



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Srđan Ljubisavljević

**PROTEKTIVNO DEJSTVO MODULATORA OKSIDATIVNOG I
NITROZATIVNOG STRESA U NEUROINFLAMACIJI -
EKSPERIMENTALNA I KLINIČKA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Mentor: prof. dr Ivana Stojanović

NIŠ, 2014.



UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF MEDICINE



Srdjan Ljubisavljevic

**THE PROTECTIVE EFFECTS OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE
STRESS MODULATORS IN NEUROINFLAMMATION –
EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDY**

Doctoral dissertation

Mentor: prof. dr Ivana Stojanovic

NIS, 2014.

Članovi Komisije:

Akademik Prof. dr Vladimir Kostić, predsednik

Prof. dr Ivana Stojanović, mentor i član

Prof. dr Slobodan Vojinović, član

Datum odbrane _____

Reči iskrene zahvalnosti upućujem

Prof. dr Ivani Stojanović, mentoru ovog rada, za dragocene savete, osećaj stalne podrške, doslednost u naučnoj misli, istraživačku beskompromisnost i slobodu koja je bila dozvoljena mojoj inicijativi

Akademiku, prof. dr Vladimiru Kostiću, za pažnju i vreme koje je posvetio ovom radu, i učinjenu čast da predsedava Komisijom

Prof. dr Slobodanu Vojinoviću, za korisne stručne savete u kliničkom delu istraživanja

Osoblju Instituta za Biobemiju Medicinskog fakulteta u Nišu, prof. dr Dušici Pavlović, na ukazanom poverenju i podršci; diplomiranom hemičaru Svetlani Stojanović, za veliku pomoć u laboratorijskom radu i pozitivnu radnu atmosferu, šefu Katedre Biohemija prof. dr Gordani Kocić i prof. dr Tatjani Cvetković za korisne sugestije i savete u toku laboratorijskog rada.

Katarini Marković i Bojani Golubović, pomoćnim radnicama Instituta za Patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, za veliku pomoć u prikupljanju kliničkog materijala.

Kolegijumu lekara i medicinskih sestara Odseka za demijelinizacione bolesti Odeljenja kliničke neurologije Klinike za neurologiju KC Niš, uz posebnu zahvalnost Zorici Tomić i Zorici Marković, medicinskim sestrama.

Dragoj dr Slavici Stojnev iz Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, i dr sci Ivani Stevanović, iz Centra za biomedicinska istraživanja na VMA, na velikoj pomoći pri imunohistohemijskim analizama. Doc. dr Aleksandru Petroviću i prof. dr Ivanu Nikoliću sa Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu na dragocenim smernicama u eksperimentalnom radu.

Osoblju Naučnoistraživačkog centra za biomedicinska istraživanja i Vivarijuma Medicinskog fakulteta u Nišu, za pomoć u eksperimentalnom radu.

Svim pacijentima bez čijeg dobrovoljnog pristanka ne bi bilo moguće sprovesti ovo istraživanje,

Svojoj porodici, za toplinu, sigurnost i istinski bezrezervnu podršku!

Srđan Ljubisavljević, mart 2014.

*Eksperimentalni deo rada je nagrađen Godišnjom nagradom za najbolje istraživanje
od strane Naučnog odbora za multiplu sklerozu i demijelinizacione bolesti
Evropske federacije neuroloških društava (EFNS)
na XV EFNS Kongresu u Budimpešti, 2011. godine*

*Rad je urađen u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinska istraživanja i
Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i
Klinici za neurologiju Kliničkog centra u Nišu*

I Autor

Ime i prezime	Srđan Ljubisavljević
Datum i mesto rođenja	26.09.1981. Niš
Sadašnje zaposlenje	Asistent, Medicinski fakultet u Nišu Specijalista neurologije, Klinika za neurologiju, Klinički centar Niš

II Doktorska disertacija

Naslov	Protektivno dejstvo modulatora oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji – eksperimentalna i klinička studija
Broj strana	136
Broj slika	10
Broj grafikona	37
Broj tabela	9
Broj bibliografskih podataka	432
Ustanova i mesto gde je rad izrađen	Naučnoistraživački centar za biomedicinska istraživanja, Medicinski fakultet u Nišu Institut za biohemiju, Medicinski fakultet u Nišu Klinika za neurologiju, Klinički centar Niš
Naučna oblast	Klinička medicina, neurologija
Mentor	Prof. dr Ivana Stojanović, Institut za biohemiju Medicinski fakultet u Nišu

III Ocena i odbrana teze

Datum prijave teme doktorske disertacije	21.03.2013.
Broj odluke i datum prihvatanja teze	broj 8/19-01-003/13-015 od 31.05.2013.
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	Prof. dr Dušica Pavlović, predsednik Prof. dr Ivana Stojanović, mentor Prof. dr Slobodan Vojinović, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	Akademik, prof. dr Vladimir Kostić, sa Medicinskog fakulteta u Beogradu, predsednik Prof. dr Ivana Stojanović, mentor i član Prof. dr Slobodan Vojinović, član
Godina odbrane doktorske disertacije	2014.

IV Naučni doprinos doktorske disertacije

1. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Stefanovic N, Pavlovic D. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. Journal of the Neurological Sciences 2014; 337 (1-2): 8-13.
2. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Bojanic V, Stokanovic D, Pavlovic D. The glutathione homeostasis disruption of erythrocytes, but not glutathione peroxidase activity changes, is closely accompanied with

-
- neurological and radiological scoring of acute CNS inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2014; 21: 13-20.
3. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Kocic G, Savic D, Cvetkovic T, Pavlovic D. Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. Conceptual accession: from fundamental to clinic. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2013; 33(6): 767-77.
 4. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Milojkovic M, Dunjic O, Stojanov D, Pavlovic D. Association of serum bilirubin and uric acid levels changes during neuroinflammation in patients with initial and relapsed demyelization attacks. *Metabolic Brain Disease* 2013; 28: 629-38.
 5. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T, Savic D, Pavlovic D. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced oxidation protein products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochemistry International* 2013; 62(7): 988-97.
 6. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Milojkovic M, Sokolovic D, Stevanovic I, Petrovic A. Suppression of the lipid peroxidation process in the CNS reduces neurological expression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathologica* 2013; 51 (1): 51-7.
 7. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic R, Stojnev S, Stevanovic I, Sokolovic D, Pavlovic D. The reduced glutathione and S-nitrosothiols levels in acute phase of experimental demyelination - pathophysiological approach and possible clinical relevancy. *Neuroscience* 2012; 219: 175-82.
 8. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic R, Sokolovic D, Pavlovic D, Cvetkovic T, Stevanovic I. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 318(1-2): 106-11.
 9. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Milojkovic M, Vojinovic S, Sokolovic D, Stevanovic I. Correlation of nitric oxide levels in the cerebellum and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis rats with clinical symptoms. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2012; 72 (1): 33-9.
 10. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Stevanovic I. Aminoguanidine and N-acetylcysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. *Redox Report* 2011; 16 (4): 166-72.
 11. Stevanovic I, Ninkovic M, Stojanovic I, **Ljubisavljević S**, Stojnev S, Bokonjic D. Beneficial effect of agmatine in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in iNOS-/-knockout mice. *Chemico-Biological Interactions* 2013; 206 (2): 309-18.
 12. Stojanovic I, Djordjevic G, Pavlovic R, Djordjevic V, Pavlovic D, Cvetkovic T, **Ljubisavljević S**, Basic J, Žabar K. The importance of L-arginine metabolism modulation in diabetic patients with distal symmetric polyneuropathy. *Journal of the Neurological Science* 2013; 324 (1-2): 40-4.
 13. Stojanovic I, Vojinovic S, **Ljubisavljević S**, Pavlovic R, Basic J, Pavlovic D, Ilic A, Cvetkovic T, Stukalov M. INF- β therapy modulates arginine and nitric oxide metabolism in patients with relapse remittent multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 323(1-2):187-92.
 14. Stojanovic I, **Ljubisavljević S**, Stevanovic I, Pavlovic R, Cvetkovic T, Djordjevic V, Pavlovic D, Vojinovic S, Basic J. Nitric oxide-mediated signalization and nitrosative stress in neuropathology. *Journal of Medical Biochemistry* 2012; 31(4): 295-300.
 15. Živković M, **Ljubisavljević S**. Rani serumski biomarkeri ishemijskog moždanog udara. *Vojnosanitetski Pregled* 2011; 68(1): 68-72.
-

SAŽETAK

Neuroinflamacija je vodeći patogenetski mehanizam mnogih neuroloških bolesti, u prvom redu onih iz grupe demijelinizacionih oboljenja kojima pripada multipla skleroza (MS). Skorija istraživanja potvrđuju bifazičnu patogenezu MS koja počiva na neuroinflamatornim procesima, koji su karakteristika akutnih ataka bolesti, i na neurodegenerativnim procesima prisutnim u odmaklim fazama bolesti, kada postoje i trajna neurološka oštećenja. U patogenezi MS najznačajnijim se smatra prodor aktivisanih nosilaca nespecifičnog i specifičnog imuniteta u tkivo centralnog nervnog sistema (CNS), mada se značajnom, ali nedovoljno ispitanom, smatra i uloga medijatora oksidativnog i nitrozativnog stresa, kao i procesi ekscitotoksičnosti.

Polazeći od malobrojnih i međusobno suprostavljenih rezultata iz skorije sprovedenih istraživanja koja su bila posvećena ispitivanju patogenetskih aspekata oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji, ovo istraživanje za opšti cilj postavlja preciznije definisanje uloge i značaja pomenutih patogenetskih faktora, ispitivanje njihove međusobne interakcije i korelaciju sa morfološkim i neurološkim nalazom u akutnoj fazi eksperimentalne i kliničke neuroinflamacije.

U eksperimentalnom delu istraživanja korišćen je naučno standardizovani model eksperimentalne neuroinflamacije – akutni model eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). Životinje sa EAE su tretirane selektivnim inhibitorom inducibine azot oksid sintaze (iNOS), aminogvanidinom (AG) i antioksidansom, N-acetil L cisteinom (NAC). Potencijalno protektivna svojstva ovih supstanci testirana su u odnosu na biohemijske (koncentracija NO₂ i NO₃, MDA, GSH, SOD), imunohistohemijske (ekspresija GFAP, EAAT1, OX42, ED1, iNOS) i neurološke korelate neuroinflamacije. S druge strane, u kliničkom delu istraživanja određivani su parametri nitrozativnog i oksidativnog stresa (NO₂ i NO₃, MDA, AOPP, SH grupe, SOD) u hemolizataima, plazmi i likvoru pacijenata koji su imali akutne atake različitih kliničkih fenotipova neuroinflamacije, klinički izolovani sindrom (KIS) i ranije dijagnostikovanu relapsno remitentnu formu multiple skleroze (RRMS). Dobijene vrednosti analiziranih biomarkera su korelirane sa radiološkim, kliničkim i parakliničkim korelatima neuroinflamacije.

Rezultati ukazuju na porast intenziteta oksidativnog stresa u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije izazvane indukovanjem EAE, u svim strukturama CNS-a, i u svim ispitivanim uzorcima u toku akutnih ataka neuroinflamacije kod KIS i RRMS pacijenata. Stepem dobijenih korelacija između testiranih parametara oksidativnog stresa i antioksidativnog potencijala, i morfološkog i neurološkog nalaza, potvrđuju veliki patogenetski potencijal koji oksidativni stres ima ne samo u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije, već i u akutnim atacima KIS i RRMS. Shodno očekivanom, uočeno je da je stepen antioksidativnog potencijala veći u KIS u odnosu na RRMS pacijente. Međutim stepen oksidativnog oštećenja, na osnovu vrednosti MDA i AOPP, takođe je bio veći u ovoj grupi pacijenata. Ovo je objašnjeno većom opštom reaktivnošću organizma i CNS KIS pacijenata, kod kojih se prooksidativni procesi aktiviraju radi ostvarivanja protektivne uloge u ograničavanju neuroinflamatornih procesa (nekim od poznatih fizioloških mehanizama), ali se zbog intenzivnog i nekontrolisanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) precipitiraju štetni efekti ovih hemijskih vrsti. Obrnuto, shodno konstantnoj izloženosti RKV u RRMS, ovi pacijenti imaju narušen antioksidativni potencijal praćen smanjenjem adaptaciono kompenzatorne reaktivnosti

organizma i CNS, u čemu se nalazi direktno objašnjenje za pojavu oksidativnog stresa, i lošiji radiološki i klinički nalaz ovih pacijenata, što je dobijenim korelacijama pomenutih parametara i potvrđeno. Rezultati ukazuju na povećano stvaranje azot monoksida (NO) u uslovima neuroinflamacije, kada NO ispoljava direktna ili indirektna štetna svojstva. Oštećenja CNS u ovim stanjima posredovana su i glutamatergičkom ekscitotoksičnošću, s obzirom da se u neuroinflamaciji prekomerno stvara i oslobađa i ekscitatorni neurotransmitter, glutamat, kao posledica aktivacije astrocita koji su takođe ključne ćelijske komponente neuroinflamatorne kaskade. Rezultati imunohistohemijske analize uzoraka prednjeg mozga EAE životinja ukazuju na povećanu ekspresiju iNOS i drugih biomarkera povećane glijalne aktivnosti (GFAP, OX42, ED1) kao i na postojanje glutamatergičke ekscitotoksičnosti (EAAT1). Primenom inhibitora iNOS, AG, i tiol suplementacijom koja je ostvarivana primenom NAC, postignut je protektivni efekat u odnosu na biohemijski, imunohistohemijski i neurološki nalaz EAE tretiranih životinja. Takođe, dobijeni rezultati u kliničkom delu istraživanja ukazuju na veliki patogenetski potencijal oksidativnog i nitrozativnog stresa u akutnim atacima neuroinflamacije i različit oksidativni i nitrozativni profil organizma i CNS u različitim kliničkim fenotipovima neuroinflamacije. Dobijene su značajne korelacije promene koncentracije testiranih parametara i kliničkog i radiološkog nalaza, kao i dužine trajanja tegoba. Ovi nalazi ukazuju da duže trajanje bolesti i lošiji radiološki i neurološki skor tesno koreliraju sa manjim antioksidativnim i antinitrozativnim potencijalom i većim stepenom oksidativnog i nitrozativnog oštećenja organizma i CNS. Slične korelacije dobijene su testiranjem povezanosti ovde analiziranih parametara i drugih, opštih parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije i u KIS i u RRMS.

