

ARTYKUŁ REDAKCYJNY

Bartosz Bielecki, Andrzej Głąbiński

Received: 10.01.2008

Accepted: 10.01.2008

Published: 30.04.2008

Udział chemokin i ich receptorów w patogenezie stwardnienia rozsianego

Chemokines and their receptors in pathogenesis of multiple sclerosis

Adres do korespondencji: Klinika Neurologii i Epileptologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź, tel.: 042 639 35 91

Praca finansowana z grantu MNiSW nr 2 P05B 160 29

Streszczenie

Chemokiny stanowią stosunkowo niedawno wyodrębnioną i szybko rozrastającą się rodzinę cytokin charakteryzujących się małym ciężarem cząsteczkowym oraz zdolnością stymulowania migracji komórek *in vitro* oraz *in vivo*. Chemokiny wspólnie z molekułami adhezyjnymi biorą udział w złożonym procesie przemieszczania się leukocytów poza łożysko naczyniowe. Ukierunkowują one również migrację leukocytów w obrębie tkanek obwodowych, gdzie rozwija się zapalenie. Chemokiny podzielono na cztery grupy. Decydującym kryterium podziału jest położenie względem siebie par cystein w okolicy końca NH₂. Dwie największe grupy chemokin to chemokiny CXC (α) i CC (β). W grupie CC dwie pierwsze następujące po sobie cysteiny pozostają nierozdzielone, podczas gdy w grupie CXC rozdziela je pojedynczy aminokwas. Wyjątkami są limfotaktyny α i β posiadające tylko jedną parę cystein (grupa chemokin C lub γ) oraz fraktalkina, u której dwie pary cystein oddzielają trzy inne aminokwasy (grupa CX3C lub δ). Ze względu na funkcję chemokiny można podzielić na prozapalne oraz limfoidalne. Chemokiny oddziałują na komórki docelowe za pośrednictwem swoistych receptorów charakteryzujących się obecnością siedmiu domen przezbłonowych. Będąc jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za migrację komórek zapalnych do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w różnych procesach patologicznych, chemokiny stały się obiektem zainteresowania również w badaniach nad stwardnieniem rozsianym (SM). Analiza mózgow pacjentów z SM wykazała istotny wzrost ekspresji chemokin CCL4 i CCL5 na poziomie mRNA. W płynie mózgowo-rdzeniowym w okresie rzutu choroby stwierdzono podwyższony poziom chemokin CCL5, CXCL9 oraz CXCL10. U chorych z SM w obrębie przewlekłych aktywnych ognisk demielinizacyjnych stwierdzano komórki barwiące się w kierunku receptorów CCR2, CCR3 i CCR5, które odpowiadały morfologią makrofagom i mikroglejowi.

SŁOWA KLUCZOWE: stwardnienie rozsiane, chemokiny, receptory chemokinowe, migracja komórek, autoimmunizacyjne zapalenie mózgu

Summary

Chemokines are relatively recently characterized and growing fast family of low molecular weight cytokines, which stimulate migration of cells *in vitro* and *in vivo*. Together with adhesion molecules chemokines are involved in the complex process of migration of leukocytes outside of blood vessels. They also direct their migration within inflamed peripheral tissues. Chemokines are divided into four subfamilies. The main criterion of this division is the localization of pairs of cysteines in the NH₂ region. The major chemokine subfam-

ilies are CXC (α) and CC (β) chemokines. In CC subfamily the first cysteines are adjacent, in CXC group they are separated by a single aminoacid. The exemptions are Lymphotactins α and β which possess only one pair of cysteines (C or γ subfamily) and Fractalkine, in which the first cysteines are separated by three aminoacids (CX3C or δ subfamily). Functionally chemokines can be divided into proinflammatory and lymphoid. Chemokines influence their target cells through the specific seven transmembrane domain receptors. They are the important mediators of migration of inflammatory cells to the central nervous system (CNS) during different pathological processes that's why they became the target of interest in the studies on multiple sclerosis (MS). Analysis of MS brains showed significantly increased expression of chemokines CCL4 and CCL5 at mRNA level. In the cerebrospinal fluid of MS patients during relapse increased level of chemokines CCL5, CXCL9 and CXCL10 was detected. Within chronic active demyelinating plaques in MS brains expression of CCR2, CCR3 and CCR5 was observed in macrophages and microglia.

KEY WORDS: multiple sclerosis, chemokines, chemokine receptors, cell migration, autoimmune brain inflammation

CHEMOKINY

Chemokiny stanowią stosunkowo niedawno wyodrębnioną i szybko rozrastającą się rodzinę cytokin charakteryzujących się małym ciężarem cząsteczkowym oraz zdolnością stymulowania migracji komórek *in vitro* oraz *in vivo*. Chemokiny wspólnie z molekułami adhezyjnymi biorą udział w złożonym procesie przemieszczania się leukocytów poza łożysko naczyń krwionośnych, a także w obrębie tkanek obwodowych⁽¹⁾. Ta ostatnia właściwość w odniesieniu do komórek o charakterze zapalnym decyduje o niezwykle istotnej roli chemokin w rozwoju ogniska zapalnego, a zarazem sugeruje, że chemokiny i ich receptory mogą brać udział w patogenezie wielu chorób o podłożu infekcyjnym lub immunologicznym rozwijających się również w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Pierwszą opisaną chemokiną była CXCL4 (*platelet activating factor 4*, PF4), zidentyfikowana już w 1961 roku. Jednak aż do 1987 roku, kiedy to ukazała się pierwsza praca charakteryzująca chemokinę CXCL8 (IL-8), nie wiązano tych molekuł ze zdolnością do indukowania chemotaksji. Oficjalnie jako nowa rodzina cytokin po raz pierwszy chemokiny zostały wyodrębnione podczas Trzeciego Sympozjum Cytokin Chemotaktycznych w 1992 roku. W ciągu ostatniej dekady wiedza na temat budowy i roli chemokin w biologii człowieka i ssaków znacznie się rozszerzyła i obecnie obejmuje wiele dziedzin. Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano już 48 ludzkich chemokin, ale liczba ta ciągle się zwiększa. Powiększa się także lista ich opisanych właściwości. Obecnie oprócz właściwości chemotaktycznych jako bardzo istotne wymienia się również funkcje niezwiązane bezpośrednio z migracją komórek, takie jak: aktywacja molekuł adhezyjnych (w tym głównie integryn) w procesach interakcji pomiędzy endotelium naczyń i leukocytami, wpływ na apoptozę komórek, udział receptorów chemokinowych w przebiegu infekcji HIV i progresji AIDS⁽²⁾ oraz regulacji procesu angiogenezy^(3,4). Kolejne badania u-

