

MAŁGORZATA BILIŃSKA¹, EWA GRUSZKA¹, AGATA KOSMACZEWSKA², LIDIA CISZAK²,
EDYTA PAWLAK², ANNA POKRYSZKO-DRAGAN¹

Ekspresja receptora CD28 na limfocytach CD4⁺ krwi obwodowej u chorych ze zwalniającą i wtórnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego*

Expression of CD28 Antigen on CD4⁺ Cells from Peripheral Blood in Patients with Relapsing-Remitting and Secondary Progressive Multiple Sclerosis

¹ Katedra i Klinika Neurologii AM we Wrocławiu

² Laboratorium Immunopatologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Stwardnienie rozsiane (s.r.) jest przewlekłym demielinizacyjnym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego, w którego etiopatogenezie istotną rolę przypisuje się zaburzeniom odporności komórkowej. Krytyczną rolę w rozwoju s.r. przypisuje się autoreaktywnym wobec antygenów mielinowych limfocytom CD4⁺. Optymalna aktywacja limfocytów T wymaga 2 sygnałów. Sygnał 1 powstaje w wyniku rozpoznania antygenu przez receptor limfocytu T w kontekście antygenu zgodności tkankowej. Niezbędnym warunkiem pełnej aktywacji limfocytu są sygnały kostymulujące, z których najważniejszą rolę odgrywa CD28.

Cel pracy. Ocena odsetka komórek CD4⁺ krwi obwodowej wykazujących koekspresję receptora CD28 u chorych ze zwalniającą i wtórnie postępującą postacią s.r. oraz w grupie osób zdrowych.

Materiał i metody. Badaniom poddano pozostających w wielomiesięcznej remisji i nieotrzymujących leczenia immunomodulacyjnego 38 chorych ze zwalniającą i 26 chorych z wtórnie postępującą postacią s.r. oraz 24 osoby zdrowe. Badanie koekspresji CD28 na komórkach CD4⁺ przeprowadzono metodą podwójnej immunofluorescencji.

Wyniki. U chorych z postacią zwalniającą odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ nie różnił się znamienne od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Chorzy z postacią wtórnie postępującą wykazywali znamienne niższy odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ w porównaniu z grupą kontrolną oraz niższy, choć nieznamiennie, w porównaniu z chorymi z postacią zwalniającą. Ekspresja CD28 na komórkach CD4⁺ nie korelowała z EDSS ani współczynnikiem progresji.

Wnioski. U chorych ze zwalniającą postacią s.r. stwierdzono prawidłowy odsetek komórek CD4⁺ krwi obwodowej wykazujących koekspresję antygenu CD28, u chorych natomiast z postacią wtórnie postępującą odsetek tych komórek był istotnie niższy w porównaniu do grupy osób zdrowych. Zwiększony odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ w postaci wtórnie postępującej może być spowodowany przewlekłą stymulacją *in vivo* i odpowiadać zwiększonej subpopulacji komórek pamięci immunologicznej, opisywanych w chorobach z autoagresji (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 955–960).

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, CD4⁺/CD28⁺, krew obwodowa.

Abstract

Background. Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of central nervous system. T lymphocytes are believed to play the central role in the disease process of MS. T cells to be fully activated require two signals. The first one is provided by the recognition of the antigenic peptide presented in the context of self-major histocompatibility molecules by TCR/CD3 complex. The second one, antigen non-specific, is provided by costimulatory signals. The main role in this process plays CD28 molecule.

* Praca została wykonana w ramach Grantu Uczelnianego nr 404/2002.

Objectives. Estimation of the proportion of CD4⁺/CD28⁺ cells from peripheral blood in relapsing-remitting (RR) and secondary progressive (SP) MS patients and in healthy subjects.

Material and Methods. 38 RRMS and 26 SPMS patients with long-lasting clinical remission without immunomodulatory therapy were included in this study. Control group consisted of 24 age- and sex-matched healthy subjects. The expression of CD28 on CD4⁺ cells was studied by dual immunofluorescence method.

Results. The proportion of CD4⁺/CD28⁺ cells in RRMS patients did not differ significantly compared with controls. The SPMS patients exhibited significantly lower proportion of these cells compared with controls, and also with RRMS, but the difference was not significant. Expression of CD28 did not correlate with either EDSS or with rate of progression.

