program GraphPad Prism v 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD).

Na osnovu prethodno izloženog, a u kontekstu očekivanih podataka (prema potciljevima i glavnom cilju istraživanja), članovi Komisije su mišljenja da je izbor metoda bio adekvatan, a njihov prikaz takav da omogućava reproducibilnost istraživanja.

REZULTATI su predstavljeni tekstualno i grafički, kroz 40 slika, i u 1 tabeli.

U **DISKUSIJI** su rezultati dobijeni istraživanjima u sklopu doktorske disertacije analizirani u kontekstu podataka dobijenih u drugim istraživanjima i objavljenih u relevantnim međunarodnim časopisima, kako bi se sagledali njihov značaj i ograničenja i izvukli odgovarajući zaključci u skladu sa postavljenim potciljevima i glavnim ciljem istraživanja.

U sklopu onog dela doktorske disertacije koji je označen kao **ZAKLJUČCI** sažeto su sumirani najvažniji rezultati istraživanja, na način koji nedvosmisleno implicira da su, u visokom stepenu, realizovani potciljevi, pa sledstveno i glavni cilj istraživanja.

U **LITERATURI** su navedene 393 bibliografske jedinice, od kojih značajan broj datira iz poslednjih pet godina.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije logično su podeljeni na one dobijene ispitivanjem kliničke i patohistološke slike bolesti i analizom ćelija izolovanih iz kičmene moždine, slezine i drenirajućih limfnih čvorova. Rezultati su, kao što je već rečeno, osim tekstualno, prikazani i grafički i tabelarno. Grafički prikazi su dobro osmišljeni da budu ilustrativni.

Prva grupa rezultata pokazuje da starenje smanjuje incidenciju EAE-a kod pacova DA soja, koji pokazuju izrazitu osetljivost na indukciju EAE-a u adultnom uzrastu, a povećava incidenciju kod pacova AO soja, koji su u adultnom uzrastu relativno rezistentni na indukciju EAE-a. Starenje je smanjivalo i težinu maksimalnog

neurološkog deficita kod DA pacova, a kod pacova AO soja dovelo do razvoja relativno blagog neurološkog deficita protrahovanog trajanja. Patohistološka analiza preseka tkiva kičmene moždine imunizovanih pacova pokazala je inflamatorne promene, koje su bile u skladu sa kliničkom slikom.

Druga grupa rezultata pokazala je da je broj mononuklearnih ćelija izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova, kao i broj Th17 limfocita, a posebno zastupljenost visoko patogenih Th17 limfocita koji sintetišu IFN- γ i faktor koji stimuliše kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), korelirao sa težinom kliničke slike EAE-a. U prilog sojnim razlikama u starenjem uslovljenim promenama u zastupljenosti Th17 limfocita u kičmenoj moždini išle su i razlike u ekspresiji iRNK za citokine koji usmeravaju (IL-1 β , IL-6)/održavaju (IL-23) diferencijaciju ovih ćelija. Bez obzira na uzrast, veći broj Th1 limfocita izolovan je iz kičmene moždine DA nego AO pacova, što je bilo u skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem ekspresije iRNK za IFN- γ u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine, koncentracije IFN- γ u supernatantima kultura mononuklearnih ćelija kičmene moždine imunizovanih životinja restimulisanih forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) i jonomicinom, i ekspresije iRNK za IL-12/p35 u mononuklearnim ćelijama kičmene moždine. Pokazane su i sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u preživljavanju i reaktivaciji CD4⁺ T-limfocita u kičmenoj moždini. Preciznije, utvrđeno je da se starenjem smanjuje preživljavanje i efikasnost reaktivacije CD4⁺ T-limfocita u kičmenoj moždini DA pacova i starenje ima potpuno suprotan efekat na ove fenomene u kičmenoj moždini AO pacova. Osim toga, nađeno je da je broj CD8⁺ T-limfocita (kojima se takođe pripisuje patogenetska uloga u EAE-u i humanoj bolesti) izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih pacova, i njihov citokinski profil, korelirao je sa sojnim i uzrasnim promenama u težini kliničke slike.