Dobijeni rezultati daju bolji uvid u patogenetski značaj i ulogu oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji i sugerišu značaj uvođenja antioksidativne i antinitrozativne terapije u tretman akutnih ataka neuroinflamacije. Ovakvim terapijskim pristupom, bolesti u čijoj je osnovi neuroinflamacija, mogle bi se efikasno kontrolisati u fazi reverzibilnih neuroloških oštećenja, čime bi se prevenirale ireverzibilne promene nervnog tkiva, a i time i akumulacija onesposobljenosti i trajni invaliditet pacijenta. Istovremeno, pojedini parametri nitrozativnog i oksidativnog stresa mogli bi, u odsustvu idealnih biomarkera neuroinflamacije, biti surogat biomarkeri za najraniju dijagnostiku, praćenje i procenu intenziteta neuroinflamacije, i njenih radioloških i kliničkih korelata.

Ključne reči: oksidativni stres, nitrozativni stres, neuroinflamacija

SUMMARY

Neuroinflammation is recognised as the leading mechanism in development of many of neurological diseases, including multiple sclerosis (MS). Recently published papers suggest biphasic MS pathogenesis which is based on neuroinflammation, which prevails in the early MS phase, and also neurodegeneration, which predominates in the later stage of the disease, at the time when accumulated neurological disability occurs. The invasion of central nerve system (CNS) by activated immune cells is established as the main part of disease initiation, while oxidative and nitrosative stress participation, through their mediators, as well as glutamatergic excitotoxicity, although recognised as important factors in disease pathophysiology, are still insufficiently tested.

Starting with weak and conflicting results, found in recently performed studies, which have evaluated oxidative and nitrosative stress participation in neuroinflammation, the general aim of the actual investigation was to more accurately define the role of named factors in acute attacks of experimental and clinical neuroinflammation, at the same time investigating mutual correlations of those biomarkers with morphological and neurological characteristic of neuroinflammatory acute attacks.

In the experimental part, the stated model of neuroinflammation – the acute model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), was used. The EAE animals were treated with selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS), aminoguanidine (AG), and, also, with antioxidant, N acetyl L cysteine (NAC). The potential protective effects of those agents were tested according to biochemical (concentration NO_2 i NO_3 , MDA, GSH, SOD), immunohistochemical (GFAP, EAAT1, OX42, ED1 and iNOS expression) and neurological characteristics of neuroinflammation. On the other side, in the clinical part, the values of nitrosative and oxidative stress parameters (concentration of NO_2 i NO_3 , MDA, AOPP, SH groups, SOD) were evaluated in hemolysates, plasma and cerebrospinal fluids of patients in acute attacks of different clinical phenotypes of neuroinflammation, defined as clinically isolated syndrome of CNS (CIS) and early defined relapse remitting multiple sclerosis (RRMS). The obtained values of named parameters were correlated with radiological, clinical and paraclinical findings of neuroinflammation.

The obtained data show increased oxidative stress intensity in all parts of CNS during acute EAE as well as in all tested media obtained from CIS and RRMS patients during their relapses. The closed correlations between parameters of oxidative stress and morphological and neurological findings of neuroinflammation suggest the relevancy of oxidative stress in pathogenesis of acute attacks in both experimental and clinical neuroinflammation. In compliance with expected, the higher values of antioxidative capacity were demonstrated in CIS, compared to RRMS patients. However, the higher level of oxidative disorders, based on obtained values of MDA and AOPP, were also demonstrated in these patients. These results are understood as the consequences of higher reactive adequacy of the body and CNS, in CIS patients (due to shorter disease duration). Thus, the prooxidative processes are more pronounced in these patients as an adaptive phenomenon in suppression of neuroinflammation (through some of the known physiological functions), but due to intensive, uncontrolled generation of reactive oxygen species (ROS), detrimental effects are accumulated. Inversely, the general and CNS antioxidative capacity were decreased in RRMS patients due to their continuous exposition to ROS, which explains oxidative stress intensity and worse radiological and clinical findings, which

was confirmed by the obtained correlations. The obtained results show increased level of nitric oxide (NO) during neuroinflammation attacks, when NO \cdot exerts direct or indirect pathological effects on CNS tissues. The CNS disorders in neuroinflammation are also mediated by glutamatergic excitotoxicity, caused by increased level of glutamate as the consequence of astrocytes activation. The increased expression of iNOS, and other parameters of glial cell activity (GFAP, OX42, ED1) as well as glutamatergic excitotoxicity (EAAT1) were found in immunohistochemical analysis of forebrain section obtained from EAE animals. The protective biochemical, immunohistochemical and neurological effects were demonstrated after AG administration and thiol supplementation by NAC. Also, in the clinical part, the oxidative and nitrosative stress importance in the pathogenesis of acute neuroinflammatory attacks were demonstrated, while both general and CNS oxidative and nitrosative profile were different in patients with different clinical phenotypes of neuroinflammation. The significant correlations between tested parameters and clinical and radiological features, as well as disease duration, were obtained in CIS and RRMS patients. These data suggest the closed correlations between disease duration and the worse radiological and neurological score, and decreased antioxidative and antinitrosative profile, as well as increased, general and CNS, oxidative and nitrosative stress. The similar correlations were obtained between all tested parameters and other general parameters of biological and biochemical syndrome of inflammation, in both, CIS and RRMS group.

The obtained results give an advanced insight into the roles and importances of oxidative and nitrosative stress during neuroinflammation and offer the possibility for antioxidative and antinitrosative treatments in acute attacks of neuroinflammation. In this way, the diseases caused by neuroinflammation might be controlled in early phases whose characteristic is reversibility, at the same time delaying later phases which are accompanied with irreversible neurological disabilities. Although there are not ideal biomarkers of neuroinflammation, some of here tested oxidative and nitrosative stress parameters might serve as surrogate biomarkers for the earliest diagnosis, tracking and assessing neuroinflammation intensity, and its radiological and clinical correlates.

Key words: oxidative stress, nitrosative stress, neuroinflammation

LISTA KORIŠĆENIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

AG – aminogvanidin
AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina
cAMP – ciklični adenzin monofosfat
CFA - kompletni Frojndov agens
cGMP – ciklični guanozin monofosfat
CNS - centralni nervni sistem
COX - ciklooksigenaza
DB - dužina bolesti
EAAT – ekscitatorni aminokiselinski transporter
EAE – eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
ED1 – anti-CD68 antitela, marker aktivisanih monocita, makrofaga i mikroglije
EDSS – skala statusa proširene onesposobljenosti
FR - fiziološki rastvor
Gd-DTPA – gadolinijum heliran sa dietilen-triaminopentacetatom
GFAP – glijalni kiseli fibrilarni protein
GR - glutation reduktaza
GSH – redukovani glutation
GSH-Px – glutation peroksidaza
GSSG – oksidisani glutation
GST - glutation-S-transferaza
H₂O₂ - vodonik peroksid
HOCl - hipohlorna kiselina
HS – hiperintenzivni signal
IL - interleukin
INF- interferon
KG – kontrolna grupa
KIS – klinički izolovani sindrom CNS
KM - kičmena moždina
KMB – krv-mozak barijera
MAG - mijelin asocirani glikoprotein
MBP - mijelin bazni protein
MDA – malondialdehid

MM – mali mozak
MMP – matriks metaloproteinaza
MOG - mijelin oligodendrocitni glikoprotein
MR – magnetna rezonanca
MS – multipla skleroza
NAC – N-acetil L cistein
NADPH – nikotiamid adenin dinukleotid fosfat
NFkB - nuklearni transkripcioni faktor
NO – azot monoksid
NO₂ i NO₃ – nitriti i nitrati
NOS (nNOS, iNOS, eNOS) – azot oksid sintaza (neuralna, inducibilna, endotelna)
O₂⁻ - superoksidni anjon
OKT – oligoklonalne trake
ONOO⁻ - peroksinitrit
OX42 - anti-CD11b antitela, marker aktivisanih monocita, dendritskih ćelija i mikroglije
PLP - proteolipid protein
RAV - reaktivne azotne vrste
RKV - reaktivne kiseonične vrste
RRMS – relapsno remitentna multipla skleroza
RSNO – nitrozotoli
SH – tiolne grupe
SOD - superoksid dizmutaza
TGF - faktor rasta tumora
TNF – faktor nekroze tumora
VM – veliki mozak

SADRŽAJ

1. PREGLED LITERATURE	
1.1. INFLAMACIJA	
1.1.1. Patofiziološki aspekti inflamacije	2
1.1.2. Inflamacija i centralni nervni sistem	3
1.1.3. Inflamacija kao vodeći patogenetski mehanizam bolesti CNS	6
1.1.3.1. Multipla skleroza	6
1.1.3.1.1. Epidemiologija	6
1.1.3.1.2. Patofiziologija multiple skleroze	7
1.1.3.1.3. Patomorfološke osnove multiple skleroze	9
1.1.3.1.4. Kliničke manifestacije multiple skleroze	11
1.1.3.1.5. Dijagnoza multiple skleroze	13
1.1.3.1.6. Patogenetska terapija multiple skleroze	14
1.1.3.2. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis	15
1.2. OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES	
1.2.1. Oksidativni metabolizam	17
1.2.1.1. Oksidativna modifikacija proteina	19
1.2.1.2. Lipidna peroksidacija	20
1.2.1.3. Antioksidativni potencijal	22
1.2.1.4. Oksidativni stres	25
1.2.2. Azot monoksid i nitrozativni stres	25
1.2.3. Specifičnosti oksidativnog i nitrozativnog stresa u CNS	27
1.3. OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES I NEUROINFLAMACIJA	
1.3.1. Značaj oksidativnog stresa u neuroinflamaciji	28
1.3.2. Stvaranje i uloga NO [•] u odgovoru na neuroinflamaciju	31
1.3.3. Interakcija oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji	35
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	39
3. MATERIJAL I METODE	42
3.1. EKSPERIMENTALNA STUDIJA	
3.1.1. Životinje	42
3.1.2. Izazivanje EAE	42
3.1.3. Kliničko skorovanje	43
3.1.4. Biohemijske analize	43
3.1.4.1. Koncentracija nitrata i nitrita	43
3.1.4.2. Koncentracija malondialdehida	43
3.1.4.3. Koncentracija redukovanog glutationa	43
3.1.4.4. Aktivnost superoksid dizmutaze	43
3.1.4.5. Koncentracija proteina	43
3.1.5. Imunohistohemija	44
3.2. KLINIČKA STUDIJA	
3.2.1. Kontrolna grupa pacijenata	45
3.2.2. Pacijenti KIS grupe	45
3.2.3. Pacijenti RRMS grupe	45
3.2.4. Klinička procena bolesti	46
3.2.5. Biohemijske analize	46
3.2.5.1. Uzorkovanje krvi i likvora	46

3.2.5.2.	Koncentracija nitrata i nitrita	47
3.2.5.3.	Koncentracija malondialdehida	47
3.2.5.4.	Koncentracija uznapredovalih produkata oksidacije proteina	47
3.2.5.5.	Koncentracija sulfhidrilnih grupa	47
3.2.5.6.	Aktivnost superoksid dizmutaze	47
3.2.6.	Radiološki nalaz	47
3.3.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	48
4. REZULTATI		
4.1. EKSPERIMENTALNI DEO		
4.1.1.	Uticaj aplikovanih supstanci na kliničko ispoljavanje EAE	50
4.1.2.	Uticaj aplikovanih supstanci na imunohistohemijski nalaz u EAE	51
4.1.3.	Uticaj aplikovanih supstanci na nivo nitrata i nitrita u EAE	53
4.1.4.	Uticaj aplikovanih supstanci na intenzitet lipidne peroksidacije u EAE	54
4.1.5.	Uticaj aplikovanih supstanci na koncentraciju GSH u EAE	55
4.1.6.	Uticaj aplikovanih supstanci na aktivnost SOD u EAE	56
4.1.7.	Korelacije koncentracija ispitivanih parametara i kliničkog skora EAE	57
4.2. KLINIČKI DEO		
4.2.1.	Opšte karakteristike pacijenata	58
4.2.2.	Vrednosti parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije	59
4.2.3.	Neurološki nalaz KIS i RRMS pacijenata	60
4.2.4.	Radiološki nalaz KIS i RRMS pacijenata	61
4.2.5.	Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na starost pacijenata	62
4.2.6.	Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na pol pacijenata	63
4.2.7.	Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na nalaz OKT u likvoru	64
4.2.8.	Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na učestalost relapsa u RRMS grupi	66
4.2.9.	Koncentracije nitrata i nitrita u KIS i RRMS pacijenata	66
4.2.10.	Koncentracije MDA u KIS i RRMS pacijenata	69
4.2.11.	Koncentracije AOPP u KIS i RRMS pacijenata	71
4.2.12.	Koncentracije SH grupa u KIS i RRMS pacijenata	74
4.2.13.	Aktivnost SOD u KIS i RRMS pacijenata	76
4.2.14.	Korelacije kliničkog i radiološkog nalaza i dužine trajanja tegoba	79
4.2.15.	Korelacije ispitivanih parametara i kliničkog nalaza	79
4.2.16.	Korelacije ispitivanih parametara i radiološkog nalaza	82
4.2.17.	Korelacije ispitivanih parametara i dužine trajanja tegoba	84
5. DISKUSIJA		
5.1.	Značaj i mesto neuroinflamacije u bifazičnoj patogenezi MS	88
5.2.	Patogenetski značaj modulacije nitrozativnog stresa za tok neuroinflamacije	88
5.3.	Patogenetski značaj modulacije oksidativnog stresa u neuroinflamaciji	94
5.3.1.	Značaj modulisanja procesa lipidne peroksidacije	94
5.3.2.	Patogenetski aspekti uloge i značaja AOPP u neuroinflamaciji	96
5.3.3.	Oštećenje GSH homeostaze u neuroinflamaciji	99
5.3.4.	Poremećaj homeostaze SH grupa u patogenezi humane neuroinflamacije	102
5.3.5.	Patogenetski aspekti promene aktivnosti SOD u neuroinflamaciji	103
5.4.	Modulacija oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji – terapijske perspektive	105
6. ZAKLJUČCI		110
7. LITERATURA		114

1.