Conclusions. The proportion of CD4⁺/CD28⁺ cells from peripheral blood in RRMS patients was within normal limits, while the SPMS patients exhibited significantly lower percentage of these cells compared with control group. Increased proportion of CD4⁺/CD28⁻ cells in secondary progressive phase of the disease might result from chronic activation *in vivo* and represent increased subpopulation of memory cells described in autoaggressive disorders (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 955–960).

Key words: multiple sclerosis, CD4⁺/CD28⁺ cells, peripheral blood.

Stwardnienie rozsiane (s.r.) jest przewlekłym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) prowadzącym do niszczenia mieliny i ubytku aksonów. W około 85% przypadków choroba klinicznie rozpoczyna się od naprzemiennie występujących rzutów i remisji (postać zwalniająca) [1]. Z czasem trwania przebieg naturalny schorzenia się zmienia. W okresie do 10 lat od wystąpienia pierwszych objawów s.r. u 50% pacjentów z początkowo postacią zwalniającą, rozwija się postać wtórnie postępująca, a w następnych 10 latach taki przebieg stwierdza się u około 70% chorych [2, 3]. W etiopatogenezie schorzenia szczególną rolę przypisuje się zaburzeniom odporności komórkowej. Na modelu zwierzęcym s.r., tj. w alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (EAE – Experimental Allergic Encephalomyelitis) udowodniono, że w rozwoju biernie indukowanego schorzenia krytyczną rolę odgrywają autoreaktywne wobec antygenów mielinowych komórki CD4⁺ [4, 5]. Biorą udział zarówno w tworzeniu świeżych ognisk demielinizacji, jak i progresji choroby [6]. Do pełnej aktywacji limfocyta wymaga 2 sygnałów. Sygnał 1. jest antygenowo swoisty i powstaje w wyniku interakcji receptora limfocyta T (TCR/CD3) z antygenem prezentowanym przez komórkę prezentującą antygen (APC – antigen presenting cell) w kontekście cząsteczek zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex). Sygnał 2. antygenowo nieswoisty, determinujący poziom aktywacji, powstaje w wyniku interakcji cząsteczek kostymulujących z ich ligandami [7–9]. Jedną z najważniejszych cząsteczek kostymulujących, biorących udział w procesie pozytywnej regulacji procesu aktywacji jest cząsteczka CD28, należąca do nadrodziny białek immunoglobulinopodobnych. CD28 występuje konstytutywnie na około 50% limfocytów CD8⁺ i na ponad 90% limfocytów CD4⁺, a jej ekspresja wzrasta podczas stymulacji [10]. Interakcja cząsteczki CD28 z jej ligandem B7 na komórce APC stymuluje proliferację komórek i wytwarza-

nie cytokin, w tym interleukiny-2 (IL-2) [9, 11]. Dwusygnałowa stymulacja jest niezbędna do aktywacji limfocytów T, a brak sygnału realizowanego przez CD28 prowadzi do anergii klonalnej lub apoptozy [12, 13].

Celem pracy była ocena ekspresji receptora CD28 na spoczynkowych limfocytach CD4⁺ krwi obwodowej u chorych na s.r. we wczesnej (postać zwalniająca) i późnej (postać wtórnie postępująca) postaci schorzenia, w porównaniu z grupą osób zdrowych.

Material i metody

Badaniem objęto 64 chorych (43 kobiety i 21 mężczyzn) z klinicznie pewnym rozpoznaniem s.r. według klasyfikacji Komitetu Posera [14]. U 38 pacjentów, w wieku 21–50 lat (średnio 36 ± 9 lat), choroba przebiegała w postaci zwalniającej, a u 26, w wieku 38–60 lat (średnio 48 ± 5 lat), przebieg schorzenia był wtórnie postępujący [15]. W grupie z przebiegiem zwalniającym s.r. czas trwania choroby wynosił 3–13 lat (średnio 6 ± 3 lata), a stopień niesprawności neurologicznej, oceniany w skali EDSS [16] wahał się 1–4,5 (średnio 3 ± 1). Całkowity czas trwania choroby w grupie o przebiegu wtórnie postępującym wynosił 8–31 lat (średnio 17 ± 6 lat), a stadium wtórnie postępujące trwało od roku do 20 lat (średnio 7 ± 4 lata). W tej grupie stopień niesprawności w skali EDSS wynosił 4,5–6,5 (średnio $6 \pm 0,5$). Ocena w skali EDSS była wykonywana w dniu pobrania krwi do badań. W całej badanej grupie w okresie 12 miesięcy poprzedzających badanie nie obserwowano rzutów ani pogorszenia w skali EDSS o więcej niż 1 stopień. Chorzy ci również w tym okresie nie otrzymywali leczenia immunomodulacyjnego. Grupę kontrolną stanowiły 24 osoby zdrowe w wieku 21–54 lat (średnio 35 ± 10 lat). Badania krwi przeprowadzano po uzyskaniu pisemnej zgody od badanego.

Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs – peripheral blood mononuclear cells)

Do badania wykorzystano krew żylną pobraną na czczo od pacjentów i osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Pobranie krwi oraz izolację komórek przeprowadzano w warunkach sterylnych. Do izolacji pobierano 20 cm³ krwi żyłnej do sterylnej strzykawki z dodatkiem 20 jednostek heparyny na każdy 1 cm³ krwi. Następnie krew rozcieńczano za pomocą RPMI 1640 w stosunku 1 : 1 i nawarstwiano na jednostopniowy gradient stężeń Lymphoflot (Biotest, AG, Niemcy). Po 20 minutach wirowania przy 400 × g w temperaturze 4°C komórki jednojądrzaste stanowiące warstwę pośrednią między Lymphoflot a osoczem zbierano sterylną pipetą, a następnie 3-krotnie płukano PBS (bez jonów Ca⁺² i Mg⁺²). Gęstość tak przygotowanej populacji komórek (PBMCs) była określana w komorze Burkera.

Oznaczanie ekspresji antygeny CD28 na powierzchni limfocytów T CD4⁺

Inkubacja z przeciwciałami

5 × 10⁵ świeżo wyizolowanych PBMCs poddano inkubacji z 50 µl 2% surowicy AB i przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko antygenowi CD28 skoniugowanemu z fluoresceiną (FITC) (Serotec, Wielka Brytania) przez 30 minut w temperaturze +4°C. Następnie płukano w zimnym (4°C) 0,5% roztworze Tween w PBS. Tak przygotowane komórki inkubowano z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko antygenowi CD4⁺ skoniugowanemu z fikoerytryną (PE) (BD, USA) przez kolejne 30 minut w temperaturze +4°C. Po dwukrotnym przepłukaniu w roztworze Tween w PBS, komórki zawieszano w 300 µl PBS (bez dodatku jonów Mg⁺² i Ca⁺²).

Analiza ekspresji antygeny CD28 metodą podwójnej immunofluorescencji

Komórki zawieszone w PBS analizowano metodą podwójnej immunofluorescencji w cytometrze przepływowym FACScalibur (BD, USA). Kontrolę negatywną stanowiły komórki jednojądrzaste inkubowane z mysią immunoglobuliną zgodną izotypowo ze stosowanymi w próbach

przeciwciałami monoklonalnymi, skoniugowaną z fluoresceiną lub fikoerytryną (DAKO, Dania). Wyniki zostały przedstawione w postaci odsetka komórek podwójnie pozytywnych CD4⁺/CD28⁺, odczytywanego z wykresu kropkowego fluorescencji dla wybramkowanej populacji 10 000 komórek. Analizę przeprowadzano z użyciem programu Cell Quest Software (BD).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono testem Manna-Whitneya i współczynnika korelacji Spearmana.

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badania ekspresji cząsteczki CD28 na spoczynkowych limfocytach CD4⁺ krwi obwodowej u chorych na s.r. o przebiegu zwalniającym, wtórnie postępującym oraz w grupie kontrolnej. Odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ u chorych na s.r. o przebiegu zwalniającym i w grupie kontrolnej nie różnił się zna-

Tabela 1. Ekspresja receptora CD28 na limfocytach CD4⁺ krwi obwodowej u chorych ze zwalniającą i wtórnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego oraz w grupie kontrolnej

Table 1. CD28 expression on CD4⁺ cells from peripheral blood in multiple sclerosis (MS) patients with relapsing-remitting and secondary progressive phase of the disease and in control group

