HEMOKINI I HEMOKINSKI RECEPTORI U PATOGENEZI MULTIPLE SKLEROZE

Ljiljana Stojković¹, Maja Živković¹

¹Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Beograd

CHEMOKINES AND CHEMOKINE RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Ljiljana Stojkovic¹, Maja Zivkovic¹

¹Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, “Vinca” Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SAŽETAK

Multipla skleroza (MS) jeste hronična inflamatorna i autoimunska, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Migracija autoreaktivnih T-limfocita u tkivo CNS jedan je od ključnih procesa koji karakterišu patogenezu MS i koji dovode do stvaranja inflamatornih demijelinizirajućih lezija u CNS. Hemokini predstavljaju familiju citokina. To su solubilni proteini malih molekulskih masa, koji ostvaruju dejstvo na ciljane ćelije vezivanjem za membranske hemokinske receptore. U dosadašnjim studijama na eksperimentalnom modelu MS i u eksperimentalnim kliničkim studijama utvrđeno je da važnu kariku u patogenezi MS čine brojni hemokini i hemokinski receptori, koje sintetišu ćelije CNS i različite populacije leukocita. Esencijalna uloga hemokina u patogenezi MS jeste da stimulišu migraciju perifernih leukocita u tkivo CNS. U kliničko-farmakološkim studijama pokazano je da uticaj na ekspresiju hemokina i hemokinskih receptora predstavlja jedan od mehanizama delovanja farmakoloških imunomodulatornih agenasa koji se primenjuju u lečenju MS. Teško je izdvojiti pojedinačni farmakološki agens koji trajno efikasno suprimira bolest, a jedan od razloga za to jeste kompleksnost mreže hemokina i hemokinskih receptora koju uzrokuje kako njihova brojnost, tako i višestruke funkcije koje imaju. Proizvodnja poboljšanih terapeutika u budućnosti omogućila bi da oni, delujući preko pojedinačnih komponenata složene mreže hemokina i hemokinskih receptora, selektivno utiču na migratorna svojstva populacija patogenih leukocita, bez narušavanja funkcija ostalih komponenata imunskog sistema.

KLJUČNE REČI: multipla skleroza; hemokini; hemokinski receptori; centralni nervni sistem; leukociti; terapija.

MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza (MS) jeste kompleksna, hronična, inflamatorna i autoimunska bolest centralnog nervnog sistema (CNS) i jedan je od najčešćih uzročnika neurološkog deficita kod mladih odraslih osoba (1). Na osnovu kliničkog toka definisane su dve osnovne forme bolesti: relapsno-remitentna (bez sekundarno-progresivne faze ili sa njom) i primarno-progresivna (2). Ključni procesi prilikom nastanka i progresije MS jesu:

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and autoimmune, demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Migration of autoreactive T lymphocytes into the CNS is one of the key processes that characterize the pathogenesis of MS and lead to the formation of inflammatory demyelinating CNS lesions. Chemokines represent a family of cytokines. They are low molecular weight soluble proteins, which affect target cells by binding to membrane chemokine receptors. Previous studies on experimental model of MS and experimental clinical studies confirmed that numerous chemokines and chemokine receptors, synthesized by CNS cells and various leukocyte populations, are an important component in the pathogenesis of MS. The essential role of chemokines in MS pathogenesis is to stimulate the migration of peripheral leukocytes into the CNS. In clinical pharmacological studies, it was demonstrated that the impact on expression of chemokines and chemokine receptors represents one of the mechanisms of action of pharmacological immunomodulatory agents used in the treatment of MS. It is difficult to allocate a pharmacological agent that permanently effectively suppresses the disease, and one of the reasons for that is complexity of the network of chemokines and chemokine receptors, in terms of their multitude and their variety of functions. Improved therapeutics that would be produced in the future, by acting through the individual components of complex network of chemokines and chemokine receptors, would selectively influence the migratory properties of pathogenic leukocyte populations, without compromising the functions of other components of the immune system.

KEY WORDS: multiple sclerosis; chemokines; chemokine receptors; central nervous system; leukocytes; therapy.

inflamacija, demijelinizacija, neurodegeneracija i gliozu u tkivu CNS (3). Usled narušavanja krvno-moždane barijere, leukociti periferne krvi prodiru kroz zid krvnih sudova u nervno tkivo i indukuju inflamaciju i demijelinizaciju (3). Na ovaj način nastaju plakovi koji predstavljaju akutne inflamatorne i demijelinizirajuće lezije u CNS i glavno histopatološko obeležje MS. Tokom vremena, plakovi evoluiraju i u njima intenzitet inflamacije opada, dok astrociti proliferišu stvarajući ožiljno tkivo. Različite molekularne komponente, kao što

su citokini, adhezivni proteini, metaloproteinaze matriksa, slobodni radikali i faktori rasta, uključene su u regulaciju procesa koji uzrokuju nastanak i evoluciju plakova u CNS (3, 4).

U nastanku akutnih inflamatornih plakova u MS od naročitog značaja su proinflamatorni autoreaktivni CD4+ pomoćnički T-limfociti (engl. *T helper*, Th) tipa 1, koji specifično prepoznaju određene antigene mijelina i tako započinju autoimunski odgovor u CNS (5). Th1 limfociti čine funkcionalnu subpopulaciju pomoćničkih T-limfocita, čija je osnovna uloga da podstiču funkciju fagocita u odbrani od infektivnih agenasa (6). Jedna od vodećih hipoteza koja objašnjava neadekvatnu aktivaciju naivnih autoreaktivnih T-limfocita u autoimunskim bolestima zasnovana je na „molekularnoj mimikriji“: infekcija ciljnog tkiva indukuje urođeni imunski odgovor, tokom koga antigenprezentujuće ćelije fagocituju mikroorganizam i zatim prezentuju mikrobnog antigen. U ovom procesu mogu da se aktiviraju naivni autoreaktivni T-limfociti, koji počinju da reaguju na sopstveni antigen u ciljnom tkivu (6). Fenomen „molekularne mimikrije“ u genezi lezija CNS u MS podrazumeva postojanje stranog antigena koji je strukturno sličan antigenu CNS, prevashodno antigenu mijelina (7). Aktivirani T-limfociti, nakon što „prepoznaju“ sopstveni antigen na antigenprezentujućim ćelijama, počinju da ekspimiraju receptor CTLA-4 (CD152). CTLA-4 vezuje CD80 i CD86 na antigenprezentujućim ćelijama, što dovodi do inaktivacije T-limfocita i predstavlja jedan od mehanizama za održavanje autotolerancije (6). Pokazano je da su alelne varijante u CTLA-4 značajan genetski faktor rizika za nastanak MS (8).