*PREGLED
LITERATURE*

1.1. INFLAMACIJA

1.1.1. Patofiziološki aspekti inflamacije

Inflamacija je adaptaciono kompenzatorna reakcija tkiva ili organizma u celosti koja nastaje kao odgovor na potencijalno ili realno narušavanje njegove homeostaze. Najčešće je uzrok inflamacije infektivni ili neinfektivni agens, odnosno trauma (Witte i sar. 2010). Patofiziološki, inflamacija podrazumeva kaskadu metaboličkih, ćelijskih i vaskularnih promena koje za cilj imaju lokalizaciju i neutralizaciju dejstva patogenog agensa i stvaranje uslova za ozdravljenje tkiva (Tracey, 2002). U najranijem odgovoru na dejstvo patogenog agensa aktivira se monocitno-makrofagni sistem sa ciljem fagocitovanja uzročnika oštećenja ili prezentacije njegovih antigena specifičnom imunitetu, zajedno sa molekulima glavnog kompleksa histokompatibilnosti (HLA) domaćina. Ovaj proteinski kompleks ima ključnu ulogu u prepoznavanju antigena vlastitog tkiva (Witko-Sarsat i sar. 2000). U svim inflamatornim procesima intenzivno se stvaraju i oslobađaju proinflamatorni medijatori kao što su faktor nekroze tumora (TNF-alfa), interleukini (IL) 1 i 6, leukotrieni, različiti adhezioni molekuli, vazoaktivni medijatori i reaktivne kiseonične vrste (RKV) (Szelényi, 2001; Ek i sar. 2001). Vodeću patogenetsku ulogu u procesu inflamacije ima i sistem komplementa, set serumskih proteina, koji se u patološkim uslovima grupišu na ćelijskoj membrani i na taj način deluju kao hemoatraktanti za monocite mikrocirkulatornog korita, premda oni mogu dovesti i do direktnog oštećenja ćelijske membrane. Na taj način dolazi do masivnog influksa jona Ca u oštećenu ćeliju, čime se pokreće dalji mehanizam njenog oštećenja (Griffin, 2006). Komponente komplementa se mogu aktivisati na dva različita načina, klasičnim i alternativnim putem. Klasični način aktivacije se pokreće kompleksom antitela i antigena koji se stvori na ćelijskoj membrani, dok alternativni put otpočinje spontano, na površini ćelija stranih organizmu. Na ovaj način nastaju i sporedni produkti koji se takođe smatraju značajnom patogenetskom karikom inflamacije, s obzirom da doprinose njenom daljem razvoju time što dovode do vazodilatacije i priliva novih monocita iz cirkulišuće krvi (Rivest, 2009).

Inflamacija predstavlja složeni patogenetski proces koji je orkestriran nizom citokina - solubilnih medijatora koje luče makrofagi i nosioci specifičnog imuniteta (Fetler i Amigorena, 2005). Svoj efekat na tok i ishod inflamatorne reakcije citokini ostvaruju direktnim oštećenjem ciljne ćelije, ili posredno, modulacijom aktivnosti imunološki kompetentnih ćelija (Block i Hong, 2005; Mrak i Griffin, 2005). Cilj svih metaboličkih, ćelijskih i vaskularnih promena u inflamaciji jeste formiranje njenog „ognjišta” kojim se promena u oštećenom tkivu lokalizuje, čime se onemogućava njeno dalje širenje. U stanjima kada je priroda etiološkog faktora takva da nije moguće dejstvom prve linije imunološke odbrane, monocitno-makrofagnog sistema, lokalizovati oštećenje, kao i onda kada

ekstenzivnost inflamacijskih promena prevazilazi kapacitete nespecifične odbrane organizma, dolazi do aktivisanja nosilaca specifičnog imuniteta (Tansey i Wyss-Coray, 2008).

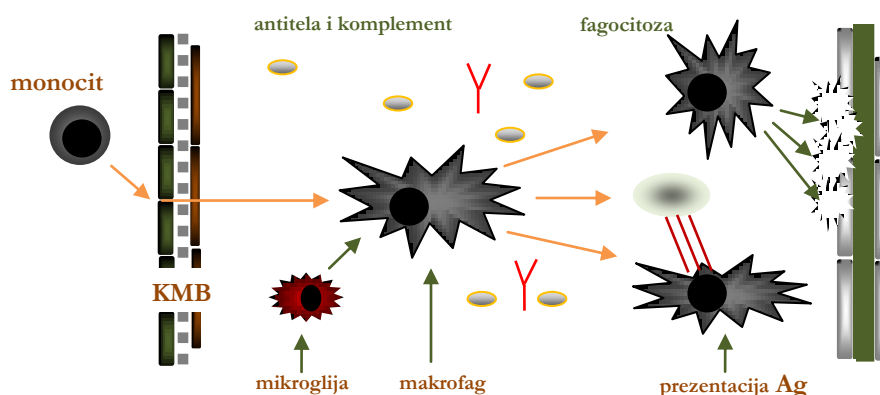
Ćelijski imunitet se aktivira posredstvom antigen prezentujućih ćelija. Rezultat te aktivacije je kontrolisano umnožavanje T limfocita i njihovo dopremanje do prezentovanih antigena kako bi se neutralisao njihov patogeni uticaj. Efekat ćelijskog imuniteta zavisi od broja aktivisanih ćelija i direktno je uslovljen imunobiološkom kompetencijom organizma (Wyss-Coray i Mucke, 2002; Bailey i sar. 2006). Postoje različiti tipovi T limfocita: citotoksični, limfociti pomoćnici i supresorski. Citotoksični T limfociti direktno deluju na ćelije sa ciljnim antigenom i na taj način dovode do njenog oštećenja. Postoji više subpopulacija T limfocita pomoćnika, od kojih su najviše izučavani Th1 tip koji uglavnom aktivira makrofagni sistem kako bi se pojačao T limfocitni odgovor, i Th2 ćelije koje pomažu pokretanje biosinteze antitela posredstvom direktne aktivacije B limfocita. Supresorski T limfociti supresijom imunobiološke aktivnosti ostvaruju efekat kontrole imunološkog odgovora u celosti i na taj način regulišu intenzitet inflamatorne reakcije (Popovich i Longbrake, 2008). S druge strane, aktivisani B limfociti stvaraju imunoglobuline, koji svojim slobodnim domenom mogu vezivati epitope patogenog agensa, dok se drugim vezujućim domenom spajaju sa efektornim ćelijama, i na taj način pokreću neki od opisanih puteva inflamatorne kaskade. Aktivisanje i umnožavanje B limfocita i stvaranje antitela, slično kao i kod ćelijskog imunog odgovora, postaje vodeći patogenetski mehanizam u zavisnosti od koncentracije citokinog stimulusa, što je direktno uslovljeno intenzitetom inflamatornog procesa (Bailey i sar. 2006).

Opisani mehanizmi toka i promocije inflamatornog odgovora organizma najčešće su pokrenuti endogenim ili egzogenim patogenim agensom različite prirode i odvijaju se kao stereotipna, lokalna, inflamatorna, kaskadna reakcija, za šta je neophodna fiziološki konzistentna imunokompetentnost organizma. U svim stanjima kada je imunobiološko stanje organizma narušeno, u slučaju imunodeficijencije, hipersenzitivnosti ili gubitka imunološke tolerancije prema sopstvenim antigenima, intenzitet, tok i ishod inflamatorne reakcije su u velikoj meri izmenjeni (Crutcher i sar. 2006).

1.1.2. Inflamacija i centralni nervni sistem

Centralni nervni sistem (CNS) predstavlja izuzetno osetljivo tkivo koje ima mali kapacitet regeneracije (Ames, 2000). Zbog te činjenice, reakcije inflamacije, koje su patofiziološka osnova gotovo svih vrsta oštećenja CNS, bez obzira na etiologiju, za posledicu imaju oštećenje nervnog tkiva različitog stepena ispoljenosti i reverzibilnosti (Galea i sar. 2007).

Tkivo CNS predstavlja „imunološki privilegovan” deo organizma zbog postojanja krv-mozak barijere (KMB) i odsustva limfnog sistema. Krv-mozak barijera predstavlja fizičku i transportnu barijeru za toksične materije i ćelije koje bi mogle invadirati CNS (Abbott i sar. 2006; Bailey i sar. 2006). Ona je sastavljena od dve biološke barijere. Prvu formiraju tesni spojevi endotelijalnih ćelija moždane mikrocirkulacije, ona sadrži mnogobrojne efluks pumpe, koje eliminišu toksične i raspadne metaboličke produkte iz CNS u sistemska cirkulaciju. Druga se sastoji od bazalne membrane i astrocitnih produžetaka koji čine tzv. glijalnu membranu. Iz ovih razloga, invazija cirkulišućih ćelija u CNS odvija se kroz dva odvojena procesa: 1) transendotelijalnu migraciju u perivaskularni prostor, a potom i 2) infiltraciju parenhima CNS prolaskom kroz glijalnu membranu (Owens i sar. 2008). Ova dva procesa su nezavisno regulisana tako da cirkulišuće ćelije mogu migrirati samo u perivaskularni prostor bez mogućnosti prolaska u parenhim CNS, ukoliko je glijalna membrana morfološki i funkcionalno intaktna (Chan i sar. 2007).



Slika 1. Uloga makrofaga u patogenezi neuroinflamacije i demijelinizacije

Imunološki kompetentne ćelije prisutne u CNS u fiziološkim uslovima su ćelije mikroglije. One predstavljaju rezidentnu ćelijsku populaciju CNS. Pretpostavka je da nastaju transformacijom cirkulišućih monocita i ćelija mijeloidne loze koji kolonizuju CNS u toku njegovog embrionalnog i ranog neonatalnog razvoja (Block i Hong, 2005; Mrak i Griffin, 2005). U fiziološkim uslovima, mikroglia formira razgranatu mrežu dugih ćelijskih produžetaka sa relativno malim ćelijskim telom. U patološkim uslovima, nakon aktivacije, mikroglia se transformiše u fagocitni ćelijski fenotip usled čega se formiraju mnogobrojni ameboidni protoplazmatski produžeci nalik onim koje obrazuju aktivisani makrofagi (Ladeby i sar. 2005) (Slika 1). Sem toga, aktivisana mikroglia stvara i sekretuje različite proinflamatorne citokine, hemokine, RKV i azot monoksid (NO), posredstvom kojih ostvaruje komunikaciju sa drugim ćelijama CNS (Dheen i sar. 2007). Na ovaj način, dolazi do aktivisanja i astrocita čime se oštećuje KMB i omogućava invazija cirkulišućih leukocita u CNS

(Garden i Moller, 2006). Dakle, pokretanje neuroinflamacije predvođeno je aktivacijom mikroglije, dok je sama propagacija neuroinflamacije uzrokovana aktivacijom drugih glijalnih ćelija koje stvaraju RKV, NO i druge hemokine (Dheen i sar. 2007). U perivaskularnom prostoru CNS, fiziološki postoji i tzv. subpopulacija neaktivnih makrofaga koji u patološkom stanju vrše ulogu antigen prezentujućih ćelija i na taj način aktiviraju specifični imuni sistem (Fabriek i sar. 2005). Pored ovih ćelija, za imunološku zaštitu CNS zaduženi su i retki T limfociti koji transendotelijalnom migracijom, posredstvom adhezionih molekula prisutnih na površini endotelnih ćelija kapilara, ulaze u parenhim CNS, ali u odsustvu antigena i/ili autoimune patologije ne pokreću imunološke procese (Rivest, 2009).

Proces inflamacije se pokreće jedino u stanju kada je povećan broj monocita i aktivisanih T limfocita, dopremljenih u CNS iz sistemske cirkulacije, kada je njihov transendotelijalni transport olakšan i ubrzan, kao i u stanju kada u CNS postoje antigeni na koji su, posredstvom antigen prezentujućih ćelija, T limfociti senzibilisani (Kivisakk i sar. 2009). Jednom kada inflamatorni proces otpočne u CNS, on se u daljem toku svoje propagacije odvija kao u bilo kom drugom organu. Povećano se stvaraju molekularni glasnici koji privlače monocite i limfocite, mikroglija se umnožava, pokreće se aktivacija sistema komplementa i stvaraju se antitela (Fetler i Amigorena, 2005).

Imunološka zaštićenost CNS je smanjena u nekim njegovim delovima kao što su parenhim, komore i moždane ovojnice, te ovi delovi mogu biti mesto inflamatorne reakcije nalik onoj koja se javlja u drugim organima (Galea i sar. 2007; Frischer i sar. 2009). S druge strane, moždana kora je manje pogodni supstrat za leukocitnu infiltraciju u poređenju sa belom masom i kičmenom moždinom (Schnell i sar. 1999). Postojanje različite regionalne osetljivosti na inflamaciju u CNS moglo bi biti posledica različite histološke građe, s obzirom da, moždana kora sadrži na milione neuronskih tela i sinapsi, koji pojačavajući KMB na neki način ostvaruju imunosupresivni efekat (Ponomarev i sar. 2005). Ove biološke osobenosti predstavljaju prilog razumevanju postojanja predilekcionih mesta za pojavu inflamacije u CNS.

Narušavanjem KMB, koje u različitom stepenu ispoljenosti postoji u svim neuroinflamatornim procesima, predstavlja ključni mehanizam kojim se „zaštićeno” tkivo CNS izlaže dejstvu aktivisanih nosilaca urođenog i stečenog imuniteta. Stoga, određivanjem odnosa koncentracije albumina u likvoru i serumu, i magnetno rezonantnim pregledom CNS sa paramagnetnim sredstvom kakav je gadolinijum, heliran sa dietilen-triaminopentacetatom (Gd-DTPA) u formi dimeglumenske soli, koji prodire u CNS jedino ako je došlo do oštećenja KMB, ima značajnu ulogu u proceni težine oštećenja KMB i proceni intenziteta neuroinflamatornog procesa (Noseworthy i sar. 2000; Hafler, 2004).

1.1.3. Inflamacija kao vodeći patogenetski mehanizam bolesti CNS

Bez obzira na veliku različitost etioloških faktora, gotovo sve neurološke bolesti u svojoj patogenezi imaju neuroinflamaciju kao vodeći mehanizam nastanka i razvoja bolesti odnosno njene kliničke prezentacije (Griffin, 2006). Aseptična (a retko i septična) inflamacija je patofiziološka osnova cerebrovaskularnih bolesti, ishemijske i/ili hemoragijske geneze, konvulzivnih manifestacija, glavobolja, bolesti motornog neurona, demijelinizacionih i neurodegenerativnih bolesti (Kruger i sar. 2000; Remarque i sar. 2001; Yin i sar. 2008; Flynn i sar. 2008; Brea i sar. 2009; Sims i Muyderman, 2010).