Analiza je obuhvatila i ćelije koje bi mogle da imaju regulatornu/protektivnu ulogu u razvoju EAE-a i humane bolesti. Bez obzira na uzrast, veći broj CD4⁺ i CD8⁺ CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-limfocita izolovan je iz kičmene moždine DA nego AO pacova, ali njihov odnos se razlikovao, budući da je on kod AO pacova bio pomešten u smeru manje efikasnih CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-limfocita (što bi moglo da se poveže sa protrahovanim tokom bolesti). Ispitivanja kičmene moždine su pokazala i

starenjem uslovljene sojne razlike u zastupljenosti subpopulacije urođenuobilačkih ćelija (*engl.* natural killer cells, NK ćelije), sa moguće regulatornom/protektivnom ulogom u razvoju EAE-a (Huang i sar, 2006; Hertwig i sar, 2016), koje su se takođe mogle povezati sa manjom osetljivošću starih DA pacova na indukciju bolesti, odnosno protrahovanim tokom bolesti kod starih AO pacova u odnosu na DA pacove istog uzrasta.

Ispitivanja ćelija kičmene moždine su uključila i ćelije mikroglije. Rezultati su pokazali da bi za sojno zavisne uzrasne promene u kliničkoj slici EAE-a mogle da budu od značaja i razlike u zastupljenosti ćelija mikroglije protektivnog CX3CR1+ fenotipa (Cardona i sar, 2006). U prilog ovoj pretpostavci išle su i razlike u zastupljenosti CD163+ ćelija (Zhang i sar, 2011) i ćelija inflamatornog IL-1 β + fenotipa u okviru ćelija mikroglije, kao i razlike u ekspresiji iRNK za molekule značajne za neuroprotektvinu aktivnost ćelija mikroglije, kao što su TGF- β i HO-1 (Abutbul i sar, 2012; Lastres-Becker i sar, 2014).

Treća grupa rezultata bila je vezana za ispitivanja ćelija izolovanih iz slezine. Ovi rezultati su pokazali da starenjem kod DA pacova, za razliku od AO pacova, najverovatnije u slezini dolazi do zadržavanja CD4+ T-limfocita aktivisanih u drenirajućim limfnim čvorovima, što utiče na infiltraciju kičmene moždine ovim ćelijama. Povećano zadržavanje ovih ćelija u slezini DA pacova tokom starenja je koreliralo sa većom ekspresijom standardne izoforme glikoproteina CD44 (CD44s molekula) na površini CD4+ T-splenocita, kao i povećanjem zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ regulatornih T-limfocita, što je moglo i da objasni uočeni fenomen (Yang i sar, 2002; Tischner i sar, 2006).

Četvrta grupa rezultata bila je vezana za ispitivanja ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja. Oni su pokazali da se starenjem smanjuje efikasnost generisanja Th17 ćelija kod DA, a povećava kod AO pacova. U skladu sa ovim nalazima uočene su sojne razlike u zastupljenosti aktivisanih konvencionalnih dendritskih ćelija sa ključnom ulogom u inicijaciji imunskog odgovora (aktivacijom CD4+ limfocita) u korišćenom modelu EAE-a, kao i aktivaciji i proliferaciji CD4+ T-limfocita. Osim toga, rezultati ispitivanja ekspresije citokina odgovornih za usmeravanje (IL-1 β , IL-6) i održavanje (IL-23) diferencijacije Th17

ćelija takođe su išli u prilog sojnim razlikama u uticaju starenja na generisanje Th17 limfocita. U prilog prethodno opisanim rezultatima išao je i nalaz veće zastupljenosti terminalno diferenciranih CD11b+CXCR3+CD8+ T-limfocita, koji sintetišu IL-17 u drenirajućim limfnim čvorovima starih AO pacova u poređenju sa njihovom zastupljenošću u drenirajućim limfnim čvorovima starih DA pacova, budući da je pokazano da ove ćelije, u modelima klinički blage bolesti (EAE-a), pružaju CD4+ T-limfocitima tzv. „reverznu“ pomoć facilitirajući diferencijaciju Th17 limfocita i njihov izlazak iz drenirajućih limfnih čvorova (Camara i sar, 2013; Huber i sar, 2015). Promene u zastupljenosti Th1 ćelija bile su takođe u skladu sa onim registrovanim u kičmenoj moždini. Konačno, sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u generisanju limfocita Th17 i Th1 fenotipa mogle su se povezati i sa razlikama u zastupljenosti CD4+CD25+Foxp3+ regulatornih T-limfocita u mononuklearnim ćelijama drenirajućih limfnih čvorova (manja kod starih DA nego kod starih AO pacova).

C. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, po prvi put, prikazuju uporednu analizu uticaja starenja na osetljivost na razvoj EAE-a kod pacova DA i AO soja. U ovom segmentu doktorske disertacije jasno se navodi da su sojne razlike u uticaju starenja na osetljivost na indukciju EAE-a uočene i analizom drugih vrsta i sojeva glodara (Endoh i sar, 1990; Ditamo i sar, 2005; Matejuk i sar, 2005). Analizom literature se došlo do zaključka da se sojne razlike u osetljivosti eksperimentalnih životinja na indukciju EAE-a mogu objasniti ne samo genetskim (vrsnim i sojnim) razlikama, već i razlikama u: a) polu eksperimentalnih životinja (Ben-Nun i sar, 1980; Källén i Nilsson, 1989; Endoh i sar, 1990; Teuscher i sar, 2004; Ditamo i sar, 2005; Matejuk i sar, 2005; Tatari-Calderone i sar, 2012), b) protokolima koji su korišćeni za indukciju EAE-a (Di Rosa i sar, 2000; Constantinescu i sar, 2011), c) godišnjem dobu u vreme imunizacije (Teuscher i sar, 2004; Teuscher i sar, 2006), d) uzrastu u kojem su mladunci koji su kasnije imunizovani u cilju indukcije bolesti odvojeni od majke (Laban i sar., 1995) i e) uslovima u kojima su gajene životinje (Lehmann i Ben-Nun, 1992; Schiffenbauer i sar, 1993; Dimitrijević i sar, 1994). Da bi se minimizirao uticaj

negenetskih faktora, u ovoj doktorskoj disertaciji su pažljivo kontrolisani svi drugi faktori koji bi mogli da utiču na bolest (životinje su bile istog pola i uzrasta, odvajane od majki u isto vreme, iz iste štalice, imunizovane prema istom protokolu, u isto vreme itd.)

Sojne razlike u starenjem uslovljenim promenama u zastupljenosti svih Th17 limfocita i izrazito patogenih Th17 limfocita koji koeksprimiraju IFN- γ i GM-CSF (Codarri i sar, 2011; El-Behi i sar, 2011) u kičmenoj moždini korelirale su sa razlikama u težini neurološkog deficita kod imunizovanih DA i AO pacova. Ovakav nalaz bio je u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da ove ćelije imaju ključnu ulogu u modelu EAE-a koji je korišćen (Hofstetter i sar, 2005; Komiyama i sar, 2006; Codarri i sar, 2011; El-Behi i sar, 2011). Sojne razlike u uticaju starenja na zastupljenost Th17 limfocita u kičmenoj moždini mogle su se povezati sa razlikama u ekspresiji iRNK za IL-1 β (El-Behi i sar, 2011) i IL-23 (Aggarwal i sar, 2003; Langrish i sar, 2005; Wu i sar, 2016), citokina od značaja ne samo za diferencijaciju/održavanje diferencijacije Th17 ćelija, već i za ispoljavanje GM-CSF u njima (El-Behi i sar, 2011; Wu i sar, 2016). Ispitivanja zastupljenosti Th1 limfocita i sinteze IFN- γ , citokina takođe značajnog za razvoj EAE-a (Ferber i sar, 1996; Sanvito i sar., 2010), u CD4⁺ T-limfocitima kičmene moždine podržala su njegovu ulogu u razvoju EAE-a (Kuchroo i sar, 1993; Lovett-Racke i sar, 2004) i ukazala na mogući doprinos Th1 limfocita sojnim razlikama (u razvoju i kliničkom ispoljavanju EAE-a).

Sojno zavisne uzrasne razlike u osetljivosti na indukciju EAE-a su se mogle povezati sa razlikama u reaktivaciji CD4⁺ T-limfocita izolovanih iz kičmene moždine imunizovanih životinja, i njihovoj osetljivosti na apoptotske signale. U ovom segmentu rada su navedeni i podaci iz literature koji podržavaju ove nalaze (Vallejo, 2005; Tatari-Calderone i sar, 2012; Müller i Pawelec, 2015).