Mijelinspecifični aktivirani autoreaktivni Th1 limfociti proizvode proinflamatorni citokin interferon- γ (IFN- γ), koji ostvaruje višestruke inflamatorne i patogene efekte u CNS, kao što su stimulacija ekspresije humanih leukocitnih antigena (engl. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) u antigenprezentujućim ćelijama, stimulacija transporta T-limfocita u tkivo CNS i inicijacija ćelijske smrti oligodendrocita (9). Na eksperimentalnom modelu MS – eksperimentalnom autoimunskom encefalo-mijelitisu (EAE) utvrđeno je da Th1 limfociti imaju jedinstvenu sposobnost da prodiru u delove zdravog tkiva CNS, učestvuju u iniciranju inflamacije i potpomažu naknadnu infiltraciju Th17 limfocita u nervno tkivo (10). Th17 limfociti čine funkcionalnu subpopulaciju pomoćničkih T-limfocita (11). Uloga Th17 limfocita u neuroinflamaciji i demijelinizaciji ostvaruje se preko efekata citokina IL-17, koji ove ćelije sintetiziraju. IL-17 uzrokuje oštećenje krvno-moždane barijere, utičući na smanjenje ekspresije adhezivnih proteina i proteina čvrste međucelijske veze u endotelnim ćelijama. IL-17 privlači neutrofile, koji prodiru kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru u parenhim CNS. U astrocitima i mikroglijalnim

ćelijama IL-17 indukuje ekspresiju proinflamatornih citokina, kao što su interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora- α (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF- α). Takođe, IL-17 može, sam ili u sinergiji s drugim molekularnim faktorima, da prouzrokuje oštećenje neurona (12).

Th2 limfociti su funkcionalna subpopulacija pomoćničkih T-limfocita, čije su funkcije da stimulišu produkciju IgE antitela u B-limfocitima i imunske reakcije posredovane eozinofilima i mastocitima (6). Oni inhibiraju Th1 odgovor (6), čime ostvaruju protektivnu ulogu u patogenezi MS. Naime, inhibicija Th1 odgovora postiže se delovanjem antiinflamatornih citokina, interleukina 4 (IL-4), interleukina 10 (IL-10) i transformišućeg faktora rasta- β (engl. *Transforming Growth Factor*, TGF- β), koje luče Th2 limfociti, što rezultuje značajnim poboljšanjem kliničke slike bolesti (13).

Regulatorni T-limfociti (Treg) čine populaciju T-limfocita, koja reguliše aktivaciju i efektorske funkcije drugih T-limfocita (6). Većina Treg eksprimira površinske markere CD4 i CD25, i transkripcioni regulator FoxP3 koji je važan za diferenciranje i funkcionisanje Treg (6, 14). Takođe, utvrđeno je da CTLA-4 reguliše funkcije Foxp3+ Treg (15). Treg imaju ključnu ulogu u održavanju imunske tolerancije, zbog njihove sposobnosti da regulišu broj i funkciju autoreaktivnih T-limfocita (6, 14, 15). Shodno tome, u osnovi patogeneze MS jeste poremećena ravnoteža između regulatornih i efektorskih T-limfocita, što rezultuje Th1-posredovanim autoimunskim odgovorom. Pokazano je da su CD4+CD25+FoxP3+ Treg funkcionalno deficitarni kod obolelih od MS (16), dok je poboljšanje kliničke slike EAE-om korelisalo sa akumulacijom ovih ćelija u CNS (17).

B-limfociti su ćelije imunskog sistema koje proizvode antitela (imunoglobuline, Ig) i predstavljaju glavnu komponentu humoralnog imunskog odgovora (6). Više od 50% demijelinizirajućih lezija kod obolelih od MS odlikuje se deponovanjem autoantitela specifičnih za antigene mijelina (18). Intratekalna sinteza imunoglobulina potvrđuje se otkrivanjem oligoklonalnih IgG traka i povišenim indeksom IgG u likvoru pacijenata. Detektovanje prisustva B-limfocita u likvoru, uz odsustvo odgovarajućih klonova u perifernoj cirkulaciji, dokazuje da se proliferacija i odgovor B-limfocita na specifični antigen odigravaju u CNS (19). Osim što proizvode autoantitela na antigene mijelina, B-limfociti doprinose patogenezi MS tako što sintetiziraju proinflamatorne citokine i učestvuju u aktivaciji autoreaktivnih Th1 limfocita (20).

U patogenezi MS učestvuju i ćelije urođenog imunskog odgovora: monociti/makrofagi, neutrofil i urođeno ubilačke (*Natural Killer*, NK) ćelije. Monociti su mononuklearni leukociti koji se aktivno nakupljaju na

