

Received: 04.12.2009

Accepted: 08.12.2009

Published: 31.12.2009

Modele doświadczalne stwardnienia rozsianego

Experimental models of multiple sclerosis

Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź

Praca finansowana z grantu SPUB 263/6.PR UE/2006/7

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex*, SM) jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu autoimmunologicznym. Etiologia SM wciąż nie jest poznana. Od początku choroby zachodzą w OUN dwa procesy patologiczne: zapalenie i neurodegeneracja. W reakcji zapalnej pośredniczą autoreaktywne mielinowoswoiste limfocyty T. Końcowym etapem rozwoju SM jest demielinizacja i zniszczenie aksonów, co doprowadza do zaburzeń neurologicznych. Aby zdobyć informacje o mechanizmach rozwoju SM, często wykorzystuje się różne modele doświadczalne tej choroby. Wśród tych modeli należy wymienić myszy *knockout* (tzw. mutanty mielinowe), chemicznie indukowane w OUN zmiany zapalne i wirusowe oraz modele autoimmunizacyjne. Do zwierząt *knockout*, umożliwiających poznanie mechanizmów demielinizacji, zaliczamy m.in. myszy *Shiverer* pozbawione genów dla białka zasadowego mieliny (MBP), myszy *Rumpshaker* i *Jimpy* bez genów dla lipofiliny (PLP) oraz myszy bez glikoproteiny związanej z mieliną (MAG). Użycie różnych toksyn, takich jak kuprizon czy bromek etydyny, również umożliwia badanie mechanizmów powstawania de-/remielinizacji w OUN. Do wirusowych modeli SM zaliczamy modele wywołane wirusem Semliki Forest i wirusem Theilera. Najbardziej znanym i szeroko używanym doświadczalnym modelem zwierzęcym SM jest doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE). Żaden z wymienionych powyżej modeli nie naśladuje wiernie powstawania i przebiegu tej choroby. Mimo to możemy dzięki nim poznawać mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej, które w przyszłości mogą być podstawą do opracowania nowych, skutecznych metod farmakologicznego leczenia SM i innych podobnych chorób.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, wirus Theilera, demielinizacja, modele doświadczalne

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Aetiology of MS is still unknown. Two pathological processes: inflammation and neurodegeneration are present from the beginning of MS. Autoreactive myelin-specific T cells can mediate the inflammatory response. Final stage of the development of MS is demyelination and axonal damage, which leads to the appearance of neurological symptoms. Several experimental models of MS were developed to get information about the mechanisms of the disease development. Those models include knockout mice (known as myelin mutants), chemically induced inflammation in the CNS, viral and autoimmune models. Knockout animals with blocked gene for myelin basic protein (MBP), mice *Rumpshaker* and *Jimpy* without genes for proteolipid protein (PLP), and mice with blocked gene for myelin associated glycoprotein (MAG) have been used to study the mechanisms of demyelination. The use of various toxins such as ethidium bromide or cuprizon also allows the study of the mechanisms of de-/remyelination in the CNS. Viral models of MS can be induced by Semliki Forest virus and Theiler's virus. The well-known and widely used experimental model of MS is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). None of the mentioned above models perfectly initiate development and course of this disease. However, thanks to them the pathological mechanisms leading to development of MS can be studied.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV), demyelination, experimental models

SM JAKO CHOROBA NEURODEGENERACYJNA O PODŁOŻU AUTOIMMUNOLOGICZNYM

Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex*, SM) jest najczęstszą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego (OUN) występującą u ludzi. SM po raz pierwszy zostało opisane przez Jeana-Martina Charcota w 1868 roku jako rzadka choroba neurologiczna tamtych czasów. Obecnie w Polsce choruje na nią około 50-60 tys. osób. Najwyższy wskaźnik zapadalności odnotowują kraje Europy Północnej oraz USA. W innych populacjach schorzenie to występuje rzadziej, a w obszarach tropikalnych praktycznie się go nie spotyka. Choroba dotyka głównie osoby młode, między 20. a 40. rokiem życia, z przewagą zachorowań u kobiet (2:1). Cechą charakterystyczną SM jest jego heterogenność, co oznacza, że nie ma typowego schematu przebiegu klinicznego. Objawy choroby zależą od tego, który z obszarów OUN jest uszkodzony. Typowymi objawami, zwykle niewystępującymi jednocześnie u jednego chorego, są zaburzenia wzroku, problemy z utrzymaniem równowagi, niedowład, zaburzenia napięcia mięśniowego, zaburzenia mowy, męczliwość, zaburzenia funkcji zwieraczy, nadwrażliwość na ciepło, zaburzenia percepcji i zaburzenia emocjonalne.

SM może występować w czterech postaciach klinicznych. Postać remitująco-nawracająca (*relapsing-remitting*, RR) występuje na początku rozwoju schorzenia, odnotowuje się ją u około 85-90% wszystkich pacjentów; RR przebiega z rzutami, między którymi występują okresy remisji choroby. Postać wtórnie postępująca (*secondary progressive*, SP) dotyczy około 80% chorych; po początkowym przebiegu z rzutami następuje stała wtórna progresja choroby. Kolejne dwie postacie SM to postać pierwotnie postępująca (*primary progressive*, PP), dotycząca około 10% pacjentów, i postać postępująco-nawracająca (*progressive-relapsing*, PR), która jest najrzadszą formą SM. Postać PP-SM charakteryzuje się stałą progresją, występującą od początku trwania choroby z epizodami pogorszeń.

Liczne wyniki badań naukowych potwierdzają, że od początku SM zachodzą w OUN pacjenta dwa patologiczne procesy: zapalenie i neurodegeneracja. Proces zapalny uwarunkowany jest patologiczną reakcją immunologiczną skierowaną przeciwko białku mieliny własnego OUN, wiąże się on z rzutami choroby. Neurodegeneracja prawdopodobnie zachodzi niezależnie od zapalenia i może powodować uszkodzenie aksonów, co jest związane z ciągłym pogarszaniem się sprawności fizycznej chorego. Jak dotąd jednoznacznie nie określono, który z tych procesów inicjuje chorobę: czy mielinowoswoiste limfocyty T (proces zapalny) czy też śmierć oligodendrocytów – proces demielinizacyjny z wtórnym uszkodzeniem aksonów (neurodegeneracja).

Uważa się, że choroba zainicjowana jest aktywacją autoreaktywnych limfocytów T uczulonych na składniki mieliny. Mielina to tkanka tłuszczowa izolująca włókna nerwowe OUN, której uszkodzenie zniekształca lub hamuje przekazywanie informacji z mózgu do innych części ciała, co prowadzi do zaburzenia jego prawidłowego funkcjonowania. Autoreaktywne limfocyty T mogą stymulować wzrost ekspresji chemotaktycz-

nych cytokin i cząsteczek adhezyjnych w OUN, co powoduje migrację limfocytów T oraz makrofagów do istoty białej OUN i w konsekwencji prowadzi do wytworzenia ognisk zapalnych i obszarów demielinizacji.