Iako se multipla skleroza (MS) do skora smatrala bolešću CNS, čiji je osnovni patološki supstrat samo demijelinizacija, uslovljena neuroinflamacijom (Hafler, 2004), relativno novija istraživanja ukazuju na postojanje i neurodegenerativnih promena u CNS obolelih od ove bolesti (van Horssen i sar. 2011). Neurodegenerativne promene su uglavnom prisutne u odmaklim fazama bolesti. Brojna istraživanja su sprovedena sa ciljem procene i potvrđivanja uloge neuroinflamacije u patogenezi multiple skleroze (Dutta i sar. 2006; Han i sar. 2008; Frischer i sar. 2009), ali je malo onih čiji rezultati dalju preciznije podatke o ulozi i značaju neuroinflamacije u odnosu na kliničke i parakliničke korelate bolesti (npr. radiološki nalaz). Za potrebe ovih istraživanja u eksperimentalnim uslovima korišćeni su različiti modeli eksperimentalne demijelinizacije (Baxter, 2007; Pahan, 2010).

1.1.3.1. Multipla skleroza

1.1.3.1.1. Epidemiologija

Multipla skleroza je hronična, inflamatorna, imunski posredovana bolest CNS koju karakteriše postojanje neuroinflamacije i demijelinizacije ali i pojava degenerativnih promena aksona (Waxsman, 2005; Vartanian, 2008). Multipla skleroza se smatra najčešćim netraumatskim onesposobljavajućim neurološkim oboljenjem od koga u svetu boluje preko 2.5 miliona ljudi starijih od 18 godina sa pikom oboljavanja između 25 i 35 godine života (Coote i sar. 2013). Nakon ovog perioda učestalost oboljevanja opada, pa se bolest smatra retkom posle 50 godine (Milo i Kahana, 2010). Procenjuje se da u Evropi više od 500000 ljudi boluje od MS (Kingwell i sar. 2013). Procenjena stopa incidencije oboljevanja iznosi 3,6/100000 žena odnosno 2,0/100000 muškaraca. Stopa incidencije registrovana u našoj zemlji (na teritoriji Beograda) iznosi 2 nova slučaja na 100000 stanovnika (Kisic Tepavcevic i sar. 2013). U proseku se bolest javlja 2 godine ranije kod žena u odnosu na muškarce. Učestalost MS smatra se retko stabilnom, tj. broj obolelih raste u funkciji vremena. U regionima sa umerenom klimom incidencija i prevalencija MS rastu sa porastom geografske širine (Pugliatti i sar. 2006). Analiza prevalencije MS u Evropi za oba pola iznosi 79/100000 stanovnika, pri čemu Srbija spada u red zemalja sa prevalencijom između 41,5 i

60/100000 stanovnika. Najviša stopa MS je na Skandinavskom poluostrvu (preko 150/100000), dok je najniža u Evropi, na Malti (0-34/100000) (Kingwell i sar. 2013).

Multipla skleroza je češća kod osoba bele rase u odnosu na pripadnike drugih rasa (Pugliatti i sar. 2006). Procenjena stopa prevalencije MS na prostoru Afrike je od 0,22 do 25/100000 stanovnika (Rosati, 2001). Oko 60% obolelih ostaje bez mogućnosti kretanja posle 20 godina od početka bolesti. Očekivano, mortalitetna stopa obolelih od MS, viša je u ovoj populaciji u odnosu na opštu populaciju, i ima tendenciju opadanja sa vremenom (Pekmezović i sar. 2002). Pokazano je skraćivanje očekivane dužine života obolelih od MS, dok medijana preživljavanja od početka bolesti varira između 27 i 45 godina. Broj godina izgubljenog života iznosi od 5 do 10 godina (Kurtzke, 2005). Multipla skleroza ima ogroman uticaj na socijalno funkcionisanje obolelog i blagostanje njegove porodice (Vartanian, 2008). Zbog ranog gubitka radne sposobnosti ekonomske posledice koje iz toga proizilaze su velike.

1.1.3.1.2. Patofiziologija multiple skleroze

Bez obzira na veliki broj istraživanja koja postavljaju za cilj definisanje etiološke osnove ovog oboljela, etiologija MS je do danas nepoznata. Multipla skleroza predstavlja kompleksno oboljenje u čijoj je patofiziologiji dokazana povezanost genetskih i epigenetskih faktora (Marrie, 2004; Ascherio, 2007a, 2007b). Jasno je definisan genetski rizik, koji podrazumeva sadejstvo više polimorfnih gena, za haplotip DRB1 1501, DRB5 0101 i DQB1 062 koji pripadaju HLA regionu II klase. Pored ovih, za još oko 50 gena van HLA regiona pokazana je umerena udruženost sa celokupnim rizikom za pojavu bolesti (Dincic, 2006). Pored genetskih, značajnim se smatra i efekat faktora rizika iz okruženja kao što su niska izloženost suncu, hipovitaminoza D, infekcija Epstein Barrovim virusom i pušenje cigareta (Ascherio i Munger, 2008; Milo i Kahana, 2010). Činjenica je da ni jedan od pomenutih faktora koji su u studijama izdvojeni kao rizični za pojavu bolesti, nema efekat ni neophodnog, ni dovoljnog, da bi u sadejstvu sa genetskim faktorima doveo do pojave bolesti (Hohlfeld, 2009; Oksenberg i Baranzini, 2010).

Iako etiologija nije rasvetljena, patogeneza bolesti unekoliko je jasnija. Tačku preseka svih pretpostavljenih etioloških faktora čini neuroinflamacija. Preciznije definisanje njenog značaja i uloge u pojavi i razvoju bolesti, od suštinskog je značaja za razumevanje kliničke prirode i otkrivanje efikasnijih terapijskih opcija. Neuroinflamacija je vodeći patogenetski mehanizam u razvoju MS. Ona dovodi do oštećenja mijelinskog omotača i uzrokuje demijelinizaciju usled čega se narušava provodna sposobnost nervnih vlakana u CNS. U odmaklim fazama bolesti narušava se i integritet aksona pa dolazi i do pojave neurodegeneracije (Barnett i sar. 2006; Gold i Wolinsky, 2011). U kojoj će meri ovo oštećenje biti klinički manifestno zavisi od stepena oštećenja mijelina, narušavanja tzv.

sigurnosnog faktora provođenja i elokventnosti zahvaćene zone tj. mesta u CNS na kojem se oštećenje desilo. Ukoliko postoji samo demijelinizaciono oštećenje fiziologija provođenja će biti narušena, ali će usled postojanja transmembranskog provođenja ono ipak biti moguće iako je najčešće jako otežano (Craner i sar. 2004). Stoga, demijelinizaciona oštećenja ne moraju nužno biti funkcionalno značajna, dok je kod aksonskih oštećenja usled potpunog odsustva provođenja klinička manifestacija uvek prisutna (Mahad i sar. 2009).

Mijeliniski omotač nastaje kao produkt aktivnosti oligodendrocita u CNS, odnosno Švanovih ćelija u perifernom nervnom sistemu. Biološki značaj mijelina ogleda se u njegovom izolatorskom svojstvu koje čini da se provođenje naglo nastale promene mirovnog membranskog potencijala tj. generisanog akcionog potencijala, kroz nervno vlakno, od ili ka telu nervne ćelije, vrši brže i to od jednog do drugog Ranvijerovog suženja (Vartanian, 2008). Ova suženja su mesta na nervnom vlaknu na kojima nema mijelinskih omotača. Ovakav način provođenja poznat je kao skokovito provođenje.

U odnosu na prisustvo mijelina tj. brzinu provođenja impulsa kroz nervno vlakno sva nervna vlakna podeljena su na mijelinizirana i ona koja nisu mijelinizirana. U prvoj grupi postoji podela na brza (provode brzinom većom od 30 m/s), i spora (provode brzinom manjoj od 30 m/s). Duž nervnih vlakana postoji različita distribucija jonskih kanala, u prvom redu Na kanala, koji su glavni elektrofiziološki supstrat provođenja i čija je aktivacija pokretač procesa depolarizacije. Oni su uglavnom skoncentrisani na mestu Ranvijerovih suženja (Morrison i sar. 2013). S druge strane, K kanali značajni su za proces repolarizacije i oni su u većem broju prisutni duž internodalne membrane. U demijelinizaciji usled oštećenja internodalnog mijelina, i na taj način usporavanja skokovitog provođenja impulsa duž nervnog vlakna, dolazi do produžavanja internodalnog provođenja i smanjivanja brzine provođenja, što može biti i više desetina puta manje od fiziološki uobičajene brzine (Krishnan i Kiernan, 2013). Dakle, klinička manifestacija demijelinizacije nastaje kao posledica smanjene frekvence impulsa koji u CNS stižu ili se iz njega na periferiju otpremaju, usled tzv. raspršivanja signala, zbog čega se gubi sinhronizacija na sinapsama koja je bitna za proces propagacije akcionog potencijala (Morrison i sar. 2013). Ukoliko se ove promene dešavaju u tzv. neelokventnim zonama CNS, one ne moraju biti klinički relevantne, tj. predstavljaju *tibe* lezije (Vartanian, 2008). Sve opisane promene mogu imati i intermitentni karakter, kada stepen oštećenja nervnih vlakana nije veliki, i kada se, usled nemogućnosti provođenja brzih serija nervnih impulsa javlja klinička prezentacija demijelinizacije u stanjima nakon delovanja nekih deklansirajućih faktora, npr. zamora, porasta telesne temperature, promene jonske homeostaze itd. Ovo je patofiziološko objašnjenje za postojanje tzv. Uhthoffovog fenomena (Frohman i sar. 2013).

U propagaciji procesa oštećenja provođenja značajnom se smatra i neposredna uloga biohumoralnih faktora, cirkulišućih leukocita i antitela (Bachmann i sar. 2006). Paralelno sa opisanim procesom demijelinizacije dešava se i porast broja Na kanala na internodalnim sekvencama demijeliniziranog nervnog vlakna, što predstavlja adaptacioni proces u smeru popravljanja provođenja demijeliniziranog vlakna (Kieseier i sar. 2002). Regeneracijom oligodendrocita ili njihovom transformacijom od preostalih prekursornih ćelija dešava se proces remijelinizacije. Sa napredovanjem bolesti ovaj proces zaostaje za vodećom demijelinizacijom usled čega se povećava neurološka onesposobljenost pacijenta (Griffin, 2006). Usled neusklađenosti ova dva suprotstavljena procesa zbog napredovanja procesa demijelinizacije, u kliničkoj slici se pored očekivanih ispadnih fenomena mogu javiti i pozitivni i paroksizmalni fenomeni koji su posledica spontane ektopične ekscitacije, mehaničke ekscitacije, autoekscitacije i efaptičke ekscitacije (Bo i sar. 2013). Ovo je patofiziološko objašnjenje za pojavu parestezija koje se šire niz kičmenu moždinu, u noge i u ruke pri fleksiji vrata kod obolelih od MS, što je poznato kao *Lhermitov* fenomen.

U opisima morfoloških promena u CNS obolelih od MS, pored gubitka mijelinskog omotača i aksona, uočena je inflamatorna reakcija okolnog nervnog tkiva, perivaskularne lokalizacije sa obiljem limfocita i makrofaga (Ransohoff i sar. 2003). Uočeni makrofagi sadržali su u velikoj količini raspadne produkte mijelina, delimično fagocitovane u intracitoplazmatskom prostoru ovih ćelija (Ley i sar. 2007). Iako je značaj neurodegeneracije u patogenezi MS relativno novijeg datuma, ovi opisi ukazuju takođe, i na prisustvo određenog stepena oštećenja aksona, i to čak kod lezija u ranoj fazi MS (Frischer i sar. 2009). U demijelinizacionim lezijama je uočeno postojanje antimijelinskih antitela, komponenti komplemента i različitih biohumoralnih faktora. Pored inflamatornog infiltrata, akutne lezije karakterisala je velika aktivnost astrocita i mikroglije, uz kompenzatornu aktivaciju očuvanih oligodendrocita, dok se kod starijih lezija u manjem procentu nalazio makrofagni infiltrat tj. neuroinflamacija, dok je astrocitoglioza bila dominantnija i to na račun potiskivanja oligodendrocita (Trapp i Nave, 2008). Činjenica je, da je u patogenezi MS, teško identifikovati moment kada se neuroinflamacija kao vodeći mehanizam bolesti smenjuje astrocitogliozom i narušavanjem integriteta aksona. Ove promene primarno se javljaju u beloj masi, i to bliže granici sa sivom masom (Frischer i sar. 2009).

1.1.3.1.3. Patomorfološke osnove multiple skleroze

Histopatološkom analizom demijelinizacionih lezija, procenom njihove veličine, stepena gubitka proteina i mijelina, oštećenja oligodendrocita i imunopatološkog profila ćelijskog infiltrata, sve demijelinizacione lezije razvrstane su u 4 osnovna tipa. Iako je prisustvo tzv. mešovitog fenotipa

moguće kod jednog bolesnika, ipak u svakom pojedinačnom slučaju preovladava samo jedan od ovih tipova predominantno.

Tip I i II karakterišu se perivaskularnim gubitkom mijelina sa dominacijom T ćelijskog infiltrata i makrofaga, dok su oligodendrociti relativno očuvani, usled čega u ovom tipu lezija postoji zavidan proces remijelinizacije. Tip II se još karakteriše i prisustvom imunoglobulina G i aktivisanog komplementa na mestima oštećenja mijelina (Henderson i sar. 2009). Ova dva tipa demijelinizacije su najčešća. Oni su dokazani u eksperimentalnoj demijelinizaciji, virusnom i autoimunom encefalomijelitisu (Lassmann i sar. 2007; Mix i sar. 2010).

Tip III i IV demijelinizacionih lezija nema predilekciju ka perivaskularnom prostoru. Oba fenotipa se karakterišu prisustvom T ćelijskog i makrofagnog infiltrata. Za razliku od prva dva tipa ovde dominira apoptotska i nekrobiotička smrt oligodendrocita sa neznatno prisutnim procesom remijelinizacije. Tip III karakteriše predominantno gubitak mijelin asociranog glikoproteina (MAG), dok se tip IV ne karakteriše gubitkom pojedinačnih proteinskih molekula. Takođe, u ova dva fenotipa ne postoji udruženost sa imunoglobulinom G niti aktivisanim sistemom komplementa, što sugeriše primarno oligodendropatski profil oštećenja, koji je u osnovi demijelinizacije (Lassmann i sar. 2007; Haider i sar. 2011).

Značaj poznavanja histopatoloških različitosti značajan je za razumevanje patofiziologije MS, jer je izvesno da u različitim kliničkim fenotipovima bolesti nije reč o istom patogenetskom konceptu. Najčešće se od svih histopatoloških fenotipova sreće tip II, a potom tip III pa tip I i IV. Tip I i II karakteristični su za akutnu MS, dok se II tip uglavnom zapaža kod pacijenata sa kratkim trajanjem bolesti. Obrazac IV je najređi, on je predominantno prisutan kod pacijenata sa primarno progresivom formom bolesti (Sakuma i sar. 2004; Henderson i sar. 2009; Haider i sar. 2011).