mestu inflamacije u tkivu, gde se diferenciraju u makrofage (6). Specifičan morfološki oblik makrofaga u CNS predstavljaju mikroglijalne ćelije. Makrofagi su tkivni fagociti, koje aktiviraju produkti mikroorganizama i citokini (IFN- γ). Osnovne funkcije aktiviranih makrofaga su fagocitoza mikroorganizama, lučenje proinflammatoryh citokina i prezentovanje mikrobnih antigena Th limfocitima (6). U MS, aktivirani makrofagi fagocituju mijelin i prezentuju mijelinske antigene autoreaktivnim Th1 limfocitima koji se pritom aktiviraju. Stoga, prisustvo aktiviranih makrofaga i mikroglijalnih ćelija predstavlja odliku aktivnih lezija u CNS u kojima se odvijaju inflamacija, demijelinizacija i oštećenje aksona (21). Neutrofili su polimorfonuklearni leukociti koji se nakupljaju na mestu inflamacije u tkivu i imaju sposobnost da fagocituju i enzimski razgrade mikroorganizme (6). S obzirom na to da neutrofili sintetišu enzime mijeloperoksidazu i neutrofilnu elastazu i proinflammatoryh citokine, a da su relativno malobrojni u tipičnim „zrelim“ lezijama u CNS, na modelu EAE pokazano je da su neutrofili u povećanom broju infiltrirani u CNS tokom prekliničke faze bolesti i da mogu imati ulogu u formiranju „nascentnih“ lezija, tako što posreduju u narušavanju krvno-moždane barijere i podstiču aktivaciju lokalnih antigenprezentujućih ćelija (22). NK ćelije čine klasu limfocita. One ubijaju ćelije inficirane intracelularnim mikroorganizmima i aktiviraju makrofage lučenjem IFN- γ (6). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da NK ćelije mogu imati i štetnu i protektivnu ulogu u patogenezi MS. Dokazano je da IFN- γ koji proizvode NK ćelije promoviraju odgovor autoreaktivnih Th1 limfocita u EAE (23). Novija studija, međutim, pokazuje da u patogenezi EAE, NK ćelije u CNS mogu da deluju protektivno, suprimirajući štetne efekte Th17 limfocita (24).

HEMOKINI I HEMOKINSKI RECEPTORI

Hemokini čine familiju citokina. To su solubilni proteini malih molekulskih masa (8–14 kilodaltona), koji imaju esencijalnu ulogu u stimulaciji migracije ćelija i međućelijskoj komunikaciji (25). Migracija perifernih leukocita u CNS ključan je korak u mehanizmu neuroinflamacije, tokom patogeneze MS. U toku inflamatornog odgovora hemokini, koje sintetišu aktivirani makrofagi i vaskularne endotelne ćelije u ciljnom tkivu, nagomilavaju se na luminalnoj površini endotela i vezuju za hemokinske receptore eksprimirane na cirkulišućim leukocitima, što omogućava migraciju leukocita kroz zid krvnog suda do mesta inflamacije u tkivu (6).

Osnovna klasifikacija hemokina napravljena je prema njihovim strukturnim karakteristikama i specifičnom

delovanju na populacije imunskih ćelija koje eksprimiraju hemokinske receptore (25, 26). Prema strukturi konzervisanog NH₂-terminalnog motiva sa cisteinskim ostacima (C), tj. odsustvu ili prisustvu aminokiselina između prva dva cisteinska ostatka na NH₂-kraju, familija hemokina je podeljena u četiri podfamilije, i to: C- (motiv sadrži samo jedan cisteinski ostatak), CC- (motiv sadrži dva cisteinska ostatka), CXC- (motiv sadrži dva cisteinska ostatka razdvojena jednom aminokiselinom različitom od cisteina, X) i CX3C- (motiv sadrži dva cisteinska ostatka razdvojena sa tri aminokiseline različite od cisteina, X3) hemokini (slika 1). C- hemokini (CL1 i CL2) specifično privlače T-limfocite. CC- hemokini deluju na bazofile, eozinofile, monocite, NK ćelije, dendritske ćelije i T-limfocite. CXC- hemokini stimulišu migraciju neutrofila, monocita i limfocita. Jedini član CX3C- podfamilije, CX3CL1, specifičan je po tome što može da postoji u formi tipičnog solubilnog hemokina ili transmembranskog adhezivnog proteina, a deluje na monocite, NK ćelije, dendritske ćelije i T-limfocite. Na osnovu ekspresije i funkcija *in vivo* hemokini se mogu podeliti u dve kategorije: konstitutivne (homeostatske) hemokine, koji su odgovorni za transport leukocita u bazalnim uslovima, za razvoj i strukturno-funkcionalnu organizaciju limfoidnih i nelimfoidnih organa, i inducibilne (inflamatorne) hemokine koji se proizvode u odgovoru na inflamaciju i omogućavaju pojačanu migraciju leukocita u tkivo zahvaćeno inflamacijom. Sintezu inflamatornih hemokina podstiču proinflammatory stimuli kao što su: citokini interleukin 1 (IL-1), TNF- α i IFN- γ , virusni antigeni i bakterijski lipopolisaharidi, a inhibiraju je endogeni antiinflamatorni medijatori: citokini IL-10 i TGF- β , kao i glukokortikoidi. Podela na konstitutivne i inducibilne hemokine je gruba budući da izvesni konstitutivni hemokini pokazuju i inducibilnu ekspresiju, i obrnuto.

Slika 1. Klasifikacija hemokina prema strukturi konzervisanog NH₂-terminalnog motiva sa cisteinskim reziduama: četiri podfamilije hemokina

Hemokini ostvaruju dejstvo na ciljne ćelije vezivanjem za hemokinske receptore, koji pripadaju porodici receptora sa sedam transmembranskih domena povezanih sa G-proteinom. Hemokinski receptori su klasifikovani u četiri kategorije, prema tipu liganda (hemokina) koji vezuju i na koji odgovaraju, a to su: CR1 (receptor za CL1 i CL2), CCR (receptori za CC- hemokine), CXCR (receptori za CXC- hemokine) i CX3CR1 (receptor za CX3CL1) (25, 26).

Interakcije hemokina i njihovih receptora predstavljaju kompleksnu mrežu. Identifikovano je više od 50 humanih hemokina i oko 20 hemokinskih receptora (27). Sa nekim izuzecima, pojedinačni hemokinski receptori mogu da vežu više od jednog hemokina, a pojedinačni hemokini mogu angažovati više od jednog receptora (25) (slika 2).

Slika 2. Hemokinski receptori i ligandi (hemokini) koje vezuju

HEMOKINI I HEMOKINSKI RECEPTORI U CNS TOKOM PATOGENEZE MULTIPLE SKLEROZE

Izučavanje uloge hemokina u CNS datira od početka 90-ih godina prošlog veka. Značaj hemokina u mehanizmu neuroinflamacije otkriven je u studijama na eksperimentalnom modelu MS – EAE, u kojima je nastanak bolesti bio povezan s povećanom produkcijom određenih hemokina u tkivu CNS (28). Konstitutivno eksprimirani (homeostatski) hemokini u CNS jesu: CXCL1, CXCL12, CX3CL1 i neki CC- hemokini. Oni posreduju u migraciji prekursora neurona i glijalnih ćelija, proliferaciji glijalnih ćelija, neurogenezi, preživljavanju neurona, komunikaciji između neurona i ćelija glije, kao i u neurotransmisiji (29, 30). Neke konstitutivne hemokine, kao što su CXCL12, CCL19 i CCL21, eksprimiraju endotelne ćelije krvnih sudova u CNS (31). Promene

ekspresije ovih hemokina povezane su s promenama karakteristika krvno-moždane barijere i njenim narušavanjem u toku neuroinflamacije i patogeneze MS (31).