wodniły rolę chemokin w inwazji zarodźca malarii^(5,6), w rozwoju OUN i układu odpornościowego⁽⁷⁻¹⁰⁾. Nazwa chemokiny sugeruje, że białka te łączą w sobie cechy charakterystyczne dla czynników chemotaktycznych oraz cytokin. Chemokiny to silnie zasadowe białka, z których większość składa się z 70-130 aminokwasów, a ich ciężar cząsteczkowy waha się w granicach 6-14 kDa. Wszystkie chemokiny mają podobną budowę. Jako białka wydzielnicze chemokiny są syntetyzowane z sekwencją liderową składającą się z 20-25 aminokwasów. Sekwencja ta podlega odcięciu przed sekrecją białka poza komórkę. Spośród dotychczas poznanych chemokin tylko dwie ulegają ekspresji na powierzchni komórek, są to CX₃CL1 (fraktalkina) oraz CXCL16^(11,12). W obrębie tkanek chemokiny wiążą się z kwaśnymi cząsteczkami (glikozaminoglikanami) na powierzchni komórek oraz w macierzy zewnątrzkomórkowej. Związane z glikozaminoglikanami chemokiny pozostają w miejscu wydzielienia, zachowując zarazem w pełni swoje właściwości chemotaktyczne^(13,14).

Zgodność pod względem sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi chemokinami może być stosunkowo niska, jednak białka te cechuje duże podobieństwo struktury trzeciorzędowej. Ze względu na różnice w budowie (przekładające się częściowo na różnice w funkcji) chemokiny podzielono na cztery grupy. Decydującym kryterium podziału jest położenie względem siebie par cystein w okolicy końca NH₂. Cysteiny te za pomocą mostków dwusiarczkowych łączą się w pary, co determinuje ich strukturę trzeciorzędową, a zarazem decyduje o możliwości rozpoznania przez swoisty receptor oraz o aktywności biologicznej tych białek. Dwie największe grupy chemokin to CXC (α) i CC (β). W grupie CC dwie pierwsze następujące po sobie cysteiny pozostają nierozdzielone, podczas gdy w grupie CXC rozdziela je pojedynczy aminokwas. Jak dotąd opisano jedynie trzy odstępstwa od powyższego modelu budowy. Dotyczą one limfotaktyn α i β , posiadających tylko jedną parę cystein (zaliczanych do grupy chemokin C

lub γ), oraz fraktalkiny, u której dwie pary cystein oddzielają trzy inne aminokwasy (tworzy ona grupę CX3C lub δ). Ze względu na różnice strukturalne w obrębie grupy CXC wyodrębniono dwie podgrupy. Do pierwszej zalicza się chemokiny posiadające w okolicy końca NH_2 sekwencję Glu-Leu-Arg (tzw. motyw ELR) bezpośrednio poprzedzającą pierwszą cysteinę i położoną w regionie kluczowym dla wiązania i aktywacji receptora. Drugą podgrupę tworzą chemokiny CXC pozbawione tego motywu. Chemokiny CXC zawierające motyw ELR (takie jak CXCL1, CXCL5 i CXCL8) cechuje zdolność do stymulowania chemotaksji neutrofilów oraz komórek endotelium oraz zdolność do stymulacji angiogenezy. Chemokiny CXC pozbawione motywu ELR, czyli CXCL9-12, posiadają zdolność indukcji chemotaksji, głównie limfocytów⁽¹⁵⁾. W znowelizowanej nomenklaturze chemokiny jako ligandy są oznaczane zależnie od grupy: XC, CC, CXC, CX3C, literą L (od słowa *ligand*) oraz kolejnym numerem. W nawiasach mogą się pojawić wcześniej nadane nazwy zwyczajowe⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Ze względu na funkcję chemokiny można podzielić na prozapalne oraz na limfoidalne. Podział ten, aczkolwiek bardzo wygodny, jest bardzo przybliżony i często nieprecyzyjny, gdyż niektóre chemokiny można zaliczyć do obu grup. Chemokiny prozapalne są produkowane pod wpływem obecności patogenów lub innych bodźców prozapalnych zarówno w obrębie tkanek, jak i komórek o charakterze zapalnym. Receptory dla tej grupy chemokin ulegają ekspresji na komórkach fagocytujących, takich jak neutrofile, eozynofile, monocyty czy niedojrzałe komórki dendrytyczne, a także w trakcie niektórych stadiów rozwoju limfocytów T. Chemokiny prozapalne odgrywają istotną rolę w odporności wrodzonej i reakcji organizmu skierowanej przeciwko patogenom oraz w procesach o charakterze zapalnym nieprzebiegających na podłożu infekcyjnym. Chemokiny określane mianem limfoidalnych lub homeostatycznych ulegają ekspresji w odrębnych środowiskach tkanki limfatycznej zarówno w centralnych (pierwszorzędowych) narządach limfatycznych (grasica, szpik kostny), jak i w obwodowych (drugorzędowych) narządach limfatycznych, w tym w śledzionie i węzłach chłonnych. Wykazano ekspresję niektórych chemokin z tej grupy w obrębie skóry (*skin-associated lymphoid tissue*, SALT), błon śluzowych (*mucosa-associated lymphoid tissue*) oraz układu pokarmowego (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). Ponieważ receptory dla tej grupy chemokin znajdują się w większości na powierzchni limfocytów T i B oraz na dojrzałych komórkach dendrytycznych, ich sugerowana rola polega na regulacji dojrzewania, stymulacji rozwoju i przemieszczania leukocytów w warunkach fizjologicznych. Sugeruje się tutaj między innymi istotny wpływ na kierowanie limfocytów w obrębie stref T i B-zależnych w węzłach chłonnych, co może mieć istotne znaczenie dla inicjacji i rozwoju prawidłowych interakcji pomiędzy komórkami dendrytycznymi i lim-

focytami T i B, a zarazem rozwojem prawidłowej odpowiedzi immunologicznej⁽¹⁹⁻²²⁾.