	CD28 ⁺ CD4 ⁺ mediana (median value)	
	dolny kwartył (lower quartile)	górny kwartył (upper quartile)
Chorzy z postacią zwalniającą stwardnienia rozsianego (RR MS patients) n = 38	42,0	96,0
Chorzy z postacią wtórnie postępującą stwardnienia rozsianego (SPMS patients) n = 26	48,0	94,0
Grupa kontrolna (Control group) n = 24	83,5	97,0
P	I : III = 0,18 II : III = 0,006 I : II = 0,27	

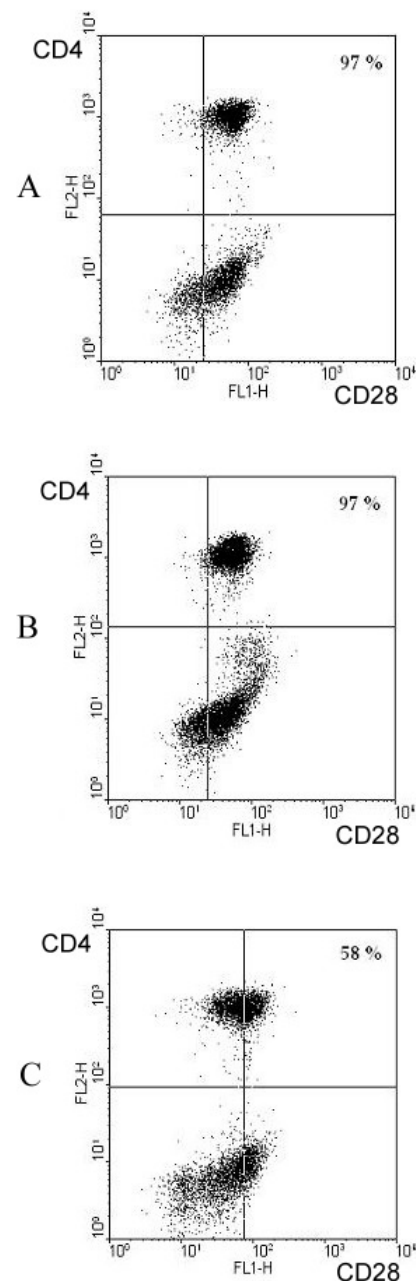
Tabela 2. Korelacja między ekspresją receptora CD28 na komórkach CD4⁺ krwi obwodowej a Rozszerzoną Skalą Niewydolności Ruchowej (EDSS) oraz współczynnikiem progresji u chorych na stwardnienie rozsiane

Table 2. Correlation between CD28 expression on CD4⁺ cells from peripheral blood and Expanded Disability Status Scale (EDSS), and between the rate of progression in MS patients

	Rozszerzona Skala Niewydolności Ruchowej (Expanded Disability Status Scale)		Współczynnik progresji (Rate of progression)	
	r	p	r	p
Chorzy na stwardnienie rozsiane (All MS patients) n = 64	-0,08	0,56	0,10	0,54
Chorzy ze zwalniającą postacią stwardnienia rozsianego (RRMS patients) n = 38	-0,01	0,94	0,23	0,17
Chorzy z wtórnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego (SPMS patients) n = 26	0,27	0,19	-0,30	0,13

miennie ($p = 0,18$). U chorych z postacią wtórnie postępującą odsetek tych komórek był znamienne niższy w porównaniu do wyniku uzyskanego w grupie kontrolnej ($p = 0,006$). Nie wykazano natomiast różnicy w odsetku komórek CD4⁺/CD28⁺ między dwoma grupami chorych ($p = 0,27$), chociaż w grupie chorych z postacią wtórnie postępującą był niższy.

U każdego pacjenta w dniu pobrania krwi do badania określano stopień niesprawności w skali EDSS. Obliczano również tzw. współczynnik progresji, dzieląc wartość EDSS przez czas trwania choroby (w latach). Wyniki badań korelacji między ekspresją cząsteczki CD28 na komórkach CD4⁺ krwi obwodowej i EDSS oraz współczynnikiem progresji dla całej grupy chorych oraz dla pacjentów z postacią zwalniającą i wtórnie postępującą zestawiono w tabeli 2. Jak wynika z tabeli, ekspresja CD28 na komórkach CD4⁺ nie korelowała ani z EDSS, ani ze współczynnikiem progresji zarówno w całej grupie chorych, jak i w jej poszczególnych postaciach. Na rycinie 1 przedstawiono reprezentatywne przykłady koekspresji antygeny CD28 na komórkach CD4⁺ krwi u pacjenta ze zwalniającą, wtórnie postępującą postacią s.r. oraz u osoby z grupy kontrolnej.