Inflamatorna reakcija u MS pokrenuta je monocitno-makrofagnom aktivacijom sa posredovanjem T ćelijskog imuniteta, ali je značajan i upliv autoantitela (Agace, 2006; Magliozzi i sar. 2007). Kao potencijalni autoantigeni navode se mijelin bazni protein (MBP), proteolipid protein (PLP), mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG), mijelin asocirani glikoprotein (MAG) i protein S 100 beta (Kaushansky i sar. 2010). Oslobođanje proteinaza u procesu aktivacije efektornih ćelija neuroinflamatorne kaskade smatra se neposrednim razlogom za pokretanje procesa demijelinizacije. Različiti toksični produkti koji se oslobađaju u ovom procesu su takođe značajni za mehanizam daljeg razvoja demijelinizacije (Fletcher i sar. 2010). Senzibilisanje T limfocita na periferiji nekim od pretpostavljenih faktora rizika, koji ispoljavaju bilošku mimikriju sa potencijalnim antigenima CNS, smatra se ključnim u procesu pokretanja neuroinflamatornih reakcija (Carson i sar. 2006). Uporedo sa procesom demijelinizacije, u najčešćim patomorfološkim fenotipovima MS (tip I i II), dolazi do

aktivacije i procesa remijelinizacije. Ovaj proces direktno zavisi od stepena očuvanosti tj. gubitka oligodendrocita i njihovih prekursora, od koncentracije inhibitornih molekula stvorenih u neuroinflamaciji, od stepena astrocitoglioze i stepena receptivnosti oštećenih aksona na dejstvo stimulišućih biohumoralnih faktora (Frischer i sar. 2009).

1.1.3.1.4. Kliničke manifestacije multiple skleroze

Pojava kliničkih simptoma i znakova u akutnom ataku bolesti je posledica oštećenja mijelina i bloka u provođenju nervnog impulsa. Težina i dužina akutnog ataka bolesti je direktno uslovljena odnosom procesa demijelinizacije i remijelinizacije (McFarland i Martin, 2007). Stoga bi preveniranje i ublažavanje procesa demijelinizacije paralelno sa stimulacijom procesa remijelinizacije moglo biti terapijski imperativ u prevenciji i tretmanu akutnih ataka MS.

Ranije se mislilo da je oštećenje aksona u MS uglavnom karakteristika odmaklih faza bolesti, iako je u nekim studijama, postojanje aksonskog oštećenja pronađeno kao jedan od najranijih biomarkera MS (Ferguson i sar. 1997). Rano aksonsko oštećenje nastaje kao posledica intenzivne neuroinflamacije, dok se u kasnijim fazama bolesti ono javlja kao posledica višestrukih subletalnih oštećenja koja zaostaju iz prethodnih neuroinflamatornih ataka (Dutta i sar. 2006; Higgins i sar. 2010). U kasnijim fazama bolesti izostaje trofički uticaj oligodendrocita na neurone usled direktnog oštećenja oligodendrocita, javlja se blok provođenja i povećanje vulnerabilnosti demijeliniziranog aksona (Kieseier i sar. 2002). Progresivna onesposobljenost obolelih od MS nastaje kao posledica aksonalnog oštećenja nekim od opisanih mehanizama usled čega dolazi do gubitka nervnog tkiva u MS lezijama ili Wallerove degeneracije oštećenih nerava, a dalje i do moždane atrofije koja se javlja vremenom (Bermel i Bakshi, 2006). U prilog tome ide i nalaz da se sa progresijom bolesti povećava indeks atrofije mozga i kičmene moždine (Popescu i sar. 2013), do 1% godišnje, što se smatra korisnim prediktorom za procenu evolucije relapsne forme ka progresivnim oblicima MS. Činjenica da i u fazi neurodegeneracije postoje neuroinflamatorni procesi, ukazuju da bi neuroinflamacija mogla biti ciljno mesto za primenu potencijalne neuroprotektivne terapije kojom bi se moglo odložiti ili makar usporiti napredovanje ireverzibilnih promena CNS.

Oštećenje nervnog tkiva u MS je mešovito fenotipa, prisutni su i apoptoza i nekroza. Programirano izumiranje neurona, oligodendrocita i aktivisanih leukocita moglo bi se smatrati u izvesnom smislu i kompenzatornom reakcijom CNS, koja nastaje u odgovoru na dejstvo neuroinflamacije (Izikson i sar. 2002). Sve je više rezultata koji ukazuju da je progresivna onesposobljenost obolelih od MS, bez aktivnih lezija na MR pregledu CNS, ipak udružena sa procesom intenzivnog programiranog odumiranja ćelija CNS (Zhang i sar. 2013). U pokretanju ovog procesa ključnim se smatraju upravo neuronflamatorni procesi koji narušavaju integritet neurona i

menjaju njegovu mikrookolinu, čime se nervno tkivo čini vulnerabilnim, te se aktivira apoptoza kao vid prevencije daljeg oštećenja CNS (Herold i Reichardt, 2013).

Kliničke manifestacije MS su toliko raznovrsne da je gotovo svaki neurološki simptom ili znak, opisan u njenoj kliničkoj prezentaciji. Oni se javljaju kao posledica oštećenja mijelinskog omotača i narušavanja funkcionalnog, a u kasnijem evoluciji bolesti i morfološkog integriteta nervne ćelije. Bolest najčešće počinje pojavom somatosenzornih simptoma, koji mogu biti nadražajni ili negativni, motornim manifestacijama ili pojavom neuritisa optičkog nerva. Tok bolesti je varirajući pa je teško, gotovo nemoguće u njenom početku postaviti pouzdanu prognozu njenog toka. Definisana su 4 osnovna klinička fenotipa bolesti: relapsno remitentna MS (RRMS); sekundarno progresivna MS (SPMS); primarno progresivna MS (PPMS) i progresivno remitentna forma MS (PRMS). U većini slučajeva (80-85%), bolest se karakteriše pogoršanjima koja se smenjuju sa periodima kliničkog poboljšanja (RRMS), premda u malom broju slučajeva (10-15%), tok bolesti od početka može biti progresivan (PPMS), bez perioda koji nisu opterećeni neurološkim tegobama (Lublin i Reingold, 1996).

Svi klinički fenotipovi MS verovatno predstavljaju jedinstveni kontinuum patofiziološkog dešavanja u CNS, čiji je zajednički imenitelj neuroinflamacijom posredovana demijelinizacija, a u odmaklim fazama i neurodegeneracija (Gonsette, 2008). U velikom broju slučajeva bolest se inicijalno manifestuje neurološkom simptomatologijom kada nisu ispunjeni drugi paraklinički dijagnostički kriterijumi za postavljanje definitivne dijagnoze MS. Ovo stanje se naziva klinički izolovani sindrom CNS (KIS) (Miller i sar. 2005). Ovo stanje se smatra kliničkim ekvivalentom najranijih neuroinflamatornih procesa. Istina, većina KIS pacijenata vremenom, ispuni sve kliničke i parakliničke dijagnostičke kriterijume i razvija neki od kliničkih fenotipova MS (Ferraro i sar. 2013).

Generalno, opšte karakteristike akutnog ataka MS podrazumevaju prisustvo senzornih smetnji, motornih abnormalnosti, pojavu cerebelarne simptomatologije, poremećaj vida, poremećaj funkcije moždanog stabla, poremećaj funkcije sfinktera, seksualnu disfunkciju, kognitivne smetnje itd. (Polman i sar. 2011). Pravim akutnim atakom bolesti (za razliku od tzv. pseudoataka) smatra se prisustvo neurološke simptomatologije u trajanju ne manjem od 24h i u odsustvu deklansirajućih faktora poput povišene temperature itd. (Uhtoffov fenomen). Ukoliko je reč o ponovljenom ataku bolesti, od prethodnog ataka bolesti mora proći najmanje mesec dana. Po kliničkom toku MS može biti benigna ili maligna, u odnosu na stepen funkcionalne onesposobljenosti pacijenta koji zaostaje tokom vremena. Benigna MS se karakteriše relativno malom funkcionalnom onesposobljenošću i nakon dužeg vremena od postavljanja dijagnoze (u proseku oko 15 godina), dok malignu formu karakteriše progresivna akumulacija neurološke onesposobljenosti usled čega se ona završava smrću

nakon relativno kratkog perioda od pojave bolesti. U pokušaju da se preciznije definišu prediktori toka i ishoda MS, danas su prepoznati povoljni i nepovoljni prognostički indikatori bolesti. U grupu povoljnih indikatora spadaju početak bolesti u mlađem životnom dobu, ženski pol, početak bolesti sa neuritisom optičkog nerva, postojanje senzornih simptoma na početku bolesti, akutna pojava simptoma, mali rezidualni invaliditet nakon svake pojedinačne egzacerbacije i dug period između egzacerbacija (Pittock i sar. 2004). Nasuprot ovim, u grupu nepovoljnih indikatora spadaju početak bolesti kasnije tokom života, progresivan tok bolesti nakon njenog početka, muški pol, česte egzacerbacije, slab oporavak nakon egzacerbacija, početak sa cerebelarnim i/ili motornim oštećenjem (Gholipour i sar. 2011).

1.1.3.1.5. Dijagnoza multiple skleroze

S obzirom na polimorfnost kliničkog ispljavanja MS može imitirati mnogobrojna druga neurološka oboljenja. Dijagnoza bolesti pored pažljive obrade istorije bolesti podrazumeva i analizu neurološkog ispljavanja i posmatranje razvoja promena u CNS kroz vreme i prostor. Princip dokazivanja diseminacije neuroloških ošteta kroz vreme i u prostoru podrazumeva primenu revidiranih McDonaldovih kriterijuma (Polman i sar. 2011), kojima se objektivizira postojanje neuroloških ispada (kličkim i neuroradiološkim pregledom), isključuju se druge bolesti koje diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir (autoimune, infektivne, metaboličke, sistemske, vaskularne, neurodegenerativne) i dokazuje se diseminacija u vremenu i prostoru primenom dopunskih dijagnostičkih metoda (neuroradioško slikanje mozga i kičmene moždine, pregled likvora, vizuelni evocirani potencijali) (Polman i sar. 2011). Magnetna rezonanca se smatra najsenzitivnijom neuroradiološkom metodom u detekciji promena u mozgu i kičmenoj moždini kod obolelih od MS (Bakshi i sar. 2008). Pomoću MR se verifikuje postojanje zona povišenog intenziteta signala (tzv. hiperintenzivne zone) na T₂ sekvenci i sekvenci protonske gustine. Aktuelnost ovih lezija dokazuje se primenom paramagnetnog kontrastnog sredstva, Gd-DTPA, koji se u slučaju oštećenja KMB deponuje u aktivnim lezijama, a koje se potom vizuelizuju na T₁ sekvenci kao hiperintenzivne regije. Ipak, nalaz ovih promena iako visoko senzitivnan za MS (90-95%), nema sasvim pouzdanu specifičnost za MS, s obzirom da se slične promene mogu naći i u drugim demijelinizacionim i nedemijelinizacionim oboljenjima CNS (Lucchinetti i sar. 2000; Barnett i Prineas, 2004; Trapp, 2004). Nalaz inflamatornog profila u opštoj citobiohemijskoj pretrazi likvora iako je podrška pretpostavci o postojanju inflamatornih procesa u CNS, što može biti korisno u odsustvu promena na MR nalazu, ima malu specifičnost koja je daleko od sasvim pouzdane za postavljanje dijagnoze MS (Confavreux i sar. 2000). Značajan je porast IgG indeksa i nalaz intratekalne sinteze oligoklonalnog imunoglobulina G metodom izolektričnog fokusiranja likvora (tzv. oligoklonalne trake – OKT), sa ili bez sličnog nalaza u serumu obolelog. S druge strane, vizuelni evocirani potencijali mogu doprineti dijagnostici

MS, jer se analizom latence talasa P₁₀₀ mogu dobiti informacije o asimptomatskim lezijama kojim bi se mogla dokazati diseminacija demijelinizacionih lezija u prostoru, onda kada takva potvrda izostaje u nalazu radiološke pretrage CNS (Polman i sar. 2011).

Primenom svih preporučenih dijagnostičkih algoritama moguće je doći do sledećih zaključaka, ukoliko su svi kriterijumi ispunjeni potvrđuje se dijagnoza MS, ukoliko kriterijumi nisu u potpunosti ispunjeni reč je o mogućoj MS, dok, ukoliko većina kriterijuma nije ispunjena onda nije reč o MS (Polman i sar. 2011). Komplikovanim se smatra proces postavljanja dijagnoze MS nakon mogućeg prvog ataka bolesti, odnosno KIS, koji ukazuje na MS (Brex i sar. 2001; Miller i sar. 2005). Rana dijagnostika MS smatra se ključnom za process planiranja primene patogenetski uslovljene terapije sa ciljem potenciranja reverzibilnosti nastalih promena i ciljem preveniranja i odlaganja onesposobljenosti obolelih.

1.1.3.1.6. Patogenetska terapija multiple skleroze

U poslednjoj dekadi prošlog veka, u terapiji multiple skleroze, prihvaćena je primena imunomodulatornih lekova, interferona-beta 1b, kao terapijske opcije prve linije za tretman RRMS, koja menja prirodni tok bolesti (Beck i sar. 2002). Mnogo je dokaza koji idu u prilog efektivnosti tri preparata interferona beta (interferon beta 1b i dva interferona-beta 1a), koji se zajedno sa glatiramer acetatom, sintetskim kopolimerom koji vrši funkcionalnu inhibiciju aktivisanih limfocita, smatraju prvom linijom terapije RRMS (Dhib-Jalbut i Marks, 2010; Thamilarasan i sar. 2013). Efikasnost ovih lekova ne iznenađuje, ako se u obzir uzme imunopatogenetski značaj biohumoralnih faktora u iniciranju i razvoju MS, a koji su još uvek aktuelna tema različitih istraživanja (Mahurkar i sar. 2014).