RECEPTORY CHEMOKINOWE

Chemokiny oddziałują na komórki docelowe za pośrednictwem swoistych receptorów. W 1990 roku sklonowano receptor dla peptydów N-formylo-metionylowych⁽²³⁾. Wykazano wówczas, iż ma on strukturę heptahelikalną i łączy się z heterotrimerami białek wiążących GTP. Wiedza ta stała się punktem wyjścia do sklonowania receptora dla interleukiny 8 (IL-8, CXCL8) oraz wielu następnych chemokin⁽²⁴⁻²⁶⁾. Obecnie znamy jedenaście receptorów dla chemokin z grupy CC oraz sześć receptorów dla chemokin z grupy CXC^(17,18). Receptory chemokinowe na podstawie sekwencji aminokwasowej zaliczono do klasy A rodziny receptorów rodopsynopodobnych. Charakteryzują się one obecnością siedmiu domen przezłonowych i w większości przypadków są zbudowane z 340-370 aminokwasów. Wspólnymi cechami receptorów chemokinowych są: wysoce konserwatywna sekwencja DRYLAIV w drugiej pętli wewnątrzkomórkowej, pojedyncza cysteina w każdej z czterech pętli zewnątrzkomórkowych, stosunkowo krótki NH_2 -koniec o kwaśnym odczynie⁽²⁷⁾. Inną cechą receptorów chemokinowych jest obecność licznych seryn i treonin w obrębie C-końca, które ulegają fosforylacji po związaniu z ligandem. Wykazano również, że receptory chemokinowe CXCR2, CCR2 i CCR5 tworzą homodimery, a w przypadku CXCR4 i CCR2 dimeryzacja jest skutkiem związania z chemokiną i może być konieczna dla dalszego przekazania sygnału do wnętrza komórki⁽²⁸⁻³⁰⁾. Ekspresja receptorów dla chemokin na powierzchni komórki jest bardzo zmienna. Oznacza to, iż obecność w obrębie komórki mRNA kodującego określony receptor nie zawsze odzwierciedla obecność funkcjonalnego receptora w obrębie błony komórkowej. Funkcja biologiczna receptorów chemokinowych jest bardzo złożona i w chwili obecnej mechanizm odpowiedzi komórek na bodźce wywołane przez chemokiny nie został w pełni poznany. Przypuszcza się, że aktywacja receptorów chemokinowych odbywa się na wielu szlakach i jest związana z wieloma mechanizmami molekularnymi. Podstawowa funkcja receptorów chemokinowych, czyli stymulacja migracji komórek w większości przypadków jest ściśle powiązana z heterotrimerami białek typu G_i , które wykazują wrażliwość na działanie toksyny *Bordetella pertussis*. Niektóre badania nie wykazały jednak kompletnego zablokowania funkcji receptora chemokinowego pod wpływem toksyny *Bordetella pertussis*⁽³¹⁾, co sugeruje udział innych białek niż G_i , być może takich jak np. G_q ($\alpha 14$ i $\alpha 16$)^(32,33). Po połączeniu chemokiny z receptorem białka te ulegają aktywacji. Przy zamianie GDP w GTP dochodzi do rozpadu heterotrimeru na dwie podjednostki: podjednostkę α połączoną z GTP i podjednostkę $\beta\gamma$. Podjednostka $\beta\gamma$ aktywuje dwa enzymy

kluczowe dla dalszej transdukcji sygnału: fosfolipazę C (PLC) podtyp β_2 i β_3 , która jest swoista dla fosfatydyloinozytolu, oraz kinazę fosfatydylo-3-OH-inozytolu (PI3K γ). W wyniku działania PLC β dochodzi do rozpadu dwufosforanu fosfatydyloinozytolu na dwa przekaźniki drugiego rzędu: inozytolo-1,4,5-trójfosforan (IP3) i diacylglicerol (DAG). IP3 jest odpowiedzialny za wyrzut jonów Ca^{2+} , natomiast DAG aktywuje wiele izoform kinazy białkowej C (PKC). Kinaza PI3K γ oprócz szybkiego wytwarzania fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforanu inicjuje aktywację innego enzymu – kinazy białkowej B (PKB). Podjednostka $\beta\gamma$ najprawdopodobniej pełni funkcję aktywatora dla innych kinaz odgrywających istotną rolę w przekaźnictwie komórkowym, w tym kinazy MAP⁽³⁴⁾. Po hydrolizie połączonego z podjednostką α GTP do GDP dochodzi do ponownego połączenia podjednostek α i $\beta\gamma$ w heterotrimer⁽³⁵⁾.

CHEMOKINY W STWARDNIENIU ROZSIANYM

Wiele chemokin i ich receptorów ulega konstytutywnej ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w warunkach fizjologicznych, m.in. na astrocytach, mikrogleju oraz neuronach. Chemokiny pełnią istotną rolę w rozwoju mózgu za sprawą regulacji migracji neuronalnych komórek prekursorowych⁽³⁶⁾. Istnieją dane wskazujące na rolę tych molekuł jako czynników troficznych stymulujących proliferację^(37,38), a także modulujących przekaźnictwo synaptyczne⁽³⁸⁾.

Etiopatogeneza stwardnienia rozsianego (SM) jest niezwykle złożona, a jej odzwierciedleniem jest obraz histopatologiczny zmian w OUN, który obejmuje zarówno procesy neurodegeneracyjne i neuroregeneracyjne, jak i zapalenie z infiltracją komórek, takich jak limfocyty i monocyty, i w konsekwencji z uszkodzeniem osłonek mielinowych. Chemokiny, będąc jednym z głównych elementów odpowiedzialnych za migrację komórek zapalnych do OUN w różnych procesach patologicznych, stały się obiektem zainteresowania również w badaniach nad SM.

U chorych na SM przeprowadzono badania poziomu chemokiny CXCL8 (IL-8) w surowicy, a także jej wytwarzania przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Wykazano, że poziom CXCL8 zarówno w surowicy⁽³⁹⁾, jak i w hodowlach PBMC był istotnie wyższy u pacjentów z SM bez leczenia niż u pacjentów leczonych interferonem β i u zdrowych ochotników⁽⁴⁰⁾. Oceniając ekspresję CXCL1 (GRO α) w mózgu chorych na SM, inna grupa badaczy wykazała za pomocą immunohistochemii (IHC), że chemokina ta jest produkowana przez aktywne komórki mikrogleju zlokalizowane głównie na obrzeżach ognisk zapalnych⁽⁴¹⁾. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) chorych na SM wykazało wzrost poziomu CCL3 (MIP-1 α) w okresie nasilenia objawów

klinicznych, korelujący ze wzrostem liczby komórek jednojądrzastych w PMR. W opisywanej pracy obserwowano podwyższony poziom CCL3 także w PMR pacjentów z innymi chorobami neurologicznymi o podłożu zapalnym, takimi jak choroba Behçeta, czy z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych⁽⁴²⁾. Analiza mózgu pod kątem ekspresji chemokin CCL3, CCL4 (MIP-1 β) oraz CCL5 (RANTES) wykazała na poziomie RNA istotny wzrost poziomu CCL4 i CCL5 w mózgu chorych na SM. Szczegółowa analiza za pomocą IHC ujawniła, że głównym źródłem CCL5 w mózgu chorych na SM były reaktywne astrocyty, natomiast CCL3 i CCL4 zlokalizowano w obrębie makrofagów znajdujących się w naciekach okołonaczyniowych i parenchymie⁽⁴³⁾. W innej pracy, w której badano poziom chemokin w PMR pacjentów z SM, stwierdzono za pomocą techniki ELISA podwyższony poziom chemokin CCL5, CXCL9 (MIG) oraz CXCL10 (IP-10) w okresie rzutu choroby.