Nie wyklucza się, że śmierć oligodendrocytów, która ma miejsce dość wcześnie w rozwoju SM, może inicjować powstawanie ognisk demielinizacyjnych w OUN nawet przed rozwojem zapalenia⁽¹⁻³⁾. Obecność zapalenia u chorych na SM można w tej hipotezie tłumaczyć na dwa sposoby. Procesy zapalne mogą być inicjowane w miejscach, w których nastąpiła duża utrata mieliny, lub też zapalenie może się pojawiać jako próba walki z niszczącymi procesami inicjowanymi śmiercią oligodendrocytów^(4,5).

Stwierdzono, że w postaci choroby przebiegającej z rzutami dominuje proces zapalny, a w postaci pierwotnie i wtórnie postępującej – procesy neurodegeneracyjne⁽⁶⁾. Wiadomo, że komórkami infiltrującymi OUN są przede wszystkim monocyty, limfocyty T CD4+ i CD8+, nieliczne limfocyty B, neutrofile i eozynofile⁽⁷⁾. Końcowy etap rozwoju SM stanowią procesy degeneracyjne: demielinizacja i zniszczenie aksonów z utratą ich funkcji, co doprowadza do zaburzeń neurologicznych^(8,9).

Uważa się, że o nawrotach choroby i jej postępującym przebiegu decyduje tzw. zjawisko rozprzestrzeniania się epitopów antygenowych. Z danych pochodzących z badań nad zwierzętami wynika, że skład autoreaktywnych limfocytów T nie jest stały – zmienia się wraz z postępem choroby. Wiele badań sugeruje, że nawroty choroby i jej przebieg mogą być możliwe dzięki odpowiedzi limfocytów T na nowe autoantygeny powstające w przebiegu schorzenia. Podczas rozwoju SM dochodzi do zniszczenia składników OUN, których fragmenty są wyłapywane przez makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B i prezentowane antygenowo swoistym limfocytom T. Rozprzestrzenianie się specyficzności odpowiedzi immunologicznej (zbadane na zwierzętach z doświadczalnym autoimmunizacyjnym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego, EAE) może zachodzić od jednego epitopu do drugiego na tym samym białku (tzw. wewnątrzcząsteczkowe rozprzestrzenianie się epitopów, np. od PLP 139-151 do PLP 178-191) oraz od epitopu na jednym białku do innego epitopu na drugim białku (międzykomórkowe rozprzestrzenianie się epitopu, np. od PLP 139-151 do MOG 92-106)⁽¹⁰⁻¹³⁾. Zjawisko rozprzestrzeniania się epitopów to patogenny proces umożliwiający spontaniczne generowanie nowych encefalitogennych limfocytów T zdolnych do indukcji nawrotów i podtrzymywania autoimmunizacyjnego charakteru choroby.

ETIOLOGIA SM

Etiologia choroby nie jest znana. Dużym uznaniem cieszą się trzy teorie powstawania SM, tj. teoria wirusowa, gdzie czynnikiem inicjującym chorobę jest infekcja wirusowa, teoria immunologiczna, w której czynnikiem inicjującym to aktywacja autoreaktywnych limfocytów T, i teoria wirusowo-immunologiczna, gdzie czynnikiem wirusowy inicjuje chorobę, a proces chorobowy ma charakter immunologiczny. Należy też wspomnieć o czynniku genetycznym, gdyż wykazano, że dziedziczenie określonego

typu cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej człowieka (*human leukocyte antigen*, HLA), szczególnie HLA-DR2, związane jest z 4-krotnie częstszym występowaniem tego schorzenia niż przy innym typie HLA. Uważa się, że typ HLA-DR2 może wydajnie prezentować antygeny osłonki mielinowej dziecięcym autoreaktywnym limfocytom T. Dodatkowo wiadomo, że SM występuje znacznie częściej w klimacie umiarkowanym i chłodnym niż gorącym. Jak dotąd nie został wyjaśniony mechanizm działania tego czynnika.

Wskazywano na udział wielu różnych wirusów w zapoczątkowywaniu kaskady patologicznych mechanizmów powodujących rozwój SM. Z mózgu pacjentów z SM wyizolowano kwasy nukleinowe co najmniej 14 wirusów, jednak jak dotąd jednoznacznie nie ustalono, który z nich mógłby doprowadzać do rozwoju SM⁽¹⁴⁾.

Wydaje się, że hipoteza molekularnej mimikry, która znana jest już od 1964 roku, może w znacznym stopniu tłumaczyć różnorodne objawy tej choroby oraz jej etiologię. Molekularna mimikra występuje wtedy, gdy peptydy wirusów⁽¹⁵⁾ lub bakterii⁽¹⁶⁾ wykazują duże podobieństwo pod względem sekwencji i struktury do antygenów własnych organizmu gospodarza, w przypadku SM do jego antygenów mielinowych. Podobieństwo to stymuluje układ odpornościowy do produkcji autoreaktywnych przeciwciał. Fujinami i wsp. udowodnili, że reakcja krzyżowa między epitopami polimerazy wirusa zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus*) a encefalitogennymi epitopami zasadowego białka mielin (*myelin basic protein*, MBP) może spowodować u królików indukcję autoimmunizacyjnego doświadczalnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE)^(15,17). Do reakcji krzyżowej dochodzi na etapie aktywacji autoreaktywnych limfocytów T CD4+, którym w kontekście cząsteczek MHC klasy II zostały zaprezentowane epitopy antygenów. W ten sposób pierwszy raz zademonstrowano możliwość wywołania reakcji (choroby) autoimmunizacyjnej indukowanej peptydem wirusa⁽¹⁷⁾. W kontekście molekularnej mimikry sugeruje się też udział białek szoku cieplnego (*heat shock protein*, HSP) w rozwoju SM. Białka te ulegają ekspresji w warunkach podwyższonej temperatury lub innych czynników występujących w procesie zwalczania infekcji. Odkryto zwiększoną ekspresję α B-kryształiny (białka szoku cieplnego) w miejscu demielinizacji u pacjentów z SM. Białka te cechuje bardzo duży konserwatyzm, co znaczy, że HSP człowieka i bakterii nie różnią się w sposób znaczący. Może się zdarzyć, że wielokrotne infekcje bakteryjne, uczulając gospodarza na swoje HSP, doprowadzają do odpowiedzi przeciwko jego własnym komórkom, w których zaszła ekspresja tych białek.

Liczne eksperymenty na różnych zwierzęcych modelach SM oraz badania krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) pacjentów z SM wskazują, że o powstaniu choroby decydują autoreaktywne limfocyty T CD4+, molekularna mimikra i różne mikroby, takie jak *Chlamydia pneumoniae*, wirus grypy, wirus *Torque teno* (TTV), wirus Epsteina-Barr (EBV), ludzki herpeswirus typu 6. (HHV-6)⁽¹⁸⁻²³⁾.