Ipak, u poslednje vreme postoje i sve češće potvrde delimične efikasnosti ove terapije koji u pojedinim slučajevima samo neznatno smanjuju aktivnost bolesti i blago ili neznatno usporavaju njenu progresiju (Freedman, 2013). Na nedostacima ovih, ali i ranijih terapijskih opcija, razvijane su nove imunomodulatorne strategije među kojima je bila i primena mitoksantrona čiji se imunosupresivni efekat u tretmanu agresivnijih formi MS i dalje testira (Martinelli Boneschi i sar. 2013). Monoklonska antitela nalaze veliku primenu u tretmanu MS. U tu grupu spadaju, natalizumab, rekombinarno humanizovano monoklonsko antitelo na α 4 integrinsku komponentu aktivisanih limfocita, alemtuzumab, antitelo na CD52 glikoprotein limfocita i dendritskih ćelija, daklizumab, antitelo koje se vezuje za alfa lanac IL-2 receptor CD25, rituksimab i okrelizumab koji se vezuju za CD20 protein na površini limfocita (Melzer i Meuth, 2013). Postoje i oralni lekovi poput fingolimoda koji je agonist receptora za sŕingozin-1-fosfat, kladribin, sintetski analog adenozin purinskog nukleotida, lakvinimod, imunomodulator dobijen iz linomida, terflunomid, aktivni metabolit

leflunomida i dimetilfumarat kojim se posebno ostvaruje regulacija imunopatogeneze u MS (Agashivala i sar. 2013).

Sve terapijske opcije polaze od značaja imunoloških mehanizama u patofiziologiji MS i za cilj imaju imunomodulaciju tj. menjanje prirodnog toka bolesti, čime je posebno naglašen značaj imunskih mehanizama u patogenezi MS (Costello, 2013). S druge strane, nedostatak ili delimičnu efikasnost opisanih terapijskih intervencija, koji su saopšteni u nekim studijama (Freedman, 2013), moguće je tumačiti zanemarenim značajem i drugih (ne samo imunogenih), neopravdano potcenjenih patogenetskih mehanizama koji uplivišu prirodni tok MS (Hauser, 2008). Među njima se posebno patogenetskim potencijalom ističu poremećaji redoks ćelijske signalizacije, poremećaj homeostaze NO, kao i različite vaskularne disfunkcije (Ortiz i sar. 2013).

1.1.3.2. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

Za proučavanja različitih patofizioloških aspekata neuroinflamacije i MS, i procenu efikasnosti alternativnih terapijskih intervencija u ovim stanjima, koriste se animalni modeli eksperimentalne demijelinizacije najčešće autoimune, virusne ili toksične geneze (Gold i sar. 2000). Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE) predstavlja naučno standardizovani i široko prihvaćeni model neuroinflamacije, koji je prvi put upotrebljen dvadesetih i tridesetih godina prošlog veka (Koritschoner i Schweinburg, 1925; Rivers i sar. 1933). Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis je T ćelijskim imunitetom posredovana autoimuna bolest CNS koja je, shodno kliničko-patološkoj i imunobiološkoj sličnosti sa humanom MS, najčešće korišćeni model humane neuroinflamacije (Gold i sar. 2006).

Uopšteno, EAE se izaziva imunoindukcijom u osetljivih životinja, korišćenjem emulzije mijelina ili njegovih komponenti, MBP, MOG odnosno PLP, sa ciljem pokretanja imune reakcije, i to u uslovima arteficialno indukovane imunostimulacije sojem Mikobakterijuma tuberkuloze koji je poznat kao kompletni Freundov agens (eng. *Complete Freund's Adjuvant* - CFA). Može biti izazvan aktivno, injiciranjem encefalitogena dispergovanog u CFA, ili pasivno, prenosom T limfocita senzibilisanih na MBP (Baxter, 2007). Mnogim studijama koje su testirale podobnost upotrebe EAE modela za proučavanje neuroinflamacije, i to nakon indukcije različitim metodama i u različitim životinjskih vrsta, potvrđeno je da EAE predstavlja neprikosnoveni eksperimentalni model neuroinflamacije i demijelinizacije (Gold i sar. 2006).

U stanjima kada se encefalomijelitis uzrokuje bilo aktivnom ili pasivnom autoimunom indukcijom, što je najbliže modelu humane neuroinflamacije, javlja se imunostimulacija na mijelin i pojedine njegove delove čime se u daljoj evoluciji promena javljaju perivaskularni ćelijski infiltrati u

tkivu CNS, perivaskularna demijelinizacija i pojava remijelinizacionih procesa. S druge strane, u slučaju EAE koji je uzrokovan virusom, imunoindukcija je primarno usmerena na celularne komponente, oligodendrocite, astrocite i neurone, iako je u daljoj evoluciji neuroinflamacije patomorfološki supstrat ovako uzrokovanog EAE identičan prethodnom. Sličan efekat viđen je i u tzv. toksičnom modelu EAE kojim se cirkulišuće ćelije senzibilisu na oligodendrocitne autoantigene (Hohlfeld i Wekerle, 2001; Rao i Segal, 2012).

U odnosu na vremenski dizajn eksperimenta, EAE može biti akutnog i hroničnog toka (Baxter, 2007). Akutni model je monofazičan i karakteriše se izrazitom neuroinflamacijom koju prati blaga demijelinizacija i najčešće odsutnost neurodegenerativnih procesa. Kod hronične forme EAE, koju karakterišu ponovljeni ataci bolesti, poput RRMS, u patomorfološkom supstratu dominira demijelinizacija sa ekstenzivnim neurodegenerativnim regijama. Stoga je primena akutnog modela EAE korisna u tumačenju neuroinflamatornih procesa i njihovog dovođenja u vezu sa kliničkom manifestacijom bolesti, dok je hronični EAE prijemčiviji za patofiziološku analizu neurodegenerativnih promena koje karakterišu kasnije patogenetske faze bolesti (Gold i sar. 2006).

EAE se može izazvati u različitim životinjskih vrsta, od miša do majmuna, iako je evidentna različitost u osetljivosti različitih životinjskih vrsta na različite antigene, pa se tako klinički tok i intenzitet neuroinflamacije razlikuju od vrste do vrste. Postoje dokazi o genetskoj kontroli osetljivosti pojedinih životinjskih vrsta ka obolevanju od EAE. Neke životinjske vrste pokazuju jasnu rezistentnost dok su druge osetljivije na indukciju EAE (Rao i Segal, 2012; Soellner i sar. 2013). Senzibilisajući antigen može biti cela ili samo deo encefalitične mase ili kičmene moždine obolele životinje, premda se često koriste samo encefalitični fragmenti MBP. Kod različitih vrsta različito je mesto u konformacionoj strukturi MBP koje se smatra encefalitičnim. Samo su encefalitični epitopni segmenti MBP odgovorni za indukovanje programirane deobe T limfocita, koja je uzročnik neuroinflamacije (Tian i sar. 2013). Najpotentnijim u indukovanju EAE se smatra MBP zamorca, dok su zečji, goveđi i humani protein manje potentni. U tome nalazimo objašnjenje za potrebu istovremene primene MBP dobijenog od drugih životinjskih vrsta (ne zamorca) i CFA u indukovanju EAE, s obzirom da CFA ima ulogu tzv. nezavisnog i nespecifičnog stimulatora deobe pojedinih populacija T limfocita. Takođe, pretpostavka je da CFA doprinosi imunoindukciji tako što menja konfiguraciju molekula antigena, čime dovodi do potpune ekspresije prikrivenih antigenih determinantni MBP. Aktivna jedinica u pokretanju EAE je kompleks encefalitogen-adjuvans (Zheng i sar. 2013). U svrhu potpune imunostimulacije često se injicira i koadjuvans koji sadrži antigene Bordetelle pertusis. Pertusinogen je vazoaktivna supstanca koja povećava propustljivost KMB, čime se omogućava infiltracija CNS senzibilisanim, cirkulišućim leukocitima (Pachner, 2011). Najznačajniji u patogenezi EAE je T ćelijski imunitet, pri čemu su od posebnog značaja T limfociti senzibilisani na

MBP. Reč je o T limfocitima sa citolitičkim potencijalom, koji je pomognut biohumoralnom signalizacijom aktivisane mikroglije i astrocita koji imaju ulogu antigen prezentujućih ćelija (Nicot i sar. 2003; Ruck i sar. 2013).

Ovaj eksperimentalni model, poput MS, karakteriše polimorfno neurološko ispoljavanje, počev od gubitka tonusa repa, sa napredovanjem, do slabosti i oduzetosti zadnjih, a potom i prednjih nogu sve do smrti. Nakon perioda od 7. do 10. dana od indukovanja EAE, bolest se manifestuje akutnim atacima trajanja do 5 dana, a potom ulazi u period remisije posle 14. dana (Sajad i sar. 2009; Pachner, 2011). Kod hroničnog EAE, spontani relaps se javlja od 18. do 25. dana od senzibilizacije sa istim intenzitetom kliničke manifestacije kao i u akutnoj fazi. Životinje koje prežive EAE ozdrave u periodu od 30 do 40. dana nakon senzibilizacije. Resenzibilizacijom se bolest može ponovo indukovati kod prethodno aktivno indukovanog EAE i to samo pasivnom transmisijom mijelinskog antigena (Zorzella-Pezavento i sar. 2013).

1.2. OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES

1.2.1. Oksidativni metabolizam

Slobodni radikali predstavljaju atome, molekule ili jone sa nesparenim elektronima. Oni nastaju u biološkim sistemima usled raskidanja kovalentnih veza u procesu homo ili heterolize ili posredstvom transfera elektrona. Shodno naelektrisanju mogu biti anjoni (negativno naelektrisani) ili katjoni (pozitivno naelektrisani). Zbog izuzetne hemijske nestabilnosti, slobodni radikali stupaju u hemijske reakcije sa drugim slobodnim radikalima i neradikalnim molekulima. To ih čini vodećom patogenetskom karikom u mnogim patološkim stanjima (Rizvi i Maurya, 2007). Slobodni radikali nastaju u različitim uslovima: u toku oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, u procesu fagocitoze, u reakcijama biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatskom retikulumu, u enzimskim reakcijama koje katalizuju oksidaze, u procesu sinteze eikosanoida, u reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom (van Horssen i sar. 2008). Kao posledica delovanja stvorenih slobodnih radikala nastaje lipidna peroksidacija, premda se i tokom samog procesa lipidne peroksidacije slobodni radikali stvaraju u povećanoj koncentraciji.

Sve reaktivne hemijske vrste (radikalske i neradikalske), mogu biti kiseonične, reaktivne vrste azota, ugljenika i reaktivne vrste sumpora (Tasset i sar. 2012). Najznačajnije RKV su superoksidni (O_2^-), hidroksil ($HO\cdot$), peroksil ($RO_2\cdot$), alkoksil ($RO\cdot$) i hidroperoksil ($HO_2\cdot$) radikal, i vodonik

peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$), ozon (O_3) i singletni kiseonik (1O_2) iz grupe neradikaliskih RKV (Kancheva i Kasaikina, 2013). Značajne radikalne reaktivne vrste azota (RVA) su azot monoksid (NO), azot dioksid (NO_2) i peroksinitrit ($ONOO\cdot$), dok su iz grupe neradikaliskih RAV najznačajniji azot dioksid anjon (NO_2^-), azot trioksid (N_2O_3), nitronijum jon (NO_2^+), peroksinitritni anjon ($ONOO^-$), alkil peroksinitrit ($ROONO$), singlet i triplet nitroksil anjon (NO^-), nitrozil katjon (NO^+) i nitril hlorid (NO_2Cl) (Suarez i sar. 2013). Od reaktivnih vrsta ugljenika značajni su alkil radikal ($R\cdot$), alkoksil radikal ($RO\cdot$) i peroksil radikal ($ROO\cdot$), dok su bitne reaktivne vrste sumpora tiol radikal ($RS\cdot$), glutationil (GS) i diglutatiol anjon ($GSSG^-$) radikal (Ullevig i sar. 2013). Bez obzira na veliki patogenetski potencijal, reaktivne vrste smatraju se izuzetno bitnim i za obavljanje niza fizioloških funkcija u organizmu, kao što su proces ćelijske proliferacije, deobe, programirane smrti. U uslovima kada je njihovo stvaranje prekomerno, reaktivne vrste ispoljavaju niz štetnih efekata koji su uglavnom posredovani modifikacijom DNK, proteina i lipida (Erden Inal i sar. 2001; Schreibelt i sar. 2007).

Shodno činjenici da u uslovima aerobnog metabolizma najveći promet u organizmu ostvaruje O_2 , najbrojne i najznačajnije su RKV, i to na prvom mestu O_2^- . On se stvara u procesu transporta elektrona u mitohondrijama ili u endoplazmatskom retikulumu, autooksidacijom redoks aktivnih supstrata, glikacijom proteina i oksidacijom tiola (Miller, 2004). S druge strane, O_2^- se stvara i u enzimski posredovanim procesima, u fagocitima posredstvom ksantin oksidaze i NADPH oksidaze (Namaki i sar. 2009). Biološki značaj O_2^- leži u činjenici da se na ovaj način O_2^- direktno uključuje u procese fagocitoze, pomažući fagocitozu patogenog agensa. U uslovima prekomernog stvaranja O_2^- , kao što je to slučaj u ognjištu zapaljenja, O_2^- spontano dizmutuje u H_2O_2 . Superoksidni anjon se u vodenoj sredini ponaša kao redukciono sredstvo, dok u neutralnoj i baznoj sredini može posredovati u oksidaciji brojnih supstrata kao što su kateholamini, vitamin E i C, tioli i leukoflavini (Afonso i sar. 2007). Shodno činjenici da je lako difuzibilan O_2^- predstavlja izuzetno toksični kiseonični radikal. Uklanja se posredstvom enzima superoksid dizmutaze (SOD) konverzijom do H_2O_2 kojim su bogati upravo delovi ćelija u kojima se O_2^- stvara u visokoj koncentraciji (Johnson i Giulivi, 2005).

Vodonik peroksid se stvara u peroksisomima, mitohondrijama, mikrozomalnoj frakciji ćelije i u ćelijskim membranama (Ramming i Appenzeller-Herzog, 2013). U najvećoj meri H_2O_2 se stvara dizmutacijom O_2^- iako može nastati i direktnim dejstvom ksantin oksidaze. Toksičnost H_2O_2 se višestruko povećava stvaranjem $HOCl$ posredstvom mijeloperoksidaze fagocita, i uključivanjem u modifikovanu Haber Weisovu reakciju u kojoj se H_2O_2 direktno redukuje pomoću O_2^- uz produkciju HO , O_2 i OH^- . U uslovima kada je koncentracija slobodnog Fe visoka, toksičnost H_2O_2 se takođe višestruko povećava. U visokim koncentracijama H_2O_2 ispoljava citocidni efekat, dok je u manjim

koncentracijama stimulator ćelijskog rasta i deobe ćelije, induktor apoptoze u inficiranim ćelijama i ćelijama okolnog tkiva i direktni stimulator pentoznog puta (Woolley i sar. 2013).