Za pomocą metod immunohistochemicznych wykazano obecność komórek CXCL10⁺ o morfologii odpowiadającej astrocytom otaczającym naczynia krwionośne w OUN⁽⁴⁴⁾. W jednym z pierwszych doniesień na temat poziomu chemokin CCL2 (MCP-1) i CXCL10 w PMR chorych na SM wykazano, że u tych pacjentów (ale również i w grupach kontrolnych) poziom CCL2 w PMR był istotnie wyższy niż w analizowanej równoległej surowicy krwi. Ponadto stwierdzono, że poziom CCL2 w PMR był znacząco niższy u pacjentów z SM w okresie rzutu niż u pacjentów w okresie stabilnych objawów neurologicznych. W przypadku CXCL10 zaobserwowano odwrotną prawidłowość, tj. u chorych z pogorszeniem SM stwierdzano większe stężenia CXCL10 niż u chorych o stabilnych objawach neurologicznych. Autorzy tej publikacji nie zaobserwowali wpływu leczenia immunomodulującego (metylprednizolon, interferon β) na poziom badanych chemokin w PMR⁽⁴⁵⁾. Podwyższone stężenia CXCL10 i CCL5 w PMR wykazano również w innej pracy za pomocą metody ELISA⁽⁴⁶⁾. Analizowano również poziom chemokin z grupy CC w PMR i surowicy pobranej od chorych ze świeżo zdiagnozowaną postacią rzutową MS oraz od pacjentów z wirusowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych (grupa kontrolna). Wykazano znamienne wzrost poziomu CCL2 (MCP-1) w surowicy, a jednocześnie spadek w PMR u chorych z RRMS w porównaniu do chorych z schorzeniami neurologicznymi o podłożu niezapalnym (*non-inflammatory neurological diseases*, NIND)⁽⁴⁷⁾. Inne badania oceniające poziom CCL2 i CXCL10 również wykazały znaczące obniżenie poziomu CCL2 i wzrost CXCL10 w PMR od pacjentów z SM⁽⁴⁸⁾. Powyższe obserwacje udało się potwierdzić tej samej grupie badaczy także w pracy, w której analizowano poziom chemokin w PMR u chorych z rzutem SM i porównywano z chorymi na SM w trakcie sterydoterapii (metylprednizolon). W pracy tej stwierdzono podwyższone stężenie CXCL10 w PMR w okresie rzutu choroby, a wzrost ten

korelował z liczbą leukocytów. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach stężenie CCL2 w PMR było obniżone. Wykonane kontrolne badanie PMR przeprowadzone po 3 tygodniach wykazało, że poziom CXCL10 nie uległ wyraźnej zmianie, natomiast poziom CCL2 znacząco podniósł się, zwłaszcza w grupie chorych, którzy przyjmowali metyloprednizolon⁽⁴⁹⁾. Inna grupa badaczy analizująca PMR chorych na SM oraz na nawracające zapalenie nerwu wzrokowego (*relapsing neuromyelitis optica*, RNMO) wykazała, że zarówno w grupie chorych na SM, jak i na RNMO w PMR poziomy CXCL10 oraz CCL17 (TARC) były wyższe niż w grupie kontrolnej. Poziom CCL2 był znamienne niższy w PMR chorych na SM niż w grupie kontrolnej, czego nie zaobserwowano w przypadku RNMO⁽⁵⁰⁾. W innych badaniach płynu mózgowo-rdzeniowego, a także w surowicy chorych na SM (postać z rzutami) udało się potwierdzić u tych chorych niższe stężenia CCL2 w porównaniu do pacjentów z innymi, niezapalnymi chorobami neurologicznymi⁽³⁹⁾. W przypadku wirusowego zapalenia opon mózgowych stwierdzany w PMR poziom CCL2 był wyższy zarówno w porównaniu do chorych na SM, jak i chorych z grupy kontrolnej (niezapalne schorzenia neurologiczne). Wykazano także, że u chorych z SM, u których w badaniu MRI stwierdzano obecność aktywnych wzmacniających się po podaniu gadoliny ognisk, poziom CCL2 był znacząco niższy niż w pozostałych chorych na SM. Nie wykazano różnic pomiędzy poziomami CCL2 w surowicy chorych na SM, chorych na wirusowe zapalenie opon oraz pacjentów kontrolnych⁽⁴⁷⁾. Badanie z zastosowaniem techniki Western blotting na obecność CX₃CL1 (fraktalkina) w surowicy oraz PMR pobranych od pacjentów z SM, pacjentów z zapalnymi oraz niezapalnymi chorobami ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego wykazało, że poziom CX₃CL1 w PMR był podwyższony we wszystkich zapalnych chorobach neurologicznych, w tym w SM. Poziom fraktalkiny w surowicy był znamienne podwyższony u chorych z SM. Jednak autorzy nie wykazali związku pomiędzy pleocytozą PMR lub innymi parametrami procesu zapalnego (indeks IgG) a stężeniem CX₃CL1⁽⁵¹⁾. Inna grupa prowadząca badania nad ekspresją CX₃CL1 nie wykazała jednoznacznie wzrostu ekspresji tej chemokiny w mózgach chorych na SM w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano natomiast wzrost ekspresji CX₃CL1 w hodowlach ludzkich astrocytów poddanych stymulacji cytokinami pozapalnymi⁽⁵²⁾. W kolejnych pracach analizujących ekspresję chemokin w OUN za pomocą immunohistochemii stwierdzono obecność komórek barwiących się w kierunku CCL2, CCL7 (MCP-3) oraz CCL8 (MCP-2) w mózgach chorych na SM, podczas gdy nie stwierdzano obecności komórek o podobnej immunoreaktywności w zdrowych mózgach kontrolnych. W przypadku ostrych ognisk zapalnych dla wszystkich badanych chemokin pozytywne barwienie obserwowano głównie w obrębie ich centrów, z wyraźnym odgra-