Podaci dobijeni ispitivanjem CD8⁺ T-limfocita takođe su pažljivo analizirani u kontekstu podataka iz literature vezanih za ulogu CD8⁺ T-limfocita koji sintetišu IL-17 i IFN- γ u razvoju EAE-a (Huber i sar, 2009; Yen i sar, 2009; Vukmanovic-Stejic i sar, 2000; Huseby i sar, 2001), posebno u onim modelima EAE-a, u kojima bolest ima hronični tok (Ford i Evavold, 2005). Ova analiza je omogućila da se zaključi da bi veća zastupljenost CD8⁺ T-limfocita kod starih AO pacova nego starih DA pacova mogla da

bude jedan od faktora koji je doprineo razvoju bolesti protražovanog toka kod starih AO pacova.

Sagledavanje rezultata koji pokazuju uzrasne i sojne razlike u zastupljenosti CD4⁺ i CD8⁺ CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih ćelija u kontekstu podataka iz literature (Sharma i sar, 2006; Chiu i sar, 2007; Tucker i sa., 2011; Jagger i sar, 2014; Henson, 2017) omogućilo je da se sugerise da je odnos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih ćelija, a ne apsolutni broj ovih ćelija značajan za sojne specifičnosti u kliničkoj slici EAE-a kod starih pacova.

Analiza rezultata vezanih za ispitivanje NK ćelija u svetlu relevantnih podataka iz literature (Huang i sar, 2006; Hertwig i sar, 2016; Krishnaraj i Bhooma, 1996; Whyte i Miller, 1998; Almeida-Oliveira i sar, 2011) omogućila je da se zaključi da bi razlike u zastupljenosti NK ćelija sa regulatornom/protektivnom ulogom mogle da doprinesu smanjenju incidencije i težine bolesti kod starih DA pacova u poređenju sa mladim životinjama istog soja i protražovanom toku bolesti kod starih AO pacova u poređenju sa DA pacovima istog uzrasta.

Promene u mikrogliji su sagledane u kontekstu podataka iz literature koji ukazuju na uticaj starenja na funkcionalne karakteristike mikroglije (Fenn i sar., 2013; Norden i sar., 2015), posebno na njen potencijalno imunoregulatorni/protektivni kapacitet u razvoju oštećenja kičmene moždine (Cardona i sar, 2006; Goldmann i Prinz, 2013; Wang i sar, 2009). Zahvaljujući ovoj analizi zaključeno je da su sojne razlike u imunoregulatornom/protektivnom kapacitetu mikroglije takođe mogle da doprinesu sojno specifičnim uzrasnim razlikama u kliničkom ispoljavanju EAE-a.

Zaključak da se CD4⁺ T-limfociti na svom putu do kičmene moždine najverovatnije zadržavaju u slezini starih DA pacova u većoj meri nego u ovom organu mladih DA pacova doprinoseći manjoj incidenciji bolesti i njenom blažem kliničkom ispoljavanju kod obolelih životinja, takođe je bio zasnovan na kritičkom posmatranju dobijenih rezultata u kontekstu literaturnih podataka, posebno onih koji opisuju ulogu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih ćelija (Flügel i sar, 2001; Staykova i sar, 2002; Yang i sar, 2002; Tischner i sar, 2006) i ekspresije CD44s glikoproteina na aktivisanim efektorskim CD4⁺ T-ćelijama (Yang i sar, 2002), u kontroli migracije aktivisanih

CD4+ T-limfocita iz drenirajućih limfnih čvorova u kičmenu moždinu (Flügel i sar, 2001; Staykova i sar, 2002; Yang i sar, 2002; Tischner i sar, 2006).