Ryc. 1. Reprezentatywne przykłady ekspresji antygeny CD28 (FL1-H) na komórkach CD4⁺ (FL2-H) krwi obwodowej oceniane metodą podwójnej immunofluorescencji: A – osoba z grupy kontrolnej, u której wykazano 97% komórek CD4⁺CD28⁺, B – chory ze zwalniającą postacią stwardnienia rozsianego, u którego wykazano 97% komórek CD4⁺CD28⁺, C – chory z wtórnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego, u którego wykazano 58% komórek CD4⁺CD28⁺

Fig. 1. Representative examples of CD28 co-expression (FL1-H) on CD4⁺ cells (FL2-H) from peripheral blood determined by dual flow cytometry:

- A – healthy control, 97% of cells are double positive (CD4⁺CD28⁺),
- B – patient with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), 97% of cells are double positive (CD4⁺CD28⁺),
- C – patient with secondary progressive multiple sclerosis (SPMS), 58% of cells are double positive (CD4⁺CD28⁺)

Omówienie

Interakcja antygeny CD28 z jego ligandami (CD80, CD86) na komórkach APC jest uważana za najsilniejszy sygnał kostymulujący limfocytów T. W dotychczasowych badaniach nad udziałem procesów kostymulacji w patogenie s.r. autorzy koncentrowali się na ocenie ekspresji antygenów CD80 i CD86 na komórkach APC [17–20]. Bardzo mało prac jest poświęconych badaniom ekspresji antygeny CD28 limfocytów krwi obwodowej [18, 21, 22]. W badaniach autorzy oceniali koekspresję antygeny CD28 na komórkach CD4⁺ krwi obwodowej u chorych ze stwardnieniem rozsianym o przebiegu zwalniającym i wtórnie postępującym. Byli to chorzy w okresie wielomiesięcznej remisji klinicznej, nieotrzymujący leczenia immunomodulacyjnego. W grupie o przebiegu zwalniającym odsetek limfocytów CD28⁺/CD4⁺ nie różnił się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną, co jest zgodne z doniesieniem Svenningssona et al. [18]. W grupie chorych z postacią wtórnie postępującą odsetek komórek CD28⁺/CD4⁺ był znacznie niższy w porównaniu do wyniku uzyskanego w grupie kontrolnej. W porównaniu z wynikiem uzyskanym w grupie chorych o przebiegu zwalniającym, odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ u chorych z postacią wtórnie postępującą był niższy, ale nieznamiennie. Obniżona ekspresja CD28 może być następstwem przewlekłej aktywacji *in vivo*. Wiadomo bowiem, że w wyniku interakcji CD28 z ligandami dochodzi do przejściowej internalizacji receptora [23].

Badania na modelu zwierzęcym s.r. wykazały,

że indukcja schorzenia rozpoczyna się od aktywacji krążących we krwi autoreaktywnych limfocytów T wobec określonego epitopu mieliny. Po przejściu przez barierę krew–mózg i indukcji procesu zapalno-demielinizacyjnego, przez uszkodzoną barierę powracając do krwiobiegu zaktywowane w o.u.n. makrofagi, prezentujące różne fragmenty antygenów mielinowych, co może aktywować kolejne autoreaktywne wobec tych epitopów limfocyty T [24]. Aktywacja limfocytów T we krwi może również przebiegać w procesie molekularnej mimikry lub w wyniku reakcji limfocytu z superantygenem [25, 26]. Przewlekły stan aktywacji układu immunologicznego prowadzi do zjawiska rozprzestrzenienia epitopu (epitope spreading) [27]. Nie można również wykluczyć, że zwiększony odsetek komórek CD4⁺/CD28⁺ odpowiada subpopulacji komórek pamięci immunologicznej opisywanej przez Markovic-Plese et al. [22] u części chorych na s.r. Komórki te proliferowały znacznie intensywniej i wytwarzały większą ilość prozapalnych cytokin (IFN- γ , IL-12) podczas stymulacji przeciwciałem anti-CD3 w porównaniu z komórkami CD4⁺/CD28⁺ stymulowanymi łącznie przeciwciałem anti-CD3 i anti-CD28. Miały fenotyp komórek pamięci immunologicznej, a ich znaczny odsetek stanowiły komórki reaktywne wobec antygenów mielinowych. Dodatkowo komórki te nie wykazywały ekspresji supresorowego antygeny CTLA-4 i w ten sposób mogły unikać fizjologicznego mechanizmu, prowadzącego do hamowania reakcji immunologicznej. Mogłyby być więc odpowiedzialne za utrzymanie procesu zapalno-demielinizacyjnego.