nieniem istoty białej o prawidłowym wyglądzie (*normal appearing white matter*, NAWM). Zauważalna była wyraźna przewaga w intensywności barwienia na korzyść CCL2 i CCL7. O ile w centrum ognisk obserwowano barwienie obejmujące astrocyty i komórki zapalne, o tyle na obrzeżach ostrych plak oraz w obrębie przewlekłych ognisk zapalnych wśród pozytywnie barwiących się komórek pozostawały wyłącznie astrocyty. W przypadku CCL2 badacze potwierdzili rezultaty immunohistochemii (IHC) za pomocą techniki *in situ hybridisation* (ISH)⁽⁵³⁾. Inna praca z zastosowaniem technik IHC oraz ISH potwierdziła obecność CCL2 w aktywnych ogniskach zapalnych w obrębie komórek odpowiadających morfologicznie astrocytom oraz makrofagom. Prowadzono również badania mające na celu uzupełnienie wiedzy o ekspresji chemokin CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1a) i CCL4 (MIP-1β) w mózgach chorych na SM. W przypadku CCL5 stwierdzono obecność barwienia już w obrębie NAWM – głównie obejmującego naczynia krwionośne i śródbłonek, co przy braku barwienia w kierunku innych chemokin może sugerować związek CCL5 z tworzeniem nowych ognisk demielinizacji. Tkanka nerwowa od chorych na SM z niewielkimi oznakami zapalenia wykazywała podwyższoną ekspresję CCL2, CCL4 i CCL5 związaną odpowiednio z astrocytami, makrofagami i endotelium naczyń. Aktywne ogniska zapalenia charakteryzowało z kolei pozytywne barwienie przeciwciałami przeciwko CCL2 i CCL3 (barwiące astrocyty), CCL4 (zlokalizowane w obrębie makrofagów) oraz CCL5 obecne na śródbłonku naczyń, komórkach zlokalizowanych wokół naczyń, jak również na astrocytach. W otaczającej ogniska istocie białej bez cech demielinizacji stwierdzano barwienie się w kierunku CCL2 astrocyty oraz komórki mikrogleju pozytywne w kierunku CCL4. Przewlekłe i nieaktywne plaki charakteryzowały się obecnością słabego barwienia na CCL5 (śródbłonek) oraz CCL4 (śródbłonek i komórki mikrogleju)⁽⁵⁴⁾. Inne badania z zastosowaniem IHC potwierdziły, że w obrębie aktywnych i przewlekłych ognisk zapalenia u chorych na SM hipertroficzne astrocyty barwią się w kierunku CCL2, aczkolwiek autorzy nie zaobserwowali pozytywnego barwienia na CCL2 w obrębie makrofagów⁽⁵⁵⁾. W badaniu ekspresji CXCL12 w mózgach chorych na SM zaobserwowano obecność tej chemokiny w obrębie astrocytów zlokalizowanych w ogniskach zapalnych. Autorzy tego badania wykazali również, choć w mniejszym stopniu, ekspresję chemokiny CCL20 przez astrocyty w takich ogniskach⁽⁵⁶⁾. Inna grupa badająca ekspresję CXCL12 u chorych na SM opublikowała dane, według których CXCL12 ulega ekspresji w obrębie zarówno aktywnych, jak i nieaktywnych ognisk zapalenia nie tylko na astrocytach, ale również na naczyniach krwionośnych. Zaobserwowano zarazem konstytutywną ekspresję CXCL12 w parenchymie i naczyniach krwionośnych. W tej samej pracy zbadano ekspresję CXCL13, stwierdzając, że chemokina ta ulega

zwiększonej ekspresji w obrębie aktywnych ognisk demielinizacji (nie wykazano ekspresji w nieaktywnych plakach ani u pacjentów bez schorzeń neurologicznych). Badając ekspresję CXCL13 na poziomie białka (IHC), zaobserwowano obecność pozytywnych komórek w obrębie nacieków okołonaczyniowych i parenchymy w obrębie plak demielinizacyjnych. Badanie PMR wykazało wzrost poziomu CXCL12 i CXCL13 u chorych z SM, ale tylko CXCL13 korelowało z obecnością limfocytów B, komórek plazmatycznych i ze zwiększoną produkcją IgG⁽⁵⁷⁾. Poddano analizie również poziom CXCL12 w PMR łącznie z chemokinami CCL19 (MIP-3β) i CCL21 (*secondary lymphoid chemokine*, SLC). Zbadano PMR pobrane od chorych na SM i chorych z pozagąłkowym zapaleniem n. wzrokowego (ON) z obecnymi prążkami oligoklonalnymi (ON typu SM) i ON bez prążków oligoklonalnych, chorych ze schorzeniami neurologicznymi o podłożu zapalnym (*other inflammatory neurological diseases*, OIND) i NIND. Autorzy ci wykazali, że u chorych z grupy NIND w PMR stwierdzano obecność CXCL12 i CCL19, ale nie CCL21. Poziom CCL19 i CCL21 był podwyższony w PMR u chorych z SM⁽⁵⁸⁾, OIND, ON typu SM, ale nie u chorych z ON bez prążków oligoklonalnych. Wykazano słabą korelację pomiędzy poziomem CCL19 a liczbą komórek zapalnych w PMR u chorych na SM. W przypadku CXCL12 podwyższony poziom tej chemokiny stwierdzono jedynie u pacjentów z grupy OIND⁽⁵⁹⁾. Badania nad ekspresją CXCL10 i CXCL9 w mózgu chorych na SM wykorzystujące techniki immunohistochemiczne, a potwierdzone ISH wykazały obecność pozytywnego barwienia w obrębie aktywnych ognisk demielinizacji, obejmującego komórki o morfologii makrofagów oraz reaktywnych astrocytów w otaczającej parenchymie. Wykazano w tej publikacji obecność słabego barwienia na CXCL9 i CXCL10 również w grupie kontrolnej i NWAM⁽⁶⁰⁾. Inna grupa badaczy opisuje wyniki, w których w preparatach OUN pobranych od pacjentów chorych na SM komórki barwiące się w kierunku CXCL10 odpowiadały morfologii astrocytów, podczas gdy w obrębie NAWM i w mózгах kontrolnych barwienie tym przeciwciałem było negatywne. Autorzy zaobserwowali również obecność komórek barwiących się w kierunku CCL3, a odpowiadających morfologią makrofagom/mikroglejowi⁽⁶¹⁾. Praca obejmująca analizę PMR chorych z SM pod kątem ekspresji CXCL9, CXCL10 i CCL5 wykazała wzrost poziomu ww. chemokin w okresie zaostrzenia objawów klinicznych w porównaniu do grupy kontrolnej⁽⁴⁴⁾. W badaniu przeprowadzonym na grupie chorych na SM przyjmujących przez okres 2 lat preparat interferonu β wykazano wzrost stężenia CCL2 w surowicy po 12 miesiącach od włączenia terapii, a efekt ten utrzymywał się w badaniu kontrolnym po 2 latach⁽⁶²⁾. Inne prace badające wpływ leczenia interferonem β na produkcję chemokin u pacjentów z SM wykazały, że u chorych leczonych tym preparatem dochodzi do wyraźnego przemijające-