Będąc chorobą OUN, SM nie może być bezpośrednio badane i do zdobycia informacji o mechanizmach jego powstawania konieczne jest wykorzystywanie różnych modeli doświadczal-

nych tej choroby. Wśród tych modeli należy wymienić tzw. myszy *knockout* (z zablokowanymi genami kodującymi białka mielinę, tzw. mutanty mielinowe), chemicznie indukowane zmiany zapalne, modele wirusowe i autoimmunizacyjne.

MODELE GENETYCZNE SM

Do zwierząt *knockout* (KO) zaliczamy m.in. myszy *Shiverer* pozbawione genów dla białka zasadowego mielin (*myelin basic protein*, MBP), myszy *Rumpshaker* i *Jimpy* bez genów dla lipofiliny (*proteolipid protein*, PLP) oraz myszy bez glikoproteiny związanej z mieliną (*myelin-associated glycoprotein*, MAG). Modele te charakteryzują się przede wszystkim zaburzeniami procesu mielinizacji i służą głównie do poznawania mechanizmów powstawania mielin⁽²⁴⁾. Ponadto obecne są w nich zaburzenia przekazywania sygnałów nerwowych, a w niektórych przypadkach kliniczne objawy choroby.

Myszy *Shiverer* charakteryzują się delecją głównego fragmentu genu kodującego białko MBP, która uniemożliwia jego translację. Jest to mutacja autosomalna recesywna, która u myszy manifestuje się drżeniem podczas chodzenia. OUN takich mutantów nie ulega prawidłowej mielinizacji z powodu niewłaściwej kondensacji cząsteczek mielinę tworzących osłonki aksonów. W obwodowym układzie nerwowym nie obserwuje się takiej nieprawidłowości. Myszy z mutacją *shiverer* żyją średnio 50-100 dni⁽²⁵⁾.

Myszy *Rumpshaker* charakteryzują się punktową mutacją w genie kodującym lipofilinę (PLP). Mutacje w tym genie powodują zaburzenia procesu mielinizacji zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Morfologiczna ocena myszy z mutacją *rumpshaker* wskazuje na całkowity brak mielinizacji aksonów rdzenia kręgowego lub ich otoczenie nieproporcjonalnie cienkimi pochewkami mielinowymi, podczas gdy w nerwie wzrokowym mielinowe osłonki aksonów mają właściwą grubość^(26,27). Badania ultrastruktury mielinę u myszy z badaną mutacją wykazały duże podobieństwo do myszy typu dzikiego. Jedynie niewielka ilość mielinę u mutantów mielinowych wykazuje niewłaściwe ułożenie jej cząsteczek⁽²⁷⁾. Stwierdzono również zwiększone wytwarzanie mielinę wokół krótkich aksonów w przeciwieństwie do długich, z których wiele nie jest pokrytych mieliną⁽²⁸⁾.

Mutacja *jimpy* została po raz pierwszy opisana w 1954 roku⁽²⁹⁾; zachodzi ona, podobnie jak mutacja *rumpshaker*, w genie dla białka lipofiliny. Mutacja ta doprowadza do niewłaściwej kondensacji mielinę, przez co staje się ona fizycznie niestabilna⁽³⁰⁾. Z powodu upośledzonego procesu dojrzewania oligodendrocytów i w konsekwencji ich śmierci liczba dojrzałych komórek glejowych formujących osłonki mielinowe zredukowana jest do około 50%⁽³¹⁾. Jedynie 1-3% aksonów jest otoczonych przez pochewki mielinowe⁽³²⁾. U myszy *Jimpy* stwierdzono również zmniejszoną długość aksonów⁽³³⁾ i ich obrzęk⁽³⁴⁾. Dodatkowo obserwuje się astrocytozę, szczególnie w rdzeniu kręgowym⁽³⁵⁾, ze znaczącym wzrostem kwaśnego włókninowego białka glejowego (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP)⁽³⁶⁾. Fenotypowo myszy z mutacją *jimpy* wykazują różne nieprawidłowości neurologiczne, do których należą drżenie i napady toniczne (skurcze mięśni). Śmierć myszy występuje w 4. tygodniu po poro-

dzie, kiedy to mielinizacja powinna osiągnąć swoje maksimum. MAG uczestniczy w budowaniu osłonki mielinowej tylko w 1% w OUN i w 0,1% w obwodowym układzie nerwowym⁽³⁷⁾. Glikoproteina ta zlokalizowana jest na powierzchni zarówno oligodendrocytów, jak i komórek Schwanna i pośredniczy w interakcjach między komórkami nerwowymi a komórkami glejowymi tworzącymi mielinę⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Myszy bez MAG charakteryzują się zaburzeniami w zapoczątkowaniu procesu formowania osłonek mielinowych, np. wokół aksonu nerwu wzrokowego, oraz integralności mieliny. W obwodowym układzie nerwowym patologiczne zmiany dotyczą jedynie integralności mieliny^(41,42).

MODELE CHEMICZNE SM

Podanie różnych toksyn, takich jak kuprizon czy bromek etyldyny, do OUN prowadzi do powstawania obszarów demielinizacji. Modele te są szeroko stosowane w badaniach mechanizmów powstawania de-/remielinizacji.

Wewnątrzkomorowe wstrzyknięcie bromku etyldyny powoduje u szczurów obrzęk międzykomórkowy naskórka i degenerację oligodendrocytów. Wiele aksonów ulega demielinizacji w ciągu 6 dni po jego podaniu. Zniszczone osłonki mielinowe aksonów komórek nerwowych są fagocytowane przez makrofagi/mikroglej. W modelu tym możliwy jest proces remielinizacji, do którego przyczyniają się komórki Schwanna, ale odbudowane osłonki mielinowe są cienkie⁽⁴³⁾.

Kuprizon jest najlepszym związkiem chemicznym powodującym demielinizację⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Karmienie nim młodych myszy przez kilka tygodni powoduje u nich niemal całkowitą wstępną demielinizację OUN. Proces ten wywołany jest degeneracją oligodendrocytów, ale z częściowym zachowaniem aksonów. Dzięki obecności niezniszczonych aksonów komórek nerwowych może zajść dość niezwykle zjawisko powstawania niedojrzałych komórek glejowych zarówno astrocytarnej, jak i oligodendroglowej natury. Zniszczone w trakcie demielinizacji osłonki mielinowe fagocytowane są przez mikroglej/makrofagi i astrocyty. Wiadomo, że zniszczenie osłonek mielinowych zależne jest częściowo od stężenia kuprizonu⁽⁴⁶⁾.