Krvno-moždana barijera se sastoji od endotela malih krvnih sudova mozga, pericita i terminalnih proširenja citoplazmatskih nastavaka („stopala“) astrocita koji okružuju krvne sudove (32). Ova barijera omogućava selektivni transport ćelija i molekula između krvi i moždanog parenhima. Na krvno-moždanoj barijeri CXCL12 ima izuzetno važnu ulogu u regulaciji transendotelne migracije leukocita u tkivo CNS, što je potvrđeno i u patogenezi EAE (33) i MS (34). CXCL12 je potentni hemoatraktant za monocite i limfocite, koji eksprimiraju njegov specifični receptor (CXCR4) (35). CXCL12 i CXCR4 produkuj glialne ćelije, neuroni i endotelne ćelije krvno-moždane barijere, u različitim regionima mozga (36, 37). Osim što je detektovana povišena ekspresija CXCL12 u endotelu krvnih sudova krvno-moždane barijere kod obolelih od MS (36), otkrivena je i promena lokalizacije ovog hemokina na endotelnim ćelijama obolelih (33, 34). U fiziološkim uslovima, CXCL12 je lokalizovan duž abluminalne površine endotelne ćelije, ka parenhimu CNS. Ovaj obrazac ekspresije omogućava da se leukociti koji eksprimiraju CXCR4 i koji su pozicionirani u perivaskularnom prostoru tu i zadrže, tj. da se spreči njihova migracija u moždani parenhim. Tokom neuroinflamacije, CXCL12 se translocira na luminalnu površinu endotela postkapilarnih venula. Kao posledica toga, CXCR4+ mononuklearni leukociti iz perivaskularnog prostora prelaze u tkivo CNS, gde naknadno indukuju demijelinizaciju. Proinflamatorni citokin IL-1 stimuliše endotelnu translokaciju CXCL12 u toku neuroinflamacije (38). Visoki nivoi hemokina CXCL12 izmereni su u likvoru pacijenata sa MS (39), a ekspresija CXCL12 je lokalizovana u reaktivnim astrocitima plakova kod obolelih (34, 38, 40). Rezultati novijih studija ukazuju na to da CXCL12 i CXCR4 mogu imati protektivnu ulogu u patogenezi MS. Naime, visoki nivoi CXCL12 u kičmenoj moždini doprinose rezistenciji na EAE (41). Takođe, u životinjskom modelu demijelinizacije indukovane kuprizonom (specifični helator jona bakra), inhibicija CXCR4 ili utišavanje transkripcije gena za CXCR4 izazvalo je poremećaj diferencijacije prekursora oligodendrocita, onemogućavajući proces remijelinizacije (42). Potvrđena je uloga signalizacije preko CXCR4 i u stimulisanju migracije i aktivnosti prekursora oligodendrocita i prekursora neurona u mozgu životinja sa EAE (43, 44, 45).

Hemokin CX3CL1 (fraktalkin) konstitutivno je eksprimiran u neuronima, a njegov specifični receptor, CX3CR1, u mikroglijalnim ćelijama (46). Inducibilna

ekspresija CX3CL1 i CX3CR1 u CNS ukazuje na to da oni mogu imati važnu ulogu u patogenezi MS. Indukcija EAE je povezana s porastom ekspresije CX3CL1 u aktiviranim mikroglialnim ćelijama inflamatornih moždanih lezija (47). Nivo solubilnog CX3CL1 značajno je povišen u mozgu miševa sa EAE, u odnosu na kontrolne životinje (48), kao i u likvoru obolelih od MS, u odnosu na zdrave osobe (49). Indukcija EAE praćena je akumulacijom mikroglialnih ćelija koje ekspimiraju informacionu RNK za CX3CR1, u inflamatornim lezijama mozga (50). U našoj studiji utvrdili smo da je haplotip sastavljen od dve varijante u genu za CX3CR1 značajan protektivni genetski faktor za sekundarnu progresiju relapsno-remitentne forme MS (51).

Analiza tkiva moždanih plakova kod obolelih od MS omogućila je detekciju različitih inducibilno ekspimiranih hemokina za koje je sugerisano da ih proizvode reaktivni astrociti (CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 i CCL8) i aktivirana mikroglia (CXCL1, CCL2, CCL3 i CCL4). S obzirom na to da je CCL2 (MCP-1) glavni hemoatraktant za monocite, smatra se da njegova sinteza u oba navedena tipa glialnih ćelija omogućava održavanje kontinuiteta regrutovanja monocita i aktivacije monocitnih makrofaga i rezidualne mikroglie u inflamatornim lezijama (30). U studijama na modelu EAE, izmereni su visoki nivoi CCL2 u astrocitima i endotelnim ćelijama CNS (52) i uspostavljena je korelacija između ovih visokih nivoa CCL2 i teže kliničke slike akutne bolesti (53). Osim u plakovima, CCL2 detektovan je u krvi bolesnika sa MS i njegova koncentracija može da odražava tok bolesti (54). U više studija pokazano je da remećenje CCL2/CCR2 odnosa smanjuje intenzitet neuroinflamatornog procesa. Neutralisanje ili eliminisanje CCL2 uzrokovalo je poboljšanje kliničke slike EAE pošto je rezultovalo značajnim smanjenjem regrutovanja monocita i intenziteta Th1-posredovanog autoimunskog odgovora u CNS (55). Slično tome, delecija gena za CCR2 ili blokada ovog receptora ukinula je, smanjila ili odložila progresiju neurološkog deficita u EAE (56, 57). Težina kliničke slike EAE bila je značajno smanjena kod himernih miševa čije su mikroglialne ćelije i astrociti deficitarni za CCL2. Nasuprot tome, poboljšanje kliničke slike nije postignuto kod životinja čiji su periferni leukociti bili deficitarni za CCL2, što ukazuje na to da ključnu ulogu u nastanku i progresiji MS ima CCL2 koji potiče iz glialnih ćelija (58).