go wzrostu wydzielania CXCL10, którego nie obserwowano u pacjentów leczonych octanem glatirameru (*glatiramer acetate*, GA). W innej pracy, w której analizowano wpływ podawania GA na poziom CCL2 i CCL5 w surowicy krwi, nie wykazano istotnych zmian w stężeniach tych chemokin po upływie roku leczenia⁽⁶³⁾. Kolejna praca oceniająca wpływ leczenia preparatem interferonu na poziom chemokin wykazała nieznaczny (również przemijający) wzrost ekspresji CCL2 u chorych leczonych preparatem IFN β⁽⁶⁴⁾. Ta sama grupa badaczy zbadała wycinki skóry pobrane z okolicy wstrzyknięć interferonu β i porównała je z próbkami pobranymi od chorych przyjmujących placebo. Stwierdzono wyraźny wzrost poziomu CXCL10 i nieznaczny CCL2 w próbkach pobranych od chorych leczonych IFN β. W próbkach tych stwierdzono również obecność okołonaczyniowych nacieków składających się z makrofagów i limfocytów T mających na swojej powierzchni receptor dla CXCL10, tj. CXCR3⁽⁶⁵⁾.

RECEPTORY CHEMOKINOWE W STWARDNIENIU ROZSIANYM

Badania immunohistochemiczne (w tym technika podwójnego barwienia) tkanki OUN na obecność receptorów CCR2, CCR3 i CCR5 wykazały obecność słabego barwienia ograniczającego się do komórek mikrogleju w grupie kontrolnej. U chorych z SM w obrębie przewlekłych aktywnych ognisk zapalenia stwierdzano komórki barwiące się w kierunku CCR2, CCR3 i CCR5, które odpowiadały morfologią makrofagom i mikroglejowi. Stwierdzano również liczne infiltrujące limfocyty barwiące się na CCR5 i nieliczne barwiące się na CCR3. Stwierdzono, że część komórek barwiących się na CCR3 i CCR5 było najprawdopodobniej astrocytami, a szczególnie intensywne barwienie obejmowało wypustki obejmujące naczynia⁽⁶⁶⁾. W przypadku receptora CXCR2 wykazano jego obecność w mózгах pacjentów z SM w obrębie komórek odpowiadających aktywowanemu mikroglejowi i zlokalizowanych na obrzeżach ognisk zapalenia⁽⁴¹⁾. W PBMC wyizolowanych od pacjentów z SM stwierdzono podwyższony poziom ekspresji receptorów CXCR1 i CXCR2, ekspresja ta ulegała dalszemu zwiększeniu u chorych przyjmujących dożylnie metyloprednizolon. U chorych z SM leczonych mitoksantronem poziom ekspresji receptora CXCR2 był z namiennie niższy⁽⁶⁷⁾. Badania z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazały, że u chorych na SM subpopulacja limfocytów T CD8⁺ posiada na swojej powierzchni większą ilość receptorów CCR5 i CXCR3 w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono również różnicę pomiędzy ilością komórek CD8⁺ z receptorem CCR5 w grupach pacjentów z postaciami przewlekłymi SM i przebiegającą rzutami na korzyść tej pierwszej. W badaniu tym wykazano także dodatnią, choć słabą korelację pomiędzy ilością komórek CD8⁺

CXCR3⁺ a wzrostem objętości zmian w badaniu MRI w obrazach T2-zależnych⁽⁶⁸⁾. Porównanie ekspresji powierzchniowej CCR5 na limfocytach T CD4⁺, limfocytach B (CD19⁺) i monocytach/makrofagach (CD14⁺) wyizolowanych z krwi obwodowej wykazało, że w grupie chorych na SM ekspresja ta jest znacząco wyższa niż u zdrowych ochotników. W przypadku CXCR3 obserwowano większą niż w grupie kontrolnej ekspresję tego receptora na komórkach CD14⁺ ⁽⁴⁶⁾. W innej pracy oceniającej ekspresję receptorów chemokinowych na PBMC Sørensen i wsp. stwierdzili, że u chorych z postacią wtórnie postępującą SM w porównaniu do pacjentów z postacią przebiegającą rzutami zarówno w czasie pogorszenia, jak i remisji występuje więcej limfocytów T CCR2⁺. Zaobserwowano również, że były to komórki wydzielające cytokiny o profilu Th2. Liczba limfocytów T CCR5⁺ była znacząco niższa we wtórnie postępującej postaci SM (*secondary progressive MS*, SPMS) niż w aktywnej fazie *remitting-relapsing* (RRMS)⁽⁶⁹⁾. Kolejne badania z zastosowaniem cytometrii przepływowo-jej komórek wyizolowanych z PMR pacjentów z chorobami neurologicznymi o podłożu zapalnym (w tym SM) wykazały, że niezależnie od rodzaju patologii OUN na 90% monocytów CD14⁺ stwierdza się obecność CCR1, a 80% CCR5, co jest ilością znamienne wyższą niż w grupie kontrolnej. W pracy tej zaobserwowano również, że na większości badanych komórek receptory CCR1 i CCR5 ulegają koekspresji. Badania IHC z zastosowaniem barwień podwójnych wykazały, że komórki mające na swojej powierzchni receptory CCR1 i CCR5 gromadziły się w przestrzeni okołonaczyniowej okolic plak SM na początkowym etapie demielinizacji. Następnie w toku ewolucji plaki obserwowano wzrost ekspresji CCR5 (w tym również na osiadłych komórkach mikrogleju) oraz spadek ekspresji CCR1⁽⁷⁰⁾. Inne badania tej samej grupy badawczej wykazały, że na limfocytach T wyizolowanych z płynu mózgowo-rdzeniowego niezależnie od rodzaju zachodzącego w OUN procesu patologicznego (zapalny, niedokrwienny) obserwuje się podobny repertuar receptorów chemokinowych. W pracy tej analizowano powierzchniową ekspresję receptorów i stwierdzono, że na 90% limfocytów T wyizolowanych z PMR występuje CXCR3, na ponad 65% – CCR5, zaś na około 30% – CCR6. Tylko kilka komórek T CD3⁺ posiadało na swojej powierzchni CCR1, CCR2 lub CCR3. Stwierdzono, że wszystkie komórki, które miały na swojej powierzchni CCR5 produkowały również CXCR3. W badanym płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano znamienne wyższy odsetek limfocytów T CXCR3⁺ i CCR5⁺ niż w krwi obwodowej, nie zaobserwowano takiej różnicy w przypadku komórek z receptorem CCR6 na ich powierzchni. Akumulacja limfocytów CXCR3⁺ i CCR5⁺ w PMR była obserwowana niezależnie od rozpoznania klinicznego (SM lub inne zapalne oraz niezapalne schorzenia OUN). Wykazano także, że możliwą przyczyną akumulacji komórek CCR5⁺ w PMR może