Piśmiennictwo

- [1] **Weinshenker BG:** Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994, 36, S6–S11.
- [2] **Convavreux C, Aimard G, Devic M:** Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* 1980, 103, 281–300.
- [3] **Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA:** The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989, 112, 1419–1428.
- [4] **Pettinelli CB, McFarlin DE:** Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for lyt1+2– T lymphocytes. *J Immunol* 1981, 127, 1420–1423.
- [5] **Zamvill S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L:** T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 1985, 317, 355–358.
- [6] **Cross AH, Omara T, Raine CS:** Chronologic localization of myelin-reactive cells in the lesions of relapsing EAE: Implications for the study of multiple sclerosis. *Neurology* 1993, 43, 1028–1033.
- [7] **Weinberg AD, Wegmann KW, Funatake C, Withman RH:** Blocking OX-OX-40 ligand in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1999, 162, 1818–1826.
- [8] **Gerritse K, Laman J, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbeter JA, Boersma WJA, Claasen E:** CD40-CD40L interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93, 2499–2504.
- [9] **Allison JP:** CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1994, 6, 414–419.
- [10] **June CH, Bluestone JA, Nadler RM, Thompson CB:** The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994, 15, 321–331.
- [11] **Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB:** CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991, 147, 2461–2466.

- [12] **Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler RM:** Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90, 6586–6590.
- [13] **Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP:** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992, 356, 607–609.
- [14] **Poser ChM:** New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guideliness for research protocol. *Ann Neurol* 1983, 13, 227–231.
- [15] **Lublin FD, Reingold SC:** Defining the clinical course of multiple sclerosis. Results of international survey. *Neurology* 1996, 46, 907–911.
- [16] **Kurtzke JF:** Rating neurological impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33, 1444–1452.
- [17] **Genc K, Dona DL, Reder AT:** Increased CD80⁺ B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon β -1b therapy. *J Clin Invest* 1997, 99, 2664–2671.
- [18] **Svenningsson A, Dotevall L, Stemme S, Andersen O:** Increased expression of B7-1 costimulatory molecule on cerebrospinal fluid cells of patients with multiple sclerosis and infectious central nervous system disease. *J Neuroimmunol* 1997, 75, 59–68.
- [19] **Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, Hoffer DA:** Expression of costimulatory molecules B7-1(CD80), B7-2(CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995, 182, 1985–1996.
- [20] **de Simone R, Giampado A, Giometto B:** The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in acute multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995, 54, 175–187.
- [21] **Mena E, Rohovsky-Kochan C:** Expression of costimulatory molecules on peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1999, 100, 92–96.
- [22] **Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger K-P, McFarland HF, Martin R:** CD4⁺CD28⁻ costimulation independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2001, 108, 1185–1194.
- [23] **Boćko D, Kosmaczewska A, Ciszak L, Reodorowska R, Frydecka I:** CD28 costimulatory molecule – expression, structure, and function. *Arch Immunol Ther Exp* 2002, 50, 169–177.
- [24] **Vanderlugt CJ, Miller SD:** Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996, 8, 831–836.
- [25] **Wucherpfennig KW, Strominger JL:** Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995, 80, 695–705.
- [26] **Brocke S, Gaur A, Piercy CH, Gautman A, Gijbels K, Fathman CG, Steinman L:** Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 1993, 365, 642–644.
- [27] **Tuohy VK, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP:** Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1997, 99, 1682–1690.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Bilińska
ul. Bacciarellego 35B/3
51-649 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.02.2004 r.

Po recenzji: 15.06.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 28.06.2004 r.

Received: 10.02.2004

Revised: 15.06.2004

Accepted: 28.06.2004