Glialne ćelije unutar plakova u CNS proizvode ligande za receptore CXCR3 (CXCL9, CXCL10) i CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8), koji su prevashodno ekspimirani na Th1 limfocitima (30, 59). Na reaktivnim astrocitima i aktiviranoj mikrogliji unutar plakova detektovani su i sami receptori CXCR3 i CCR5. Signalizacija koja se ostvaruje parakrinom ili autokrinom aktivacijom ovih receptora stimuliše proliferaciju,

migraciju i aktivaciju glialnih ćelija i proizvodnju medijatora inflamacije u njima (60, 61). Mikroglia proizvodi i hemokine CCL22 i CCL1, a receptori za ova dva hemokina, CCR4 i CCR8, ekspimirani su na Th2 limfocitima (62, 63). Dokazano je da CCL22, koji proizvode aktivirane mikroglialne ćelije in vitro (63) i unutar remijelinizirajućih lezija bolesnika sa MS (64), promovise migraciju Th2, ali ne i Th1 limfocita (63). Ovi rezultati ukazuju na značajnu ulogu mikroglialnih hemokina u regulaciji regrutovanja funkcionalno različitih subpopulacija T-limfocita tokom inflamacije u CNS.

HEMOKINI I HEMOKINSKI RECEPTORI U LEUKOCITIMA TOKOM PATOGENEZE MULTIPLE SKLEROZE

Analizom ekspresije hemokinskih receptora u T-limfocitima utvrđeno je da su CCR5, CXCR3 i CXCR6 prvenstveno ekspimirani u Th1 limfocitima, dok receptore CCR3, CCR4 i CCR8 tipično ekspimiraju Th2 limfociti (65). Odnos broja CD4+CXCR3+ i CD4+CCR4+ T-limfocita, koji predstavlja odnos Th1/Th2, bio je znatno viši kod obolelih nego kod zdravih osoba, kao i kod bolesnika u fazi relapsa u poređenju sa onima u remisiji (59, 66), što dokazuje da tendencija promene Th2 u Th1 tip odgovora karakteriše patogenezu MS. Takođe, značajno povišeni nivoi ekspresije hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 detektovani su na Th1 limfocitima prisutnim u perifernoj krvi, likvoru i mozgu kod pacijenata sa MS, u odnosu na pacijente iz kontrolne grupe (59, 66). To ukazuje da je migracija Th1 limfocita u CNS posredovana interakcijama ova dva receptora sa njihovim ligandima – CXCL10, CCL5 i CCL3. Shodno tome, smatra se da promene nivoa hemokina CXCL10, CCL5 i CCL3 u likvoru odražavaju infiltraciju Th1 limfocita u CNS (59). Navedeni rezultati takođe sugerišu da promene nivoa ekspresije hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 u T-limfocitima periferne krvi mogu biti validni molekularni markeri patogeneze MS i da antagonisti ovih receptora imaju potencijalni značaj u terapiji bolesti. Tako je pokazano da tretman primenom dualnog antagonista CXCR3 i CCR5 dovodi do smanjenja migracije Th1 limfocita u CNS i do inhibicije progresije EAE (67). Specifične receptore za hemokine CX3CL1 i CXCL16, CX3CR1 i CXCR6, ekspimiraju različite klase mononuklearnih leukocita, među kojima su i T-limfociti (68, 69). CD4+CX3CR1+ T-limfociti zastupljeni su u znatno većem procentu u krvi bolesnika sa MS, u poređenju sa zdravim osobama (70), a CX3CR1 posreduje u regrutovanju citotoksičnih CD4+CD28⁻ T-limfocita u moždano tkivo pacijenata (71). CXCL16 može delovati kao proinflamatorni hemokin u patogenezi MS s obzirom na to da je kod životinja sa EAE primena monoklonskog antitela na CXCL16 rezultovala smanjenjem učestalosti bolesti, smanjenjem infiltracije mononuklearnih leukocita

u CNS, opadanjem nivoa serumskog IFN- γ i smanjenjem produkcije mijelinspecifičnih Th1 limfocita (72). Detektovan je značajan porast nivoa CXCL16 u serumu i likvoru kod obolelih od MS, u odnosu na kontrolnu grupu (73). CXCL16, koji eksprimiraju monociti infiltrirani u CNS, indukuje hemotaksiju i akumulaciju aktiviranih mijelinspecifičnih CD4+CXCR6+ Th1 limfocita u tkivu CNS tokom patogeneze EAE (72). U našoj studiji je utvrđeno da je genotip varijante u CXCL16 značajan protektivni genetički faktor za nastanak MS kod žena (74).

Među humanim Th17 limfocitima u velikoj meri su zastupljene populacije CCR4+CCR6+, CCR2+CCR5- i CCR6+ (75), a sami Th17 limfociti proizvode CCL20, koji je specifični ligand za CCR6 (76). Ove ćelije, proizvodeći CCL20, promovišu sopstvenu migraciju i migraciju Treg limfocita *in vitro*, na CCR6-zavisni način (76). Epitelne ćelije horoidnog pleksusa konstitutivno sintetizuju CCL20 i regrutovanje CCR6+ Th17 limfocita u zdravo tkivo CNS stimulirano je ovim konstitutivno eksprimiranim CCL20, tokom rane faze patogeneze EAE (77). Produkcija CCL20 je potvrđena u akutnim plakovima kod obolelih od MS (78). Broj CD4+ T-limfocita infiltriranih u CNS miševa sa EAE znatno se smanjio kod jedinki kod kojih je izbačen gen za CCR6 (engl. „knock-out“ miševi za CCR6), sugerirajući da CCR6-deficijentni autoreaktivni Th17 limfociti nemaju sposobnost migracije u CNS (79). Međutim, ovaj nalaz je osporen jer je pokazano da delecija gena za CCR6 nema uticaja na regrutaciju Th17 u CNS i da miševi sa deletiranim CCR6 genom imaju čak znatno težu kliničku sliku EAE (80). Ovo pogoršanje kliničkog toka bolesti pripisano je defektima u regrutovanju Treg limfocita u CNS, budući da aktivacija CCR6 ima ulogu i u stimulisanju njihove migracije (76).