być większa niż we krwi obwodowej liczba komórek T CD4⁺ CD45RO⁺, których liczba w stosunku do wszystkich limfocytów T CD4⁺ w PMR przekracza 90% i które w 50% przypadków mają na swojej powierzchni receptor CCR5⁽⁷¹⁾. Większą niż w grupie kontrolnej liczbę limfocytów T CXCR3⁺ w PMR w porównaniu do krwi obwodowej wykazali w swoim badaniu Sørensen i wsp. Autorzy ci ponadto za pomocą IHC wykazali obecność komórek CXCR3⁺ odpowiadających morfologią limfocytom T w obrębie zapalnych ognisk z obecną demielinizacją. Nie wykazano obecności komórek CXCR3⁺ w obrębie niezmięnionej istoty białej oraz w tkance kontrolnej. Badano także obecność receptorów z grupy α będących ligandami chemokiny CCL5 (RANTES). Stwierdzono obecność komórek CCR5⁺, odpowiadających morfologicznie limfocytom T, makrofagom oraz komórkom mikrogleju w obrębie ognisk zapalnych, oraz komórek barwiących się w kierunku CCR1, odpowiadających małym limfocytom i monocytom zlokalizowanym głównie w przestrzeni okołonaczyniowej w ogniskach zapalenia⁽⁴⁴⁾. Inne badania z zastosowaniem cytometrii przepływowo-jej wykazały, że u chorych na SM z postacią RR występuje większa liczba limfocytów T CXCR3⁺, a u chorych z postacią postępującą SM – większa liczba limfocytów T CXCR3⁺, CCR5⁺. W wykonanych badaniach immunohistochemicznych potwierdzono obecność w obrębie ognisk zapalenia komórek barwiących się w kierunku CCR5 i w mniejszym stopniu CXCR3⁽⁶¹⁾. Porównując ekspresję CCR5 na poziomie mRNA w PBMC wyizolowanych od chorych z różnymi postaciami SM, wykazano, że u chorych z postacią PP w porównaniu do postaci SP i do grupy kontrolnej występuje większa ekspresja tego receptora. Aczkolwiek ekspresja powierzchniowa CCR5 na komórkach CD4⁺ analizowana z zastosowaniem cytometru przepływowego nie ujawniła istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi typami SM⁽⁷²⁾. Analiza zależności pomiędzy ekspresją receptorów CXCR3 i CCR5 a nasileniem objawów klinicznych SM wykazała, że u pacjentów z rzutem choroby dochodzi do wzrostu ekspresji CXCR3 na limfocytach T CD4⁺ izolowanych z krwi obwodowej, a poprawa kliniczna była związana z powrotem ekspresji do poziomu wyjściowego. Co ciekawe, wykazano również związany z rzutem choroby spadek ekspresji CCR5 na limfocytach T CD4⁺ ⁽⁷³⁾.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Butcher E.C., Picker L.J.: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66.
2. Klein R.S., Williams K.C., Alvarez-Hernandez X. i wsp.: Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Immunol.* 1999; 163: 1636-1646.

3. Hwang J., Kim C.W., Son K.N. i wsp.: Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 2004; 570: 47-51.
4. Hwang J., Son K.N., Kim C.W. i wsp.: Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* 2005; 30: 254-263.
5. Chitnis C.E., Chaudhuri A., Horuk R. i wsp.: The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1531-1536.
6. Pogo A.O., Chaudhuri A.: The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin. Hematol.* 2000; 37: 122-129.
7. Ma Q., Jones D., Borghesani P.R. i wsp.: Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 9448-9453.
8. Nagasawa T.: Role of chemokine SDF-1/PBSF and its receptor CXCR4 in blood vessel development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 947: 112-115.
9. Stumm R.K., Zhou C., Ara T. i wsp.: CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J. Neurosci.* 2003; 23: 5123-5130.
10. Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M. i wsp.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 393: 595-599.
11. Imai T., Hieshima K., Haskell C. i wsp.: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX₃CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521-530.
12. Matloubian M., David A., Engel S. i wsp.: A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 298-304.
13. Amara A., Lorthioir O., Valenzuela A. i wsp.: Stromal cell-derived factor-1 α associates with heparan sulfates through the first β -strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 23916-23925.
14. Chakravarty L., Rogers L., Quach T. i wsp.: Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal α -helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29641-29647.
15. Baggiolini M.: Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 2001; 250: 91-104.
16. Bacon K., Baggiolini M., Broxmeyer H. i wsp.: IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 1067-1068.
17. Murphy P.M.: International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54: 227-229.
18. Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F. i wsp.: International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 145-176.
19. Ohl L., Bernhardt G., Pabst O., Förster R.: Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin. Immunol.* 2003; 15: 249-255.
20. Ohl L., Henning G., Krautwald S. i wsp.: Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 1199-1204.
21. Cupedo T., Lund F.E., Ngo V.N. i wsp.: Initiation of cellular organization in lymph nodes is regulated by non-B cell-derived signals and is not dependent on CXC chemokine ligand 13. *J. Immunol.* 2004; 173: 4889-4896.
22. Cupedo T., Mebius R.E.: Role of chemokines in the development of secondary and tertiary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* 2003; 15: 243-248.
23. Boulay F., Tardif M., Brouchon L., Vignais P.: The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 1990; 29: 11123-11133.
24. Murphy P.M., Tiffany H.L.: Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991; 253: 1280-1283.
25. Holmes W.E., Lee J., Kuang W.J. i wsp.: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991; 253: 1278-1280.
26. Combadiere C., Ahuja S.K., Tiffany H.L., Murphy P.M.: Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 60: 147-152.
27. Murphy P.M.: The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 593-633.
28. Mellado M., Rodríguez-Frade J.M., Mañes S., Martínez-A.C.: Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 397-421.
29. Rodríguez-Frade J.M., Vila-Coro A.J., de Ana A.M. i wsp.: The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96: 3628-3633.
30. Vila-Coro A.J., Rodríguez-Frade J.M., Martín de Ana A. i wsp.: The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 1999; 13: 1699-1710.
31. Thelen M., Peveri P., Kernen P. i wsp.: Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J.* 1988; 2: 2702-2706.
32. Wu D., LaRosa G.J., Simon M.I.: G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* 1993; 261: 101-103.
33. Arai H., Charo I.F.: Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 21814-21819.
34. Minamiguchi H., Kimura T., Urata Y. i wsp.: Simultaneous signalling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC and MAPK pathways. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 175-185.
35. Thelen M.: Dancing to the tune of chemokines. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 129-134.
36. Zhu Y., Yu T., Zhang X.C. i wsp.: Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat. Neurosci.* 2002; 5: 719-720.
37. Robinson S., Tani M., Strieter R.M. i wsp.: The chemokine growth-regulated oncogene- α promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J. Neurosci.* 1998; 18: 10457-10463.
38. Meucci O., Fatatis A., Simen A.A. i wsp.: Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 14500-14505.
39. Saruhan-Direskeneli G., Yentür S.P., Akman-Demir G. i wsp.: Cytokines and chemokines in neuro-Behçet's disease compared to multiple sclerosis and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 2003; 145: 127-134.
40. Lund B.T., Ashikian N., Ta H.Q. i wsp.: Increased CXCL8 (IL-8) expression in Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 155: 161-171.
41. Filipovic R., Jakovcevski I., Zecevic N.: GRO- α and CXCR2 in the human fetal brain and multiple sclerosis lesions. *Dev. Neurosci.* 2003; 25: 279-290.
42. Miyagishi R., Kikuchi S., Fukazawa T., Tashiro K.: Macrophage inflammatory protein-1 α in the cerebrospinal fluid