WIRUSOWE MODELE SM

WIRUS SEMLIKI FOREST (SEMLIKI FOREST VIRUS, SFV)

SFV jest alfawirusem należącym do rodziny *Togaviridae*. Został on po raz pierwszy wyizolowany z ciała komara z Semliki Forest w Ugandzie w 1942 roku. Afryka jest naturalnym miejscem występowania tego wirusa. To właśnie na tym kontynencie może on atakować konie i ludzi. Jego nosicielami są komary. W wielu przypadkach infekcja wirusem charakteryzuje się niewielkim wzrostem temperatury ciała⁽⁴⁸⁾. SFV jest szeroko wykorzystywany w badaniach laboratoryjnych na zwierzętach (głównie myszach) jako model służący do badania szeregu procesów doprowadzających do powstawania różnych neuropatii oraz poznawania mechanizmów indukujących demielinizację w OUN⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

Najczęściej występujące szczepy wirusa to A7 i A7(74), które są odpowiednio wirulentne i niewirulentne dla dorosłych myszy. Wszystkie szczepy wirusa są wirulentne dla noworodków i mysich osesków. Szczep M9 jest wykorzystywany do badania powstawania obszarów demielinizacji⁽⁵²⁾. Wirus podaje się dotrzewnowo 3-tygodniowym myszom, u których jest obecny do 24 godzin, następnie po 48 godzinach jego miano spada i już mniej więcej po 4 dniach wirus nie jest wykrywalny we krwi⁽⁵³⁾. Za pomocą reakcji RT-PCR stwierdzono brak RNA wirusa M9 w mózgu dopiero po 90 dniach⁽⁵⁴⁾.

Skutkiem infekcji wirusem Semliki Forest jest demielinizacja oraz zapalenie opon mózgowych i mózgu. W parenchymie OUN obserwuje się wówczas okołonaczyniowe nacieki z komórek zapalnych widoczne już od 3. dnia po podaniu wirusa⁽⁵⁵⁾, które odpowiadają miejscom infekcji^(56,57). Obszary zniszczenia mieliny powstają również w nerwie wzrokowym; widoczne są także zmiany w transporcie aksonalnym⁽⁵⁸⁾.

WIRUS THEILERA (THEILER'S MURINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS, TMEV)

Wirus Theilera wywołuje wirusowe zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego u myszy (*Theiler's murine encephalomyelitis virus*, TMEV). Został on wyizolowany w 1934 roku przez Maksa Theilera, który otrzymał Nagrodę Nobla za wynalezienie pierwszej skutecznej szczepionki przeciwko żółtej febrze^(59,60). TMEV należy do rodziny *Picornaviridae*. Wirus ten atakuje myszy i szczury, ale chorobę demielinizacyjną wywołuje tylko u myszy. Predysponowane do rozwoju są myszy szczepu SJL/J, u których to po wewnątrzczaszkowym podaniu wirusa występuje dwufazowy przebieg choroby. Podczas pierwszego tygodnia (ostra faza) myszy wykazują zapalenie istoty szarej mózgu i rdzenia kręgowego. Antygen wirusa jest wówczas obecny głównie w neuronach OUN⁽⁶¹⁾. Następnie, mniej więcej miesiąc po podaniu wirusa (faza przewlekła), u myszy stwierdza się nadmierne napięcie (spastyczność) mięśni kończyn, co jest wynikiem demielinizacji w obrębie istoty białej rdzenia kręgowego. Obszary demielinizacji związane są z okołonaczyniową infiltracją komórek jednojądrzastych. Na skutek działania wirusa obserwuje się również zniszczenie aksonów, minimalną remielinizację i postępującą akumulację deficytów neurologicznych. Podczas przewlekłej fazy antygeny wirusa obecne są wewnątrz oligodendrocytów, astrocytów i makrofagów/mikrogleju, ale nie w neuronach^(62,63).

Spośród wirusowych modeli SM powodujących demielinizację najlepiej scharakteryzowany został ten z indukowaną przez wirus Theilera. Model ten doskonale nadaje się do badania interakcji między wirusem, mieliną i układem immunologicznym⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾. Patologie TMEV i SM charakteryzują się dużym podobieństwem; uważa się, że jest to unikatowy, jeden z nielicznych modeli naśladujących swym przebiegiem postępującą postacią SM: pierwotnie postępującą (PP), wtórnie postępującą (SP) i remitująco-nawracającą (RR)^(67,68). Kliniczny przebieg wielu modeli SM jest ostry jednofazowy lub remitująco-nawracający. Służą one głównie do badania tylko postaci RR-SM. Dokładny mechanizm demielinizacji powodowanej infekcją

TMEV nie jest znany. Istnieją dwie główne hipotezy: wirus doprowadza bezpośrednio do zniszczenia komórek tworzących mielinę, czyli oligodendrocytów, lub uruchamia mechanizmy immunologiczne. Jedynie infekcja żywym wirusem powoduje demielinizację⁽⁶⁹⁾. Wszystkie komórki immunologiczne, włączając w to limfocyty T i B oraz makrofagi, odgrywają istotną rolę w tym procesie^(64,65). W przeciwieństwie do EAE⁽⁶⁵⁾ i innych modeli wirusowych SM⁽⁷⁰⁾ adopcyjny transfer komórek immunologicznych od myszy zainfekowanych wirusem TMEV do syngenicznych myszy (biorców) nie indukuje u nich demielinizacji⁽⁷¹⁾.

DOŚWIADCZALNE AUTOIMMUNIZACYJNE ZAPALENIE MÓZGU I RDZENIA KRĘGOWEGO (EAE)

HISTORIA ROZWOJU EAE

SM jest chorobą spontanicznie występującą tylko u ludzi. Immunizacja ssaków, w tym także ludzi, białkami pochodzącymi z OUN nie indukuje SM, ale rozległe zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego. Zauważono to już pod koniec XIX wieku, kiedy to podawano ludziom szczepionki sporządzone z króliczych rdzeni kręgowych zakażonych wirusem wścieklizny. Powstałe neurologiczne komplikacje spowodowane były niezupełnym oczyszczeniem szczepionki z tkanki nerwowej królika. Stosunkowo niedawno zaobserwowano, że podanie szczepionki składającej się z amyloidu beta w chorobie Alzheimera spowodowało zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego⁽⁷²⁾. Kolejnym ogromnym krokiem w rozwoju modeli zwierzęcych chorób demielinizacyjnych było wykazanie przez RIVERSA i wsp., że wielokrotnie domięśniowe podawanie małpom ekstraktów mózgu królika prowadzi u nich do zaburzenia neurologicznego⁽⁷³⁾. Immunohistochemiczne badania mózgow tych małp ujawniły obszary zniszczenia mieliny przez okołonaczyniowe nacieki komórek jednojądrzastych. W modelu zaproponowanym przez RIVERSA indukcja demielinizacji u małp wymagała wielu immunizacji ekstraktami z OUN. Jednak już w latach 40. XX wieku wykazano, że choroba może być wywołana przez pojedynczą immunizację antygenem mózgu zemułgowanym z adiuwantem zawierającym zabite bakterie *Mycobacterium tuberculosis*^(74,75). Wywołanie demielinizacyjnej choroby OUN u myszy przez OLITSKY'EGO w 1949 roku pozwoliło uznać EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) za zwierzęcy model SM.