Zreli B-limfociti tipično eksprimiraju CXCR5, receptor za hemokin CXCL13 koji je potentni hemoatraktant za ove ćelije. U skladu s tim, pokazalo se da je nivo CXCL13 u likvoru indikativan za humoralni imunski odgovor u CNS. U više studija su izmereni povišeni nivoi CXCL13 u likvoru obolelih od MS (81, 82, 83). Nivo CXCL13 je korelisao sa indikatorima kliničkog toka relapsno-remitentne forme MS, kao što su učestalost relapsa i indeks IgG u likvoru (82), što podržava mogućnost za primenu CXCL13 kao prognostičkog biomarkera u MS. Takođe, primena CXCL13 kao pokazatelja intratekalnog humoralnog imunskog odgovora u MS podržana je uspostavljenom korelacijom nivoa CXCL13 sa brojem B-limfocita, indeksom IgG i prisustvom i brojem oligoklonalnih IgG traka u likvoru (81, 82, 83, 84). Reproducibilnost dobijenih rezultata sugerise da CXCL13 može biti senzitivni indikator intenziteta humoralnog imunskog odgovora u CNS.

Tokom aktivacije mikroglije, monociti koji eksprimiraju CCR2 regrutuju se u velikom broju u CNS.

Ova CCR2+ subpopulacija monocita identifikovana je kao direktni prekursor parenhimskih makrofaga s mikroglijalnom morfologijom u mozgu (85). Studije na eksperimentalnom modelu potvrdile su ulogu CCL2 i CCR2 u indukciji EA-a, upravo preko stimulisanja infiltracije monocita u CNS (55). Neutrofili eksprimiraju receptore CXCR1 i CXCR2, koji vezuju CXCL1 i CXCL2. Ova dva hemokina su neophodna za regrutovanje neutrofila u CNS i indukciju EAE, a njih proizvode Th17 limfociti infiltrirani u tkivo CNS (86). U prekliničkoj fazi EAE detektovan je znatan porast broja neutrofila u krvi, u odgovoru na porast cirkulišućeg CXCL1 (87), što je u skladu s prethodnim nalazom povećane infiltracije neutrofila u CNS tokom prekliničke faze bolesti (22). U odnosu na pacijente u fazi remisije, kod pacijenata u fazi relapsa izmereni su povišeni nivoi CXCL5 (drugog liganda za CXCR2, koji aktivira i privlači neutrofile) u plazmi, što se podudaralo sa nastankom akutnih inflamatornih lezija u CNS kod ovih osoba. Kod njih je uspostavljena korelacija cirkulišućih nivoa CXCL1, CXCL5 i neutrofilne elastaze s vrednostima kliničkog parametra invaliditeta i sa zapreminom lezija određenom nuklearno-magnetnom rezonancom (87). Navedeni rezultati podržavaju dalje izučavanje molekularnih faktora povezanih sa neutrofilima, kao potencijalnih novih biomarkera u MS. NK ćelije eksprimiraju receptore CXCR4, CCR4, CCR7 i CX3CR1, čijom aktivacijom se postiže regrutovanje ovih ćelija (88). CX3CR1 učestvuje u selektivnom regrutovanju NK ćelija u CNS (50). Miševi sa EAE kod kojih je izbačen gen za CX3CR1 imali su značajno redukovani broj NK ćelija u inflamatornim lezijama u CNS, što je asocirano sa težom kliničkom slikom i višim stepenom mortaliteta (48), a to sugerise protektivno delovanje NK ćelija u patogenezi EAE (24).

UTICAJ TERAPIJE NA EKSPRESIJU HEMOKINA I HEMOKINSKIH RECEPTORA U MULTIPLOJ SKLEROZI

Lekovi koji su se pokazali efikasnim u lečenju MS regulišu imunski odgovor kod pacijenata, a kao jedan od mehanizama delovanja imaju uticaj na ekspresiju i/ili aktivnost hemokina i hemokinskih receptora.

Glukokortikosteroidni lek metilprednizolon je antiinflamatorni agens koji se široko primenjuje za lečenje pacijenata u fazi akutnog pogoršanja bolesti – relapsa. On inhibira aktivaciju T-limfocita, promoviše apoptozu imunskih ćelija i smanjuje njihovu migraciju u CNS (89). Utvrđeno je da u klinički aktivnoj fazi MS migratorna sposobnost CD4+CCR5+ T-limfocita slabi posle tretmana metilprednizolonom (90). Opadanje nivoa liganda za CXCR3 (CXCL10) detektovano je u serumu pacijenata nakon intravenskog davanja metilprednizolona (91). Takođe, metilprednizolon na doznazavisni način smanjuje

hemokinom CXCL10 indukovanu migraciju efektorskih CD4⁺ T-limfocita, *in vitro* (92). *In vitro* analizom perifernih T-limfocita kod obolelih od MS utvrđeno je da tretman metilprednizolonom inhibira migraciju ovih ćelija ka CCL19, dok značajno stimuliše njihovu migraciju ka CXCL12 (93), što ukazuje na pokazane protektivne efekte CXCL12 u patogenezi MS (41, 43, 44, 45). Interferon- β je godinama poznat kao efikasan imunomodulatorni agens za lečenje pacijenata s relapsno-remitentnom MS (94). Antiinflamatorni efekti interferona- β ostvaruju se sprečavanjem migracije Th1 limfocita u tkivo CNS. Interferon- β može da smanji ekspresiju hemokina i hemokinskih receptora karakterističnih za Th1 limfocite, kao što su CCL5, CCL3 i CXCR3, pri čemu se povećava ekspresija receptora tipičnog za Th2 limfocite, CCR4 (13, 95). Glatiramer acetat je kopolimer sastavljen od aminokiselina koje se sa visokom efikasnošću vezuju za HLA klase II, a sa niskim afinitetom za receptore Th1 limfocita, prevodeći Th1 u Th2 ćelijski odgovor; pri tome rastu nivoi citokina koje proizvode Th2 limfociti, dok opadaju nivoi citokina koje sekretuju Th1 limfociti i ekspresija Th1-tipičnih hemokinskih receptora, CCR5 i CXCR3 (96, 97).