- of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 1995; 129: 223-227.
43. Boven L.A., Montagne L., Nottet H.S., De Groot C.J.: Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 122: 257-263.
 44. Sorensen T.L., Tani M., Jensen J. i wsp.: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 807-815.
 45. Franciotta D., Martino G., Zardini E. i wsp.: Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J. Neuroimmunol.* 2001; 115: 192-198.
 46. Martínez-Cáceres E.M., Espejo C., Brieva L. i wsp.: Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2002; 8: 390-395.
 47. Sindern E., Niederkinkhaus Y., Henschel M. i wsp.: Differential release of β -chemokines in serum and CSF of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 2001; 104: 88-91.
 48. Mahad D.J., Howell S.J., Woodroffe M.N.: Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002; 72: 498-502.
 49. Sorensen T.L., Sellebjerg F., Jensen C.V. i wsp.: Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2001; 8: 665-672.
 50. Narikawa K., Misu T., Fujihara K. i wsp.: CSF chemokine levels in relapsing neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 149: 182-186.
 51. Kastenbauer S., Koedel U., Wick M. i wsp.: CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX₃CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *J. Neuroimmunol.* 2003; 137: 210-217.
 52. Hulshof S., van Haastert E.S., Kuipers H.F. i wsp.: CX3CL1 and CX3CR1 expression in human brain tissue: noninflammatory control versus multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003; 62: 899-907.
 53. McManus C., Berman J.W., Brett F.M. i wsp.: MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *J. Neuroimmunol.* 1998; 86: 20-29.
 54. Simpson J.E., Newcombe J., Cuzner M.L., Woodroffe M.N.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other β -chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 1998; 84: 238-249.
 55. Van Der Voorn P., Tekstra J., Beelen R.H. i wsp.: Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 45-51.
 56. Ambrosini E., Remoli M.E., Giacomini E. i wsp.: Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines *in vitro* and in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64: 706-715.
 57. Krumbholz M., Theil D., Derfuss T. i wsp.: BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 195-200.
 58. Krumbholz M., Theil D., Steinmeyer F. i wsp.: CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 2007; 190: 72-79.
 59. Pashenkov M., Söderström M., Link H.: Secondary lymphoid organ chemokines are elevated in the cerebrospinal fluid during central nervous system inflammation. *J. Neuroimmunol.* 2003; 135: 154-160.
 60. Simpson J.E., Newcombe J., Cuzner M.L., Woodroffe M.N.: Expression of the interferon- γ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2000; 26: 133-142.
 61. Balashov K.E., Rottman J.B., Weiner H.L., Hancock W.W.: CCR5⁺ and CXCR3⁺ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96: 6873-6878.
 62. Szczuciński A., Losy J.: Long-term effect of IFN- β 1a therapy on CCL2 (MCP-1) chemokine in patients with multiple sclerosis. *Folia Neuropathol.* 2004; 42: 15-18.
 63. Losy J., Michałowska-Wender G., Kurdyńska A., Wender M.: CCL2 (MCP-1) and CCL5 (RANTES) levels in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with Glatiramer Acetate (Copaxone). *Folia Neuropathol.* 2005; 43: 153-155.
 64. Buttmann M., Merzyn C., Rieckmann P.: Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 156: 195-203.
 65. Buttmann M., Goebeler M., Toksoy A. i wsp.: Subcutaneous interferon- β injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction. *J. Neuroimmunol.* 2005; 168: 175-182.
 66. Simpson J., Rezaie P., Newcombe J. i wsp.: Expression of the β -chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J. Neuroimmunol.* 2000; 108: 192-200.
 67. Bielecki B., Mazurek A., Wolinski P., Głabinski A.: Treatment of multiple sclerosis with methylprednisolone and mitoxantrone modulates the expression of CXC Chemokine receptors in PBMC. *J. Clin. Immunol.* 2008; 28: 122-130 [Epub. 25 października 2007 r.].
 68. Eikelenboom M.J., Killestein J., Izeboud T. i wsp.: Chemokine receptor expression on T cells is related to new lesion development in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2002; 133: 225-232.
 69. Sorensen T.L., Sellebjerg F.: Distinct chemokine receptor and cytokine expression profile in secondary progressive MS. *Neurology* 2001; 57: 1371-1376.
 70. Trebst C., Sorensen T.L., Kivisäkk P. i wsp.: CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1701-1710.
 71. Kivisäkk P., Trebst C., Liu Z. i wsp.: T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 129: 510-518.
 72. Jalonon T.O., Pulkkinen K., Ukkonen M. i wsp.: Differential intracellular expression of CCR5 and chemokines in multiple sclerosis subtypes. *J. Neurol.* 2002; 249: 576-583.
 73. Mahad D.J., Lawry J., Howell S.J., Woodroffe M.N.: Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult. Scler.* 2003; 9: 189-198.