Sojno zavisne uzrasne promene u generisanju neuroantigen-specifičnih Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima pažljivo su analizovane i u svetlu podataka do kojih su došli istraživači koji su ispitivali uticaj citokinskog okruženja na ovaj proces (El Mezayen i sar, 2009; Markovic i sar, 2009; Gomez i sar, 2010; Ouyang i sar, 2010). Analiza je pokazala da su dobijeni rezultati bili ne samo u skladu sa promenama u ciljnom organu, već i sa podacima koji opisuju uticaj citokina na diferencijaciju Th17 ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima (El Mezayen i sar, 2009; Markovic i sar, 2009; Gomez i sar, 2010; Ouyang i sar, 2010). Sojne i uzrasne razlike u generisanju neuroantigen-specifičnih Th17 limfocita u drenirajućim limfnim čvorovima analizovane su i u sklopu nalaza drugih istraživača vezanih za ulogu konvencionalnih dendritskih ćelija (Adachi i sar, 2002; Ishikawa i sar, 2002; Steger i sar, 1996; Lung i sar, 2000) i CD4+CD25+Foxp3+ regulatornih T-limfocita (Thomas i sar, 2007). Ništa manje značajno za razumevanje prethodno pomenutih sojnih i uzrasnih razlika nije ni sagledavanje rezultata ispitivanja diferencijacije CD8+ T-limfocita, u kontekstu podataka koji ukazuju na važnu ulogu terminalno diferenciranog subseta ovih ćelija koji sintetiše IL-17 u sazrevanju Th17 limfocita (tzv. „reverzna pomoć“) (Christensen i sar, 2001; Groom i Luster, 2011; Camara i sar, 2013; Huber i sar, 2015). Naime, zahvaljujući ovoj analizi došlo se do zaključka da je, za pojačano generisanje neuroantigen-specifičnih Th17 ćelija kod starih AO pacova u poređenju sa mladim, pored razlika u citokinskom okruženju, aktivaciji konvencionalnih dendritskih ćelija i broju regulatornih T-ćelija, bila važna i jača „reverzna pomoć“ CD8+ T-ćelija.

U zaključku, članovi komisije, na osnovu sistematične analize svakog subsegmenta ovog dela doktorske disertacije, smatraju da je Kandidatkinja pokazala sposobnost sagledavanja dobijenih rezultata u kontekstu podataka iz literature u cilju njihovog kompetentnog tumačenja.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati doktorske disertacije dr med. Jasmine Đuretić publikovani su u dva rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednom u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i jednom prihvaćenom za publikovanje (12.11.2018. godine, dokaz u prilogu) u časopisu međunarodnog značaja (M23).

Publikovani radovi iz doktorske disertacije:

Djikić J, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Bufan B, Kosec D, Dimitrijević M, Lepasavić G. Age-associated changes in rat immune system: lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Gerontol* 2014;58:179-97. doi: 10.1016/j.exger.2014.08.005. (M21)

Djikić J, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Kosec D, Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z, Dimitrijević M, Lepasavić G. Age-related changes in spleen of Dark Agouti rats immunized for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2015;278:123-35. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.12.014. (M22)

Stojić-Vukanić Z, Pilipović I, **Djikić J**, Vujnović I, Nacka-Aleksić M, Bufan B, Arsenović-Ranin N, Kosec D, Lepasavić G. Strain specificities in age-related changes in mechanisms promoting and controlling rat spinal cord damage in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Gerontol* 2018;101:37-53. doi: 10.1016/j.exger.2017.11.002. (M21)

Djuretić J, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Lepasavić G. Natural killer cells as participants in pathogenesis of rat experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): lessons from research in rats of distinct age and strain. *Centr Eur J Immunol* (in press, dokaz u prilogu) (M23)

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Razultati prikazani u okviru doktorske disertacije dr med. Jasmine Đuretić (rođena Đikić) su potvrdili postojanje sojnih specifičnosti u uticaju starenja na incidenciju i kliničko ispoljavanje EAE-a i ukazali na potencijalno sojno specifične

„karike“ u kompleksnom patogenetskom lancu razvoja ove bolesti. Preciznije, budući da model EAE-a korišćen u istraživanjima prikazanim u ovoj disertaciji „mimikrira“ ranu inflamatornu fazu humane bolesti – multiple skleroze, rezultati su ukazali na sojne razlike u ćelijskim i molekularnim mehanizmima koji su uključeni u razvoj neuroinflamacije indukovane autoimunskim oštećenjem u kičmenoj moždini. Verujemo da je ovim rezultatima učinjen jedan mali korak u razumevanju složenih mehanizama razvoja autoimunske neuroinflamacije, posebno u razumevanju individualnih razlika u razvoju ovog procesa, što bi, osim fundamentalnog značaja, uz sve ograde vezane za translaciju rezultata dobijenih istraživanjima u eksperimentalnim modelima bolesti na odgovarajuće humane bolesti, moglo da ima implikacije na dalji razvoj personalizovanih pristupa u lečenju bolesti centralnog nervnog sistema koje, kao multipla skleroza, imaju inflamatornu autoimunsku komponentu u svojoj patogeneziji.