Među lekovima koji se primenjuju u terapiji MS još uvek je teško izdvojiti pojedinačni agens koji trajno efikasno suprimira ovu bolest. Jedan od razloga za to jeste upravo kompleksnost mreže hemokina i hemokinskih receptora koju uzrokuje kako njihova brojnost, tako i višestruke funkcije koje imaju.

ZAKLJUČAK

Izučavanje funkcija hemokina i hemokinskih receptora u CNS daće nova saznanja o važnim aspektima normalnog funkcionisanja CNS, kao i patogeneze neuroinflamatornih i neurodegenerativnih bolesti kakva je MS. Hemokini i hemokinski receptori omogućavaju migraciju patogenih autoreaktivnih mijelinspecifičnih ćelija, među kojima su T-limfociti i makrofagi, do mesta inflamacije u CNS, što je jedan od suštinskih procesa u patogenezi MS. Kao takvi, hemokini i njihovi receptori su istovremeno i potencijalne terapijske mete u ovoj bolesti. Proizvodnja poboljšanih terapijskih u budućnosti omogućila bi da ovi farmakološki agensi, delujući preko pojedinačnih komponenata složene mreže hemokina i hemokinskih receptora, selektivno utiču na migratorna svojstva populacija patogenih leukocita, bez narušavanja funkcija drugih komponenata imunskog odgovora.

ZAHVALNOST

Ovaj rad je urađen u okviru projekta „Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti“, broj OI175085, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

ABBREVIATIONS:

MS-multiple sclerosis, CNS-central nervous system, IFN- γ -interferon- γ , HLA-human leukocyte antigen, EAE-experimental autoimmune encephalomyelitis, TNF- α -tumour necrosis factor- α , TGF- β -transforming growth factor- β , Treg-regulatory T-lymphocyte, NK-natural killer cells

KONFLIKT INTERESA

Autori rada izjavljuju da ne postoji konflikt interesa.

LITERATURA

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372: 1502–17.
2. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: implications for counselling and therapy. Curr Opin Neurol 2002; 15: 257–66.
3. Dinčić E, Živković M. Geni i multipla skleroza. Beograd: Naša knjiga, 2012.
4. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med 2006; 354: 942–55.
5. Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B et al. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. J Clin Invest 1990; 86: 981–5.
6. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
7. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. Int Rev Neurobiol 2007; 79: 127–47.
8. Dinčić E, Živković M, Stanković A et al. Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1beta genes with multiple sclerosis in Serbian population. J Neuroimmunol 2006; 177: 146–50.
9. Rodgers JM, Miller SD. Cytokine control of inflammation and repair in the pathology of multiple sclerosis. Yale J Biol Med 2012; 85: 447–68.
10. O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2008; 181: 3750–4.
11. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005; 6: 1123–32.

12. Waisman A, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 625–37.
13. Dhib-Jalbut S, Sumandeep S, Valenzuela R, Ito K, Patel P, Rametta M. Immune response during interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis who experienced relapses and those who were relapse-free in the START study. *J Neuroimmunol* 2013; 254: 131–40.
14. Salman J, Ius F, Knoefel AK et al. Association of higher CD4+ CD25high CD127low, FoxP3+, and IL-2+ T cell frequencies early after lung transplantation with less chronic lung allograft dysfunction at two years. *Am J Transplant* 2016; doi: 10.1111/ajt.14148 [Epub ahead of print].
15. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271–5.
16. Haas J, Hug A, Viehöver A et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005; 35: 3343–52.
17. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 2005; 175: 3025–32.
18. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–17.
19. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V (H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1045–50.
20. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B cells are multifunctional players in multiple sclerosis pathogenesis: insights from therapeutic interventions. *Front Immunol* 2015; 6: 642.
21. Mishra MK, Yong VW. Myeloid cells – targets of medication in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2016; 12: 539–51.
22. Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol* 2013; 191: 4531–9.
23. Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol* 2000; 165: 3099–104.
24. Hao J, Liu R, Piao W et al. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* 2010; 207: 1907–21.
25. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217–42.
26. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1067–8.
27. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610–21.
28. Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M et al. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 1993; 7: 592–600.
29. Réaux-Le Goazigo A, Van Steenwinkel J, Rostène W, Mélik Parsadaniantz S. Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog Neurobiol* 2013; 104: 67–92.
30. Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 2004; 29: 1017–38.
31. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 220–30.
32. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41–53.
33. McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 8053–64.
34. McCandless EE, Piccio L, Woerner BM et al. Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 799–808.
35. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101–9.
36. Krumbholz M, Theil D, Cepok S et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006; 129: 200–11.
37. Van der Meer P, Ulrich AM, Gonzalez-Scarano F, Lavi E. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol* 2000; 69: 192–201.