EAE JAKO ZWIERZĘCY MODEL SM

Doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) jest najbardziej znanym i szeroko stosowanym już od około 50 lat doświadczalnym modelem zwierzęcym SM. EAE można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów czy też małp naczelnych (m.in. makaków i koczokodanów), choć głównie wykorzystywane są w tym celu myszy i szczury. Istnieje wiele różnych odmian EAE wykazujących znaczną różnorodność pod względem klinicznym i histopatologicznym. Różnice

te wynikają z wykorzystania różnych zwierząt eksperymentalnych, różnych autoantygenów mielinowych wybranych do jego wywołania oraz odmiennych sposobów immunizacji zwierząt. Duże podobieństwo między SM i EAE wywołanym u myszy obserwuje się na poziomie zmian histopatologicznych w OUN.

EAE u szczurów i niektórych szczepów myszy może mieć przebieg monofazowy, tzn. objawia się jednym, ostrym atakiem choroby, po którym zwierzę może spontanicznie wyzdrowieć, objawy choroby mogą pozostać lub może nastąpić śmierć myszy. Ten rodzaj EAE charakterystyczny jest m.in. dla szczurów szczepu *Lewis* i myszy szczepu *SJL/J*. EAE może wykazywać również wielofazowy przebieg, mogą pojawić się wtedy tzw. rzuty (nasilenie objawów) i remisje (zmniejszenie objawów) choroby – model określa się wówczas jako przewlekłe nawracające doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (*chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*, ChREAE). Taki rodzaj EAE jest charakterystyczny dla myszy (*SJL/SWR*)F1 i najbardziej przypomina nawracające postaci SM⁽⁷⁶⁾. Zatem nazwa EAE nie jest zarezerwowana dla jednego modelu, ale dla grupy modeli, które wykazują różny stopień podobieństwa do SM.

Immunizacja zwierząt eksperymentalnych białkami mieliny powoduje stymulację mielinowoswoistych autoreaktywnych limfocytów T głównie w węzłach chłonnych w okolicy miejsca iniekcji. Takie autoreaktywne limfocyty T są również naturalnym składnikiem immunologicznego repertuaru zdrowego organizmu. Autoreaktywne mielinowoswoiste limfocyty T występują w układzie limfatycznym przez całe życie i nie atakują OUN. Stają się one autodestrukcyjne dopiero na skutek aktywacji po podaniu białek mieliny z adiuwantem. Adiuwanty wzmagają immunogenność poprzez tworzenie prozapalnego środowiska naśladującego infekcję bakteryjną.

SPOSOBY WYWOŁYWANIA EAE

Do wywołania EAE stosuje się różne autoantygeny z OUN. Powodują one odpowiedź immunologiczną, a także chorobę porażenną u wrażliwych zwierząt. Są nimi głównie: glikoproteina oligodendrocytów (*myelin-oligodendrocyte glycoprotein*, MOG), zasadowe białko mieliny (*myelin basic protein*, MBP) oraz lipofilina (*proteolipid protein*, PLP), a także glikoproteina związana z mieliną (*myelin-associated glycoprotein*, MAG) i białko S-100. MOG stanowi zaledwie 0,01-0,05% białek mieliny. Jest on głównym białkiem strukturalnym błony komórkowej oligodendrocytów i występuje wyłącznie w OUN⁽⁷⁷⁾. MOG jest umiejscowiony jedynie w zewnętrznej warstwie osłonki mielinowej, co czyni go idealnym celem ataku immunologicznego. Jest jedynym autoantygenem zdolnym do jednoczesnej indukcji odpowiedzi komórkowej i humoralnej w przebiegu EAE u gryzoni^(78,79) oraz naczelnych⁽⁸⁰⁾. Stwierdzono, że obecność przeciwciał anti-MOG wiąże się bezpośrednio z procesem demielinizacji^(79,80). Wykazano, że pasywny transfer przeciwciał anti-MOG u gryzoni⁽⁷⁹⁾ i naczelnych⁽⁸⁰⁾ z EAE pierwotnie indukowanym z użyciem MBP prowadzi do zaostrzenia objawów choroby i zmiany jej charakteru z zapalnego na demielinizacyjny. Stwierdzono, że przeciwciała anti-MOG mogą brać udział w destrukcji mie-

liny w wyniku aktywacji komplementu i komórek cytotoksycznych^(81,82). W niektórych szczepach myszy w rozwoju choroby po podaniu MOG pośredniczą głównie limfocyty T CD8+, nie limfocyty T CD4+^(83,84).

MBP występuje w cytoplazmie oligodendrocytów i stanowi około 30% białek osłonki mielinowej ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego⁽⁸⁵⁾. Myszy C57BL/6 są odporne na indukcję EAE peptydem MBP⁽⁸⁶⁾, w przeciwieństwie do myszy SJL/J wrażliwych na ten autoantygen^(87,88).

PLP jest integralnym białkiem błonowym oligodendrocytów, stanowi około 50% białek osłonki mielinowej OUN⁽³⁰⁾. Peptydem tym u myszy SJL/J można wywołać jednofazowe EAE⁽²⁶⁾, w którym powstają liczne ogniska zapalne w OUN, ale nie dochodzi do destrukcji mieliny i oligodendrocytów. Chroniczną postać EAE można uzyskać poprzez immunizację myszy (SJL/SWR) F1 peptydem PLP 139-151⁽⁷⁶⁾.

Antygeny mielinowe, takie jak MAG i enzym fosfodiesteraza nukleotydowa (CNP-aza, *cyclic nucleotide phosphodiesterase*, *CNPase*), która jest markerem oligodendrocytów i trzecim pod względem występowania białkiem mieliny, zaliczane są do potencjalnych autoantygenów w SM, gdyż mogą indukować zapalenie mózgu u zwierząt. Chociaż odpowiedź immunologiczna na enzym CNP-azę u pacjentów z SM nie jest jeszcze dobrze zdefiniowana, to reakcja krzyżowa w odpowiedzi na białka szoku cieplnego (HSP) i CNP-azę może sugerować mechanizm indukcji odpowiedzi autoimmunizacyjnej⁽⁸⁹⁾. Białka HSP i limfocyty T zdolne do ich rozpoznawania zostały odkryte w miejscach demielinizacji u pacjentów z SM.

Białko S-100, autoantygen OUN, jest białkiem charakterystycznym dla astrocytów. Immunizując nim szczury szczepu *Lewis*, można wywołać u nich zapalenie mózgu z niewielkimi obszarami demielinizacji⁽⁹⁰⁾.