Hidroksilni radikal je najreaktivniji poznati hemijski radikal. Stvara se u procesu monovalentne redukcije O_2 u toku ćelijskog metabolizma, u procesu redukcije H_2O_2 metalnim katjonima, u Fe katalizovanoj Haber Weisovoj reakciji, u toku reakcija u kojima se stvaraju O_2^- i H_2O_2 , i dejstvom peroksidaze. Hidroksilni radikal može nastati u reakciji O_2^- sa hidroperoksidima, produktima lipidne peroksidacije, što u osnovi znači početak kontinuiranog stvaranja OH^- nakon inicijacije procesa lipidne peroksidacije. Izuzetna reaktivnost OH^- ogleda se u brojnim hemijskim interakcijama sa biomolekulima poput DNK, proteina, polisaharida i lipida (Piloni i sar. 2013). Prekomerno stvaranje OH^- karakteristika je brojnih patoloških procesa, u prvom redu onih koji se karakterišu postojanjem inflamatorne reakcije (Korbecki i sar. 2013).

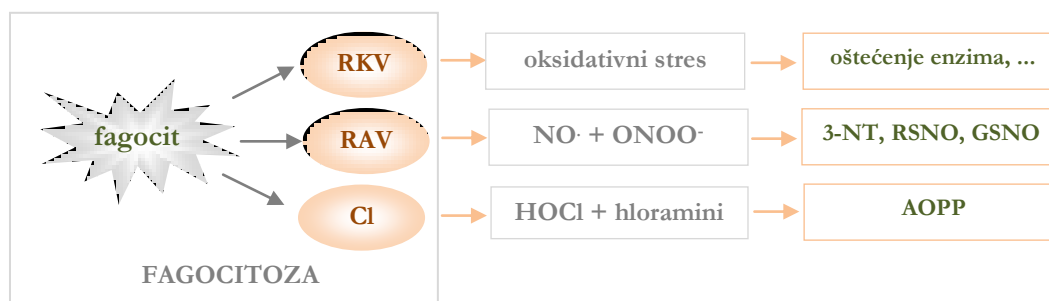
1.2.1.1. Oksidativna modifikacija proteina

Oksidativna modifikacija proteina podrazumeva kovalentnu modifikaciju proteina, koja nastaje kao posledica dejstva reaktivnih hemijskih vrsta ili produkata njihove interakcije sa drugim biomolekulima. Bolesti CNS, u prvom redu one u čijoj osnovi stoje inflamatorni procesi, predstavljaju stanja u kojima se ove vrste promene nalaze u velikoj meri (Ozyazgan i sar. 2013).

Oksidativna modifikacija proteina može nastati dejstvom različitih agenasa kao što su slobodni radikali i neradikalske reaktivne vrste, dejstvom aktivisanih fagocita, u prisustvu lipidnih peroksida, u mitohondrijama (elektron transportnom lancu), u procesu oksidoreduktaznih mehanizama, dejstvom lekova, metabolita, u sistemu oksidiza mešovite funkcije, ksantin oksidaznoj reakciji, u procesu stvaranja prostaglandina. Kao posledica svih ovih stanja dolazi do izmene primarne strukture proteina usled promena na molekulima aminokiselinskih rezidua, ili do kompletnog gubitka neke aminokiseline (Feligioni i Nistico, 2013; Sitar i sar. 2013).

Takođe, u ovom procesu se narušava sekundarna i tercijarna struktura proteina, što dovodi do agregacije ili fragmentacije polipeptidnog makromolekula (Sitar i sar. 2013). Ovo uzrokuje promene fizičko hemijskih karakteristika proteina, menja njihovu rastvorljivost u biološkim tečnostima, menja njihova elektrofiziološka svojstva, termičku stabilnost, viskoznost, fluorescenciju (Sadowska-Bartosz i sar. 2013). Ipak, različite amino-kiseline imaju različitu prijemčivost za reakciju sa agensima koji dovode do oksidativne modifikacije proteina. Ta sklonost je određena biohemijskim svojstvima amino-kiselina. Derivati oksidativne modifikacije pojedinih amino-kiselina mogu biti disulfidi i mešoviti sulfidi (nastali dejstvom na cistein), sulfoksidi (nastali dejstvom na metionin), ditirozin, nitrotirozin, hlortirozin (dejstvom na tirozin), hidroksi i nitro triptofan (dejstvom na

triptofan), itd. Pored toga, pojedine sekvence polipeptidnih fragmenata predstavljaju ciljno tj. katjon vezujuće mesto za vezivanje induktora oksidativnih promena proteina, koji u krajnjem dovode do agregacije i fragmentacije proteina i sledstvenog gubitka njihove uloge (Go i Jones, 2013).



Slika 2. Mehanizam oštećenja proteina u procesu fagocitoze

Hipohlorit i peroksinitrit predstavljaju najznačajnije neradikalske induktore oksidativne modifikacije proteina. U ovim reakcijama, naročito karakterističnim za inflamatorne procese, nastaju hloro i ditirozil produkti, amino-kiselinski adukti, hloramini i nitrotirozin (Boersma i sar. 2013). Produkti oksidativne modifikacije proteina takođe mogu biti i kompleksi proteina sa nekim neproteinskim jedinjenjima, poput onih koji nastaju kao krajnji produkti procesa lipidne peroksidacije (malondialdehid, akrolein), ili poput produkata koji nastaju procesom glikacije proteina. U ovim reakcijama nastaju uznapredovali produkti oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products* – AOPP), i krajnji produkti glikacije proteina (eng. *advanced glycation end product* - AGE) (Perez Gutierrez i sar. 2010). Oni se smatraju izuzetno patogenim zbog činjenice da postaju generatori slobodnih radikala i nezavisni promoteri daljeg širenja procesa njihovog nekontrolisanog stvaranja (Go i Jones, 2013) (Slika 2).

1.2.1.2. Lipidna peroksidacija

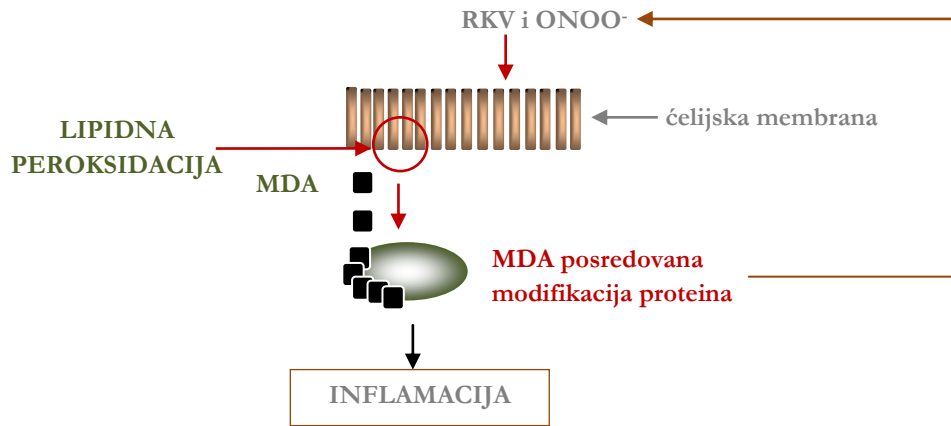
Lipidi predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja koja su važna kao izvor energije, konstituenti membrane i CNS, termički i elektrolitni provodnici i kao lokalni hormoni. Peroksidacija lipida predstavlja jedan od najčešće proučavanih procesa poremećaja redoks ćelijske signalizacije u kojem ključnu ulogu imaju slobodni radikali. Ćelijske membrane su mesto kontrole ćelijskog rasta, deobe, diferencijacije i smrti ćelije. One su lipoproteinskog sastava pri čemu su proteini diskontinuirano uronjeni u lipidni dvosloj. Lipidni deo sastavljen je od fosfolipida, holesterola i glikolipida, u kojima su najčešće prisutne masne kiseline sa 14 do 21 C atoma, sa dvogubim vezama u *cis* konfiguraciji (Ferretti i Bacchetti, 2011). Najvažnija za proces lipidne peroksidacije je arahidonska

kiselina, kao višestruko nezasićena masna kiselina. Lipidna peroksidacija narušava fizičko hemijske osobine lipida, povećava propustljivost membrane i dovodi do oštećenja same ćelije (Nam, 2011).

Međutim, procesom lipidne peroksidacije ostvaruju se i neke značajne regulatorne funkcije, poput regulacije jonskog transporta u mitohondrijama, ćelijska proliferacija, inicijacija odumiranja ćelije, sinteza biološki aktivnih eikosanoida, proces maturacije različitih ćelijskih populacija, razgradnja membranskih struktura, konvertovanje fiziološki aktivne frakcije citohroma p450 u katalički neaktivnu citohrom P 420, itd. (Yeagle, 2013). U patološkim uslovima nekontrolisanog širenja procesa lipidne peroksidacije dolazi do narušavanja barijerne funkcije membrane, slabljenja protein lipid interakcije, povećanja katalitičke aktivnosti i smanjenja termalne stabilnosti membranskih proteina (Nam, 2011) (Slika 3). Da bi proces lipidne peroksidacije otpočeo i bio kontinuirano nastavljen, a potom i kontrolisano zaustavljen, neophodno je prisustvo supstrata koji oksidiše, prisustvo RKV sa visokim oksidativnim potencijalom, prisustvo O₂, metala sa promenljivom valencom, i delovanje antioksidativnih enzima, vitamina i antioksidanasa važnih za završetak ovog procesa. Peroksidacija masnih kiselina može biti neenzimska, kada je neophodno prisustvo slobodnih radikala, a proces se nastavlja autooksidacijom. Lipidna peroksidacija može biti i enzimski posredovana i u tom slučaju se stvaraju eikosanoidi (Ren i sar. 2013).

Autooksidacija je karakteristika neenzimske peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina. Ona se odvija fazno i prolazi kroz fazu inicijacije, propagacije i terminacije. U pokretanju ovog procesa ključnu ulogu imaju OH[•], singletni kiseonik, perhidroksil radikal i tioli (Kocha i sar. 2007). U interakciji ovih agenasa i masnih kiselina ćelijske membrane stvaraju se alkil radikali nezasićenih masnih kiselina, od kojih u procesima dalje transformacije nastaju konjugovani dieni. Oni reaguju sa O₂ i obrazuju lipidperoksid radikal koji zbog izrazite nestabilnosti stupa u dalju interakciju sa masnim kiselinama čime doprinosi kontinuitetu procesa lipidne peroksidacije (Nam, 2011; Quintana i sar. 2012). U prisustvu metala sa promenljivom valencom, npr. Fe, stvaraju se uslovi za pokretanje Fentonove reakcije u kojoj nastaju OH[•] radikal i obrazuju se alkoksi i peroksi radikali koji mogu nezavisno da iniciraju proces lipidne peroksidacije (Pandey i Rizvi, 2009). Neposredni produkti lipidne peroksidacije predstavljaju potentne izvore OH[•], čime uzimaju učešća u daljoj propagaciji ovog procesa.

Lipidna peroksidacija može biti zaustavljena u slučaju reagovanja peroksid radikala i α tokoferola ili reagovanjem alkil radikala sa lipidnim peroksidima, pri čemu se formiraju dimeri ili odgovarajući hidroksi derivari, mada je terminacija moguća i u slučaju reakcije lipidnih peroksida i membranskih proteina (Nam, 2011; Ren i sar. 2013).



Slika 3. Uloga lipidne peroksidacije u patogenezi inflamacije

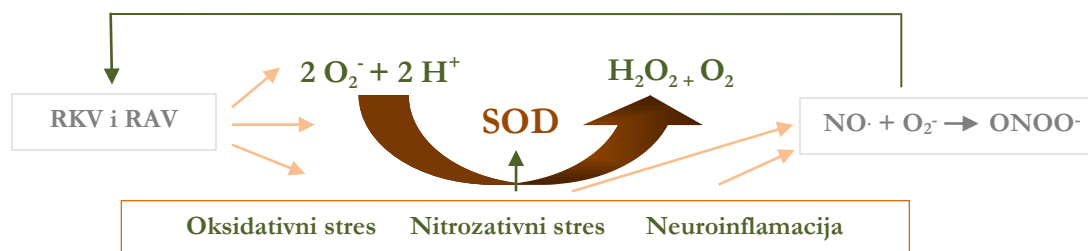
Nakon oksidacije alkoksi radikala nastaje dihidroperoksid čijom razgradnjom nastaju sekundarni krajnji produkti lipidne peroksidacije, isparljivi kratkolančani ugljovodonici, alkani i alkeni, aldehidi (4-hidroksipental) i kratkolančani malondialdehid (MDA). Pokazano je da ovi produkti pri malim koncentracijama izazivaju hemotaksu, aktivaciju guanil ciklaze i fosfolipaze C (Yeagle, 2013). Pri većoj koncentraciji oni uzrokuju inhibiciju sinteze proteina i DNK. Malondialdehid se vezuje za lizinske ostatke proteina, za nukleinske kiseline i fosfolipide, dovodi do modifikacije LDL i ispoljava brojna mutagena dejstva. Ima svojstvo da ihbibiše brojne tiol zavisne enzime (Mitosek-Szewczyk i sar. 2010).

Opisanim mehanizmima lipidna peroksidacija narušava barijernu funkciju ćelijske membrane, inaktiviše membranske enzime, povećava propustljivost za vodu, jednovalentne i dvovalentne jone, a često i za visokomolekularna jedinjenja. Oštećenjem lizosomalnih membrana omogućava se izlazak hidrolitičkih enzima, dok oštećenje mitohondrijalne membrane dovodi do oslobađanja jona Ca i aktivacije enzima zavisnih od ovog jona (Pandey i Rizvi, 2010).

1.2.1.3. Antioksidativni potencijal

Antioksidanse čini set različitih enzimskih i neenzimskih komponenti koji antioksidativni efekat ostvaruju sprečavanjem stvaranja radikala, neutralizacijom i umanjemjem efekata njihovog stvaranja i učestvovanjem u reparaciji oksidativno izmenjenih biomolekula. Enzime antioksidativne zaštite čine superoksid dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSH-Px), katalaza, glutation-S-transferaza (GST), glutation reduktaza (GR). Neenzimske komponente antioksidativnog potencijala organizma čine liposolubilni i hidrosolubilni antioksidansi, kao što su vitamin E, vitamin A, karoteni, koenzim Q, vitamin c, glutation (GSH), cistein, mokraćna kiselina, albumin, transferin, feritin, ceruloplazmin, biliverdin, bilirubin, poliamini itd (Sims-Robinson i sar. 2013).