Imajući u vidu suštinski kvalitet i značaj rezultata, kao i činjenicu da su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji „prošli“ i međunarodnu verifikaciju prihvatanjem za objavljivanje/objavljivanjem u međunarodnim časopisima (dva rada štampana u vrhunskom međunarodnom časopisu, jedan u istaknutom međunarodnom časopisu i jedan prihvaćen za publikovanje (12.11.2018. godine) u časopisu međunarodnog značaja), članovi Komisije predlažu Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj i odobri odbranu doktorske disertacije dr med Jasmine Đuretić (rođena Đikić) - oblast Farmakologija (Imunofarmakologija)

1. Prof. dr Gordana Leposavić (mentor), redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. Prof. dr Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. Dr sc. Ivan Pilipović, naučni saradnik

Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Institut
za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Citirana literatura:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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.

Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J, Northrop SC, Hussain RZ, Ratts RB, Sikder D, Racke MK. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* 2004;21:719-31.

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

Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with T(H)1 and T(H)17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol* 2009;47:141-146.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tatari-Calderone Z, Stojakovic M, Dewan R, Le Bouder G, Jankovic D, Vukmanovic S. Age-related accumulation of T cells with markers of relatively stronger autoreactivity leads to functional erosion of T cells. *BMC Immunol* 2012;13:8.

Teuscher C, Bunn JY, Fillmore PD, Butterfield RJ, Zachary JF, Blankenhorn EP. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2004;165:1593–1602.

Teuscher C, Doerge RW, Fillmore PD, Blankenhorn EP. eae36, a locus on mouse chromosome 4, controls susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in older mice and mice immunized in the winter. *Genetics* 2006;172(2):1147-53.

Thomas DC, Mellanby RJ, Phillips JM, Cooke A. An early age-related increase in the frequency of CD4+ Foxp3+ cells in BDC2.5NOD mice. *Immunology* 2007;121(4):565-76.

Tischner D, Weishaupt A, van den Brandt J, Müller N, Beyersdorf N, Ip CW, Toyka KV, Hünig T, Gold R, Kerkau T, Reichardt HM. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2635-47.

Tucker CF, Nebane-Ambe DL, Chhabra A, Parnell SA, Zhao Y, Alard P, Kosiewicz MM. Decreased frequencies of CD4+CD25+Foxp3+ cells and the potent CD103+ subset in peripheral lymph nodes correlate with autoimmune disease predisposition in some strains of mice. *Autoimmunity* 2011;44(6):453-64.

Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 2005;205: 158-169.

Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95:231–240.

Wang XS, Chen YY, Shang XF, Zhu ZG, Chen GQ, Han Z, Shao B, Yang HM, Xu HQ, Chen JF, Zheng RY. Idazoxan attenuates spinal cord injury by enhanced astrocytic activation and reduced microglial activation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2009;1253:198-209.

Whyte AL, Miller SC. Strain differences in natural killer cell-mediated immunity among mice: a possible mechanism for the low natural killer cell activity of A/J mice. *Immunobiology* 1998;199(1):23-38.

Wu L, Diny NL, Ong S, Barin JG, Hou X, Rose NR, Talor MV, Čiháková D. Pathogenic IL-23 signaling is required to initiate GM-CSF-driven autoimmune myocarditis in mice. *Eur J Immunol* 2016;46(3):582-92.

Yang Y, Lindsberg J, Hukkanen V, Seljelid R, Gahmberg CG, Meri S. Differential expression of cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-10) and adhesion molecules (VCAM-1, LFA-1, CD44) between spleen and lymph nodes associates with remission in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 2002;56:286–293.

Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu J, Meyermann R, Schluesener HJ. Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 2011;237:73-79.