EAE może być też wywołane przez adoptywny transfer do syngenicznych biorców limfocytów Th (CD4+) autoreaktywnych w stosunku do antygenów mieliny^(91,92). Aktywowane limfocyty T migrują do OUN w ciągu 24 godzin^(93,94), ale tylko limfocyty T swoiste dla neuroantygeny mogą pozostawać w OUN⁽⁹⁵⁾. Postać choroby wywołana za pośrednictwem adoptywnego transferu komórek efektorowych została określona mianem pasywnej (*passive transfer EAE*) w odróżnieniu od aktywnej postaci EAE, indukowanej immunizacją samym antygenem z adiuwantem (*active EAE*). Podanie takich limfocytów zdrowej myszy i rozwój u niej EAE potwierdza autoimmunizacyjny charakter tego modelu.

PATOGENEZA EAE

W odróżnieniu od SM etiologia EAE jest zdefiniowana. Jest to choroba autoimmunizacyjna wywołana immunizacją czynną autoantygenem lub bierną poprzez transfer limfocytów efektorowych uczulonych na ten autoantygen. Za rozwój choroby odpowiedzialne są swoiste dla składników mieliny limfocyty Th1 (komórki CD4+), które uwalniają cytokiny pozapalne, takie jak IFN- γ , IL-2, TNF- β ⁽⁹²⁾. W patogenezę EAE zaangażowane są również limfocyty Th2, limfocyty Tc (komórki CD8+), makrofagi, limfocyty B i prawdopodob-

nie komórki NK (*natural killer*). Autoreaktywne limfocyty T rozpoznają antygeny mieliny, które mogą być prezentowane przez okołonaczyniowe makrofagi bariery krew-mózg^(18,96). Po aktywacji limfocyty T uwalniają cytokiny i chemokiny, które zmieniają ekspresję cząsteczek adhezyjnych na otaczających komórkach, zwiększa się przepuszczalność bariery krew-mózg, w wyniku czego dochodzi do rekrutacji komórek zapalnych z krwi do parenchymy OUN. Encefalitogenne limfocyty T powodują początkowo tylko zmiany zapalne, bez rozległej demielinizacji.

CZY EAE JEST DOBRYM DOŚWIADCZALNYM MODELEM SM?

Badania immunohistochemiczne wykazują obecność limfocytów T w OUN zarówno w przebiegu EAE, jak i u pacjentów z SM. W przypadku EAE indukowanego MBP lub PLP limfocyty T CD4+ występują głównie w okołonaczyniowych regionach ognisk zapalnych w OUN. W SM natomiast na patologię choroby składają się zarówno miejsca z zapaleniem oraz demielinizacją, jak i zmiany neurodegeneracyjne. Wiadomo, że w ogniskach zapalnych u pacjentów z SM występują przede wszystkim monocyty oraz limfocyty T CD4+ i CD8+⁽⁷⁾, a nawet stwierdza się przewagę limfocytów T CD8+ nad limfocytami T CD4+^(97,98). Wykazano, że limfocyty T CD8+ odgrywają istotną rolę w niszczeniu tkanek OUN⁽⁸⁰⁾. W rozwoju EAE wywołanym peptydem MOG pośredniczą głównie limfocyty T CD8+. Takiej reaktywności limfocytów T CD8+ w stosunku do MOG nie stwierdzono u ludzi^(80,99).

Z tego wynika, że EAE nie jest doskonałym modelem SM i służy bardziej do badania procesu zapalnego niż neurodegeneracji. Mimo to model ten umożliwia wstępne badanie różnych sposobów leczenia SM⁽¹⁰⁰⁻¹⁰³⁾. Ze względu na bezpośrednie przeniesienie wyników badań z EAE na SM pojawił się szereg krytycznych opinii na temat tego modelu. Stwierdzono, że jeśli chodzi o badania nad sposobami leczenia SM, to wyniki uzyskane na tym modelu należy oceniać ostrożnie^(101,102).

Przez wiele lat leki stosowane w leczeniu SM nie były wystarczająco skuteczne. Wiadomo, że różne preparaty stosowane u zwierząt z EAE znacznie zmniejszające objawy tego modelu zwykle nie sprawdzają się w badaniach klinicznych^(101,102). Dzieje się tak często z powodu nieodpowiedniej dawki lub też stosowania leku zbyt późno. Jednak wprowadzenie takich leków, jak octan glatirameru (*glatiramer acetate*)⁽¹⁰⁴⁾ i Tysabri (natalizumab)⁽⁸⁷⁾, również testowanych na zwierzętach z EAE, daje nadzieję, że model ten może być przydatny. Octan glatirameru zmniejsza częstość rzutów SM, ale tylko nieznacznie wpływa na progresję choroby⁽¹⁰⁵⁾. Należy pamiętać, że eksperymenty na zwierzętach służą głównie do oceny skuteczności działania danego leku, a nie skupiają się na badaniu ich skutków ubocznych. Zwykle grupy badanych zwierząt są zbyt małe, aby ocenić możliwość wystąpienia rzadkich objawów ubocznych. Ponadto zwierzęta laboratoryjne hodowane są w sterylnych warunkach, bez kontaktu z patogenami, dlatego niektóre uboczne skutki działania mogą nie być widoczne.