38. McCandless EE, Budde M, Lees JR, Dorsey D, Lyng E, Klein RS. IL-1R signaling within the central nervous system regulates CXCL12 expression at the blood-brain barrier and disease severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 183: 613–20.
39. 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: 154–60.
40. Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 2008; 84: 116–31.
41. Miljković D, Stanojević Z, Momčilović M, Odoardi F, Flügel A, Mostarica-Stojković M. CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. *Immunobiology* 2011; 216: 979–87.
42. Patel JR, McCandless EE, Dorsey D, Klein RS. CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11062–7.
43. Banisadr G, Frederick TJ, Freitag C et al. The role of CXCR4 signaling in the migration of transplanted oligodendrocyte progenitors into the cerebral white matter. *Neurobiol Dis* 2011; 44: 19–27.
44. Cohen ME, Fainstein N, Lavon I, Ben-Hur T. Signaling through three chemokine receptors triggers the migration of transplanted neural precursor cells in a model of multiple sclerosis. *Stem Cell Res* 2014; 13: 227–39.
45. Zilkha-Falb R, Kaushansky N, Kawakami N, Ben-Nun A. Post-CNS-inflammation expression of CXCL12 promotes the endogenous myelin/neuronal repair capacity following spontaneous recovery from multiple sclerosis-like disease. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 7.
46. Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR1-expressing microglia. *J Immunol* 1999; 163: 1628–35.
47. Pan Y, Lloyd C, Zhou H et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997; 387: 611–7.
48. Huang D, Shi FD, Jung S et al. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 2006; 20: 896–905.
49. Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW. CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *J Neuroimmunol* 2003; 137: 210–7.
50. Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M et al. CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin. *J Neuroinflammation* 2005; 2: 17.
51. Stojković L, Djurić T, Stanković A, et al. The association of V249I and T280M fractalkine receptor haplotypes with disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012; 245: 87–92.
52. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 2003; 15: 23–32.
53. Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1 α and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 681–7.
54. Hagman S, Raunio M, Rossi M, Dastidar P, Elovaara I. Disease-associated inflammatory biomarker profiles in blood in different subtypes of multiple sclerosis: prospective clinical and MRI follow-up study. *J Neuroimmunol* 2011; 234: 141–7.
55. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 193: 713–26.
56. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 2000; 192: 1075–80.
57. Laborde E, Macsata RW, Meng F et al. Discovery, optimization, and pharmacological characterization of novel heteroarylphenylureas antagonists of C-C chemokine ligand 2 function. *J Med Chem* 2011; 54: 1667–81.
58. Dogan RN, Elhofy A, Karpus WJ. Production of CCL2 by central nervous system cells regulates development of murine experimental autoimmune encephalomyelitis through the recruitment of TNF- and iNOS-expressing macrophages and myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2008; 180: 7376–84.
59. Nakajima H, Fukuda K, Doi Y et al. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2004; 52: 162–8.

60. Krauthausen M, Saxe S, Zimmermann J, Emrich M, Heneka MT, Müller M. CXCR3 modulates glial accumulation and activation in cuprizone-induced demyelination of the central nervous system. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 109.
61. Gu SM, Park MH, Yun HM et al. CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget* 2016; 7: 15382–93.
62. Murphy CA, Hoek RM, Wiekowski MT, Lira SA, Sedgwick JD. Interactions between hemopoietically derived TNF and central nervous system-resident glial chemokines underlie initiation of autoimmune inflammation in the brain. *J Immunol* 2002; 169: 7054–62.
63. Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E et al. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J Neuroimmunol* 2002; 130: 10–21.
64. Peferoen LA, Vogel DY, Ummenthum K, et al. Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74: 48–63.
65. Shimizu Y, Ota K, Kubo S et al. Association of Th1/Th2-related chemokine receptors in peripheral T cells with disease activity in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur Neurol* 2011; 66: 91–7.
66. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BMC Neurol* 2010; 10: 113.
67. Ni J, Zhu YN, Zhong XG, et al. The chemokine receptor antagonist, TAK-779, decreased experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing inflammatory cell migration into the central nervous system, without affecting T cell function. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 2046–56.
68. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521–30.
69. Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 777–86.
70. Blauth K, Zhang X, Chopra M, Rogan S, Markovic-Plese S. The role of fractalkine (CX3CL1) in regulation of CD4(+) cell migration to the central nervous system in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2015; 157(2): 121–32.
71. Broux B, Pannemans K, Zhang X, et al. CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *J Autoimmun* 2012; 38: 10–9.
72. Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, et al. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 1620–7.
73. Le Blanc LM, van Lieshout AW, Adema GJ, van Riel PL, Verbeek MM, Radstake TR. CXCL16 is elevated in the cerebrospinal fluid versus serum and in inflammatory conditions with suspected and proved central nervous system involvement. *Neurosci Lett* 2006; 397: 145–8.
74. Stojković L, Stanković A, Djurić T, Dinčić E, Alavantić D, Zivković M. The gender-specific association of CXCL16 A181V gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis, and its effects on PBMC mRNA and plasma soluble CXCL16 levels: preliminary findings. *J Neurol* 2014; 261: 1544–51.
75. Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol* 2007; 178: 7525–9.
76. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181: 8391–401.
77. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009; 10: 514–23.
78. Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, et al. Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 706–15.
79. Liston A, Kohler RE, Townley S, et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J Immunol* 2009; 182: 3121–30.
80. Elhofy A, Depaolo RW, Lira SA, Lukacs NW, Karpus WJ. Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2009; 213: 91–9.
81. Alvarez E, Piccio L, Mikesell RJ, et al. CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and other neurological conditions. *Mult Scler* 2013; 19: 1204–8.

82. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler* 2011; 17: 335–43.
83. Kowarik MC, Cepok S, Sellner J, et al. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 93.
84. Axelsson M, Mattsson N, Malmstrom C, Zetterberg H, Lycke J. The influence of disease duration, clinical course, and immunosuppressive therapy on the synthesis of intrathecal oligoclonal IgG bands in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013; 264: 100–5.
85. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1544–53.
86. Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 2008; 205: 811–23.
87. Rumble JM, Huber AK, Krishnamoorthy G, et al. Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *J Exp Med* 2015; 212: 23–35.
88. Maghazachi AA. G protein-coupled receptors in natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 16–24.
89. Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11: 425–32.
90. Jalosinski M, Karolczak K, Mazurek A, Glabinski A. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2008; 118: 120–5.
91. Michałowska-Wender G, Losy J, Szczuciński A, Biernacka-Łukanty J, Wender M. Effect of methylprednisolone treatment on expression of sPECAM-1 and CXCL10 chemokine in serum of MS patients. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 920–3.
92. Jatzak-Pawlik I, Książek-Winiarek D, Wojkowska D et al. The impact of multiple sclerosis relapse treatment on migration of effector T cells--Preliminary study. *Neurol Neurochir Pol* 2016; 50: 155–62.
93. Schweingruber N, Fischer HJ, Fischer L, et al. Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 713–29.
94. Rudick RA, Goodkin DE, Jacobs LD, et al. Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 1997; 49: 358–63.
95. Zang YC, Halder JB, Samanta AK, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1alpha by interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2001; 112: 174–80.
96. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 2005; 4: 567–75.
97. Høglund RA, Hestvik AL, Holmøy T, Maghazachi AA. Expression and functional activity of chemokine receptors in glatiramer acetate-specific T cells isolated from multiple sclerosis patient receiving the drug glatiramer acetate. *Hum Immunol* 2011; 72: 124–34.