Reasumując, doświadczalne modele SM są bardzo przydatne, bo dzięki nim możemy poznawać mechanizmy patogenetyczne tej choroby, ponadto dają one możliwość opracowania nowych, skutecznych metod farmakologicznego leczenia SM.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Fernando K.T., McLean M.A., Chard D.T. i wsp.: Elevated white matter myo-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127: 1361-1369.
2. Ranjeva J.P., Pelletier J., Confort-Gouny S. i wsp.: MRI/MRS of corpus callosum in patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2003; 9: 554-565.
3. Zivadinov R., Bakshi R.: Role of MRI in multiple sclerosis I: inflammation and lesions. *Front. Biosci.* 2004; 9: 665-683.
4. Rodriguez M., Lucchinetti C.F.: Is apoptotic death of the oligodendrocyte a critical event in the pathogenesis of multiple sclerosis? *Neurology* 1999; 53: 1615-1616.
5. Steinman L.: Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 762-764.
6. Lassmann H.: New concepts on progressive multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2007; 7: 239-244.
7. Hickey W.F., Cohen J.A., Burns J.B.: A quantitative immunohistochemical comparison of actively versus adoptively induced experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Cell. Immunol.* 1987; 109: 272-281.
8. Bjartmar C., Trapp B.D.: Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox. Res.* 2003; 5: 157-164.
9. Bø L., Vedeler C.A., Nyland H. i wsp.: Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult. Scler.* 2003; 9: 323-331.
10. Cross A.H., Tuohy V.K., Raine C.S.: Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cell. Immunol.* 1993; 146: 261-269.
11. Lehmann P.V., Forsthuber T., Miller A., Sercarz E.E.: Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992; 358: 155-157.
12. Mor F., Cohen I.R.: Shifts in the epitopes of myelin basic protein recognized by Lewis rat T cells before, during, and after the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 2199-2206.
13. Perry L.L., Barzaga-Gilbert E., Trotter J.L.: T cell sensitization to proteolipid protein in myelin basic protein-induced relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 1991; 33: 7-15.
14. Alperovitch A., Berr C., Cambon-Thomsen A. i wsp.: Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. *Hum. Immunol.* 1991; 31: 94-99.
15. Fujinami R.S., Oldstone M.B., Wroblewska Z. i wsp.: Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80: 2346-2350.
16. Zabriskie J.B.: Rheumatic fever: a model for the pathological consequences of microbial-host mimicry. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1986; 4: 65-73.
17. Fujinami R.S., Oldstone M.B.: Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; 230: 1043-1045.
18. Croxford J.L., Anger H.A., Miller S.D.: Viral delivery of an epitope from *Haemophilus influenzae* induces central nervous system autoimmune disease by molecular mimicry. *J. Immunol.* 2005; 174: 907-917.
19. Lang H.L., Jacobsen H., Ikemizu S. i wsp.: A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 940-943.
20. Markovic-Plese S., McFarland H.F.: Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2001; 1: 257-262.
21. Sospedra M., Zhao Y., zur Hausen H. i wsp.: Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog.* 2005; 1: e41.
22. Sriram S., Stratton C.W., Yao S. i wsp.: *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 6-14.
23. Tejada-Simon M.V., Zang Y.C., Hong J. i wsp.: Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2003; 53: 189-197.
24. Nave K.A.: Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J. Neurosci. Res.* 1994; 38: 607-612.
25. Readhead C., Hood L.: The dysmyelinating mouse mutations shiverer (*shi*) and myelin deficient (*shim^{md}*). *Behav. Genet.* 1990; 20: 213-234.
26. Fanarraga M.L., Griffiths I.R., McCulloch M.C. i wsp.: Rumpshaker: an X-linked mutation causing hypomyelination: developmental differences in myelination and glial cells between the optic nerve and spinal cord. *Glia* 1992; 5: 161-170.
27. Griffiths I.R., Scott I., McCulloch M.C. i wsp.: Rumpshaker mouse: a new X-linked mutation affecting myelination: evidence for a defect in PLP expression. *J. Neurocytol.* 1990; 19: 273-283.
28. Edgar J.M., McLaughlin M., Barrie J.A. i wsp.: Age-related axonal and myelin changes in the *rumpshaker* mutation of the *Pfp* gene. *Acta Neuropathol.* 2004; 107: 331-335.
29. Phillips R.J.: Jimpy, a new totally sexlinked gene in the house mouse. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungslehre.* 1954; 86: 322-326.
30. Boison D., Büsow H., D'Urso D. i wsp.: Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J. Neurosci.* 1995; 15: 5502-5513.
31. Knapp P.E., Skoff R.P., Redstone D.W.: Oligodendroglial cell death in jimpy mice: an explanation for the myelin deficit. *J. Neurosci.* 1986; 6: 2813-2822.
32. Duncan I.D., Hammang J.P., Goda S., Quarles R.H.: Myelination in the jimpy mouse in the absence of proteolipid protein. *Glia* 1989; 2: 148-154.
33. Robain O.: The jimpy mouse. *Acta Zool. Pathol. Antwerp.* 1977; (68): 68-92.
34. Rosenfeld J., Freidrich V.L. Jr: Axonal swellings in jimpy mice: does lack of myelin cause neuronal abnormalities? *Neuroscience* 1983; 10: 959-966.
35. Farkas-Bargeton E., Robain O., Mandel P.: Abnormal glial maturation in the white matter in Jimpy mice. An optical study. *Acta Neuropathol.* 1972; 21: 272-281.
36. Jacque C., Lachapelle F., Collier P. i wsp.: Accumulation of GFA, the monomeric precursor of the gliofilaments, during development in normal mice and dysmyelinating mutants. *J. Neurosci. Res.* 1980; 5: 379-385.
37. Trapp B.D.: Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990; 605: 29-43.
38. Bartsch U., Kirchhoff F., Schachner M.: Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J. Comp. Neurol.* 1989; 284: 451-462.
39. Owens G.C., Bunge R.P.: Evidence for an early role for myelin-associated glycoprotein in the process of myelination. *Glia* 1989; 2: 119-128.

40. Trapp B.D., Andrews S.B., Cootauco C., Quarles R.: The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 2417-2426.
41. Montag D., Giese K.P., Bartsch U. i wsp.: Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 1994; 13: 229-246.
42. Schachner M., Bartsch U.: Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 2000; 29: 154-165.
43. Yajima K., Suzuki K.: Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab. Invest.* 1979; 41: 385-392.
44. Hiremath M.M., Saito Y., Knapp G.W. i wsp.: Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* 1998; 92: 38-49.
45. Love S.: Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphologic observations. *J. Neurol. Sci.* 1988; 84: 223-237.
46. Ludwin S.K.: Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab. Invest.* 1978; 39: 597-612.
47. McMahon E.J., Suzuki K., Matsushima G.K.: Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 2002; 130: 32-45.
48. Mathiot C.C., Grimaud G., Garry P. i wsp.: An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990; 42: 386-393.
49. Atkins G.J., Sheahan B.J., Dimmock N.J.: Semliki Forest virus infection of mice: a model for genetic and molecular analysis of viral pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 395-408.
50. Fazakerley J.K., Buchmeier M.J.: Pathogenesis of virus-induced demyelination. *Adv. Virus Res.* 1993; 42: 249-324.
51. Fazakerley J.K., Walker R.: Virus demyelination. *J. Neurovirology.* 2003; 9: 148-164.
52. Barrett P.N., Sheahan B.J., Atkins G.J.: Isolation and preliminary characterization of Semliki Forest virus mutants with altered virulence. *J. Gen. Virol.* 1980; 49: 141-147.
53. Pusztai R., Gould E.A., Smith H.: Infection patterns in mice of an avirulent and virulent strain of Semliki Forest virus. *Br. J. Exp. Pathol.* 1971; 52: 669-677.
54. Donnelly S.M., Sheahan B.J., Atkins G.J.: Long-term effects of Semliki Forest virus infection in the mouse central nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1997; 23: 235-241.
55. Parsons L.M., Webb H.E.: Virus titres and persistently raised white cell counts in cerebrospinal fluid in mice after peripheral infection with demyelinating Semliki Forest virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1982; 8: 395-401.
56. Morris M.M., Dyson H., Baker D. i wsp.: Characterization of the cellular and cytokine response in the central nervous system following Semliki Forest virus infection. *J. Neuroimmunol.* 1997; 74: 185-197.
57. Subak-Sharpe I., Dyson H., Fazakerley J.: In vivo depletion of CD8⁺ T cells prevents lesions of demyelination in Semliki Forest virus infection. *J. Virol.* 1993; 67: 7629-7633.
58. Tremain K.E., Ikeda H.: Physiological deficits in the visual system of mice infected with Semliki Forest virus and their correlation with those seen in patients with demyelinating disease. *Brain* 1983; 106: 879-895.
59. Bendiner E.: Max Theiler: yellow jack and the jackpot. *Hosp. Pract. (Off. Ed.)* 1988; 23: 211-212, 214-215, 219-222 passim.
60. Theiler M.: Spontaneous encephalomyelitis of mice – a new virus disease. *Science* 1934; 80: 122.
61. Tsunoda I., Iwasaki Y., Terunuma H. i wsp.: A comparative study of acute and chronic diseases induced by two subgroups of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Acta Neuropathol.* 1996; 91: 595-602.
62. Knobler R.L., Rodriguez M., Lampert P.W., Oldstone M.B.: Virologic models of chronic relapsing demyelinating disease. *Acta Neuropathol. Suppl.* 1983; 9: 31-37.
63. Rodriguez M.: Virus-induced demyelination in mice: "dying back" of oligodendrocytes. *Mayo Clin. Proc.* 1985; 60: 433-438.
64. Monteyne P., Bureau J.F., Brahic M.: The infection of mouse by Theiler's virus: from genetics to immunology. *Immunol. Rev.* 1997; 159: 163-176.
65. Tsunoda I., Fujinami R.S.: Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55: 673-686.
66. Tsunoda I., Fujinami R.S.: Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin. Immunopathol.* 2002; 24: 105-125.
67. Lublin F.D., Reingold S.C.: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
68. Tsunoda I., Kuang L.Q., Theil D.J., Fujinami R.S.: Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2^s mouse strains. *Brain Pathol.* 2000; 10: 402-418.
69. Tolley N.D., Tsunoda I., Fujinami R.S.: DNA vaccination against Theiler's murine encephalomyelitis virus leads to alterations in demyelinating disease. *J. Virol.* 1999; 73: 993-1000.
70. Watanabe R., Wege H., ter Meulen V.: Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* 1983; 305: 150-153.
71. Barbano R.L., Dal Canto M.C.: Serum and cells from Theiler's virus-infected mice fail to injure myelinating cultures or to produce in vivo transfer of disease. The pathogenesis of Theiler's virus-induced demyelination appears to differ from that of EAE. *J. Neurol. Sci.* 1984; 66: 283-293.
72. Broytman O., Malter J.S.: Anti-Aβ: the good, the bad, and the unforeseen. *J. Neurosci. Res.* 2004; 75: 301-306.
73. Rivers T.M., Sprunt D.H., Berry G.P.: Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 1933; 58: 39-53.
74. Kabat E.A., Wolf A., Bezer A.E.: The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.* 1947; 85: 117-130.
75. Morgan I.M.: Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.* 1947; 85: 131-140.
76. Glabinski A.R., Tani M., Tuohy V.K., Ransohoff R.M.: Murine experimental autoimmune encephalomyelitis: a model of immune-mediated inflammation and multiple sclerosis. *Methods Enzymol.* 1997; 288: 182-190.
77. Amiguet P., Gardinier M.V., Zanetta J.P., Matthieu J.M.: Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 1992; 58: 1676-1682.
78. Bischof F., Bins A., Dürr M. i wsp.: A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response. *J. Immunol.* 2004; 173: 600-606.
79. Schluesener H.J., Sobel R.A., Linington C., Weiner H.L.: A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* 1987; 139: 4016-4021.
80. Koehler N.K., Genain C.P., Giesser B., Hauser S.L.: The human T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein

- tein: a multiple sclerosis family-based study. *J. Immunol.* 2002; 168: 5920-5927.
81. Brehm U., Piddlesden S.J., Gardinier M.V., Linington C.: Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J. Neuroimmunol.* 1999; 97: 9-15.
 82. Morris-Downes M.M., Smith P.A., Rundle J.L. i wsp.: Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J. Neuroimmunol.* 2002; 125: 114-124.
 83. Huseby E.S., Liggitt D., Brabb T. i wsp.: A pathogenic role for myelin-specific CD8⁺ T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 669-676.
 84. Sun D., Whitaker J.N., Huang Z. i wsp.: Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 2001; 166: 7579-7587.
 85. Brunner C., Lassmann H., Waehneltd T.V. i wsp.: Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J. Neurochem.* 1989; 52: 296-304.
 86. Linker R.A., Gold R.: MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 2004; 173: 2896.
 87. Kent S.J., Karlik S.J., Cannon C. i wsp.: A monoclonal antibody to $\alpha 4$ integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 1995; 58: 1-10.
 88. Pettinelli C.B., Fritz R.B., Chou C.H., McFarlin D.E.: Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. *J. Immunol.* 1982; 129: 1209-1211.
 89. Rösener M., Muraro P.A., Riethmüller A. i wsp.: 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a novel candidate autoantigen in demyelinating diseases. *J. Neuroimmunol.* 1997; 75: 28-34.
 90. Kojima K., Berger T., Lassmann H. i wsp.: Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 β molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 817-829.
 91. Mokhtarian F., McFarlin D.E., Raine C.S.: Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice. *Nature* 1984; 309: 356-358.
 92. Pettinelli C.B., McFarlin D.E.: Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.* 1981; 127: 1420-1423.
 93. Hickey W.F.: Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1991; 1: 97-105.
 94. Hickey W.F., Hsu B.L., Kimura H.: T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 1991; 28: 254-260.
 95. Hickey W.F.: Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin. Immunol.* 1999; 11: 125-137.
 96. Tran E.H., Hoekstra K., van Rooijen N. i wsp.: Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J. Immunol.* 1998; 161: 3767-3775.
 97. Hauser S.L., Bhan A.K., Gilles F. i wsp.: Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 1986; 19: 578-587.
 98. Lassmann H., Ransohoff R.M.: The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] reappraisal. *Trends Immunol.* 2004; 25: 132-137.
 99. Van der Aa A., Hellings N., Bernard C.C. i wsp.: Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls. *J. Neuroimmunol.* 2003; 137: 164-176.
 100. Gold R., Linington C., Lassmann H.: Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.
 101. Ransohoff R.M.: EAE: pitfalls outweigh virtues of screening potential treatments for multiple sclerosis. *Trends Immunol.* 2006; 27: 167-168.
 102. Sriram S., Steiner I.: Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2005; 58: 939-945.
 103. Steinman L., Zamvil S.S.: How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2006; 60: 12-21.
 104. Lisak R.P., Zweiman B., Blanchard N., Rorke L.B.: Effect of treatment with Copolymer 1 (Cop-1) on the in vivo and in vitro manifestations of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *J. Neurol. Sci.* 1983; 62: 281-293.
 105. Munari L., Lovati R., Boiko A.: Therapy with glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2004; (1): CD004678.