Superoksid dizmutaza (SOD) predstavlja najznačajniju komponentu enzimskog antioksidativnog sistema. Eukariotski organizmi poseduju tri familije ovog enzima, citozolarnu Cu-, ZnSOD, mitohondrijalnu, MnSOD i ekstracelularnu EcSOD (Sarsour i sar. 2013). Citozolarna SOD je značajna za proces dizmutacije O_2^- u H_2O_2 (Slika 4).



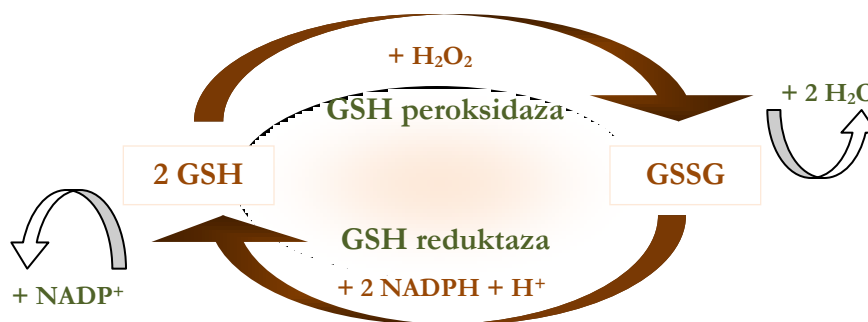
Slika 4. Mehanizam antioksidativnog dejstva SOD

Iako je predominantno prisutna u citoplazmi, SOD se može naći i u endoplazmatskom retikulumu, jedru i lizozomima. Molekul SOD je homodimerna struktura molekulske mase 32 kDa. Gen odgovoran za sintezu SOD se nalazi na 21. hromozomu. Bakar u molekulu SOD je značajan za njena katalitička svojstva, dok je Zn značajan za stabilizaciju prostorne konformacije SOD. Ovaj enzim predstavlja izuzetno osetljivu strukturu koja se lako može inaktivirati procesom oksidativne modifikacije i glikozilacije (Sheng i sar. 2012). Mitohondrijalna SOD se sintetisuje na ribozomima, u vidu prekursornog molekula, a potom se transportuje u mitohondrijalni matriks. Gen za ovu familiju SOD se nalazi na hromozomu 6. Ova SOD je tetramerna struktura, koja u humanoj populaciji pokazuje izuzetni genetski polimorfizam. Svaki od opisanih polimorfizama karakteriše različit stepen enzimske aktivnosti (Mirshafiey i Mohsenzadegan, 2009). Ekstracelularna SOD se nalazi u telesnim tečnostima, plazmi, limfi i likvoru. Predstavlja homotetramerni glikoprotein molekulske mase 135 kDa. Ovu izoformu SOD sintetisuje gljalne ćelije, makrofagi, endotelijalne ćelije. Ova familija SOD značajna je i za održavanje optimalne koncentracije NO^- i promet arginina (Carillon i sar. 2013).

Regulacija genske ekspresije za SOD postiže se mnogim faktorima poput različitih hemijskih agenasa, citokina, $TNF-\alpha$. Obezbeđivanje optimalne koncentracije SOD u uslovima oksidativnog stresa može se postići različitim terapijskim intervencijama, aplikacijom SOD proteina u formi lizozoma ili konjugovanog enzima ili transfekcijom/transdukcijom egzogene SOD cDNK vektorima poput plazmida i adenovirusa (Qi i sar. 2007).

Glutation (GSH), γ -glutamilcisteinilglicin, se nalazi u intraćelijskom prostoru u koncentraciji od 1 do 10 mmol, u zavisnosti od vrste ćelijske populacije. Čini preko 90% ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja u ćeliji. Glutation je donor redukujućih ekvivalenata u mnogim reakcijama.

Koristi se kao kosupstrat u enzimskoj reakciji koju katalizuje GSH-Px, pri čemu u toj reakciji nastaje oksidisani glutation (GSSG). Dejstvom GR iz GSSG nastaje GSH u prisustvu NADPH (Slika 5). Ovim oksidoredukcionim ciklusom se prevenira gubitak GSH. Biosinteza GSH direktno zavisi od dostupnosti cisteina, i aktivnosti glutamat-cistein ligaze. Aktivnost ovog enzima može biti bitno izmenjena u uslovima S-nitrozilacije, fosforilacije i oksidativne modifikacije proteina (Heather i Teismann, 2009).



Slika 5. Mehanizam regeneracije GSH

Pored opisanih, veliki značaj u antioksidativnoj zaštiti ima i GSH-Px koja katalizuje GSH zavisnu redukciju H₂O₂ u H₂O i organske hidroperoksida, i dalje do odgovarajućih alkohola. Opisane su dve izoforme ovog enzima, membranska i citozolarna. Katalaza je hem enzim koji se pretežno nalazi u peroksisomima i mitohondrijama. Po strukturi je homotetramer kodiran egzonskom sekvencom na 11. hromozomu. Katalizuje razgradnju H₂O₂ do H₂O i O₂. U peroksidnoj reakciji vrši oksidaciju H donora uz utrošak jednog molekula H₂O₂. Pri niskim koncentracijama H₂O₂ i pri normalnim koncentracijama GSH dominira GSH peroksidaza u razgradnji H₂O₂ (Baud i sar. 2004; van Horssen i sar. 2008).

U grupi neenzimskim antioksidanasa najznačajniji su vitamin E, koji svoje antioksidativno dejstvo ostvaruje posredstvom imunostimulacije, povećanja nivoa GSH, zaštite LDL i VLDL partikula od oksidacije. Vitamin C antioksidativni efekat ostvaruje redukcijom nitrozamina, reakcijama sa OH⁻, detoksikacijom ksenobiotika, imunomodulacijom itd. Karotini, koenzim Q, mokraćna kiselina, melatonin, albumin, ceruloplazmin, transferin, feritin, laktoferin, bilirubin i poliamini spadaju u red značajnih endogenih regulatora antioksidativnog potencijala organizma (Keller i sar. 2004). Efekat ostvaruju neutralizacijom slobodnih radikala, direktnom reakcijom sa neradikalnim reaktivnim hemijskim vrstama, stvaranjem stabilnih kompleksa, stimulacijom stvaranja imunomodulatora ili inhibicijom metaboličke kaskade arahidonske kiseline (Halldorsdottir i sar. 2013). Ovo su samo neki od dokazanih mehanizama kojim endogeni antioksidansi ostvaruju svoj protektivni efekat.

1.2.1.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres je patološko stanje koje podrazumeva prekomernu produkciju RKV u uslovima kada je njihova eliminacija smanjena (Penga i sar. 2012). U fiziološkim uslovima, zahvaljujući efikasnosti enzimskog antioksidativnog potencijala organizma (SOD, katalaza, itd.) i neenzimskih molekula (GSH, vitamin C, vitamin E, bilirubin, itd.), koncentracija RKV je mala i tada RKV ispoljavaju niz korisnih, fizioloških svojstava. Ona podrazumevaju regulaciju deobe i rasta ćelije, regulaciju apoptoze, oksidativne modifikacije biomolekula u ekstracelularnom prostoru, zaštitu od invazije patogena itd. (Han i sar. 2008). Reaktivne kiseonične vrste i produkti njihove interakcije sa drugim biomolekulima dovode do mutacija DNK, oštećenja jonskih kanala, intenziviranja procesa lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i drugih biomolekula (Pitt i sar. 2000; Lambeth, 2004). U uslovima oksidativnog stresa, RKV mogu direktno pokretati kaskadu proinflamatornih dešavanja stimulisanjem stvaranja citokina, oštećenjem KMB i omogućavanjem prodora nosilaca imunog sistema u CNS (Ilhan i sar. 2004). S druge strane, najznačajniji posrednik u svim opisanim oksidativnim procesima je ONOO⁻, koji nastaje kao proizvod reakcije NO[•] i O₂⁻ (Witte i sar. 2009; Pahan i Mondal, 2012).

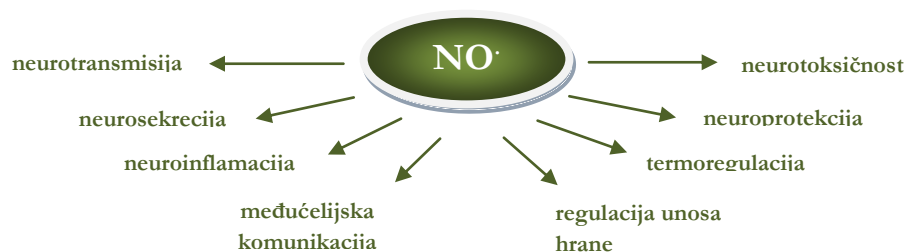
1.2.2. Azot monoksid i nitrozativni stres

Azot monoksid je intercelularni signalni molekul koji ostvaruje niz fizioloških funkcija u organizmu. On učestvuje u regulaciji vaskularnog tonusa, regulaciji motiliteta gastrointestinalnog trakta, procesima agregacije i adhezije trombocita, procesima programirane smrti ćelija, proliferaciji i neurotransmisiji (Guix i sar. 2005). Azot monoksid u CNS ostvaruje niz efekata, poput interneuronske komunikacije, sinaptičke plastičnosti, stvaranja memorije, obavljanja funkcije receptora, učestvuje u interačelijskoj signalizaciji i oslobađanju neurotransmitera (Calabrese i sar. 2007) (Slika 6). Azot monoksid je lipofilni molekulski medijator, koji lako difunduje kroz ćelijsku membranu i lako stupa u hemijsku interakciju sa molekulima iz okruženja (Abraham i sar. 2000; Elfering i sar. 2002). Na mestu interakcije sa drugim biomolekulima stvara različite metabolite posredstvom kojih ostvaruje svoje uloge (Gaston i sar. 2003). Iako brzo difunduje u okolno tkivo, domet te difuzije je mali, s obzirom da NO[•] ima izuzetno kratak poluživot. Biološka reaktivnost NO[•] uslovljena je stepenom njegovog uklanjanja u reakciji sa hemoglobinom, stepenom aktivacije guanil ciklaze, transformacijom u peroksinitrit i interakcijom sa tiol grupama (Martinez i Andriantsitohaina, 2009).

Azot monoksid nastaje iz L-arginina dejstvom azot oksid sintaze (NOS), u prisustvu NADPH i O₂, i tom prilikom pored NO[•] nastaju citrulin i NADP. Azot oksid sintaza postoji u tri izoforme: neuronalna (nNOS), koja se nalazi u nervnom tkivu; inducibilna (iNOS), koja je prisutna u

ćelijama mikroglije, makrofagima i drugim ćelijama u organizmu; i endotelna (eNOS), koja se nalazi u ćelijama vaskularnog endotela. Neuronska i endotelna NOS, predstavljaju konstitutivne izoforme koje se u odgovoru na fiziološke stimuluse, zavisno od jona Ca aktiviraju, i stvaraju NO \cdot . Ovako stvoren NO \cdot je kratkoživeći, njegova bioraspoloživost se procenjuje na nekoliko sekundi. Inducibilna NOS nije zavisna od jona Ca i ona se aktivira u odgovoru na citokine i proinflamatorne medijatore. S obzirom na činjenicu da ova indukcija može trajati duže, u prisustvu patogenog stimulusa, aktivacijom iNOS stvara se NO \cdot u većoj koncentraciji za sve vreme stimulacije iNOS, čime se izloženost njegovom štetnom dejstvu višestruko povećava (Jaffrey i sar. 2001; Kone i sar. 2003; Pautz i sar. 2010). Direktno, ili posredstvom intermedijarnih jedinjenja, NO \cdot neselektivno oštećuje tkiva, uzrokuje mitohondrijalnu disfunkciju, učestvuje u nitrovanju tirozina, nitrozilaciji tiolnih grupa (-SH), dovodi do elektrolitnog disbalansa (Knott i Bossy-Wetzel, 2009).

Svoj fiziološki i patofiziološki efekat NO \cdot ostvaruje posredstvom radikalskih i neradikalskih RAV. Najznačajnije su NO $_2$, ONOOH, ONOO \cdot i N $_2$ O $_3$. Najvećim delom NO \cdot reaguje sa O $_2$ i na taj način se stvara izuzetno potentni oksidant i nitrušući agens, ONOO \cdot . Brzina interakcije NO \cdot sa O $_2$ je čak tri puta veća od brzine kojom se stvoreni O $_2$ \cdot uklanja sa mesta na kojima je stvoren, dejstvom SOD. Ekstracelularna SOD značajna je u limitiranju reakcije NO i O $_2$ \cdot . Koncentracija O $_2$ \cdot ima značajnu regulatornu ulogu u limitiranju efekata koje NO \cdot ostvaruje na okolnom tkivu (Janssen-Heininger i sar. 2008). U uslovima kada L-arginin nije dostupan u optimalnoj koncentraciji, dejstvom NOS mogu nastati O $_2$ \cdot i H $_2$ O $_2$, što je potvrđeno u kulturi aktivisanih makrofaga i cerebelarnih neurona nakon stimulacije NMDA receptora (Lipton i sar. 2002; Lambeth, 2004).



Slika 6. Najznačajniji biološki efekti NO \cdot u CNS-u

Azot monoksid u reakciji sa hidroksilnim jonom koji inicira proces lipidne peroksidacije, sprečava odvijanje ovog lančanog procesa. On može reagovati i sa alkoksil i peroksil radikalima čime se prekida proces stvaranja slobodnih radikala (Dedon i Tannenbaum, 2004). Azot monoksid reguliše metabolizam glukoze, stimuliše pentozni put u kojem se stvara velika količina NADPH, ključnog faktora za proces regeneracije GSH. Na ovaj način, dejstvom NO \cdot oštećenje tiol redoks sistema može

biti kompenzovano, iako samo kratkotrajno i to u inicijalnim fazama inflamacije (Paget i Buttner, 2003).

S obzirom na dualnu ulogu koju NO[•] ostvaruje kako u fiziološkim tako i u patofiziološkim procesima, ne iznenađuje činjenica da je poslednjih godina mnogo istraživanja koja su za cilj postavljala preciznije ispitivanje značaja njegove uloge u patogenezi mnogih, pa i neuroloških bolesti (Marshall i Stamler, 2002; Packer i sar. 2003; Reiter, 2006; Pacher i sar. 2007). Rezultati tih istraživanja prilično su kontroverzni. To čini da je ovaj molekul okarakterisan kao jedan od ključnih medijatora u kompleksnoj patogenezi različitih neuroloških stanja, čija bi se preciznija uloga mogla ispitivati jedino u odnosu na patogenezu i druge merljive kriterijume oštećenja nervnog sistema.

1.2.3. Specifičnosti oksidativnog i nitrozativnog stresa u CNS

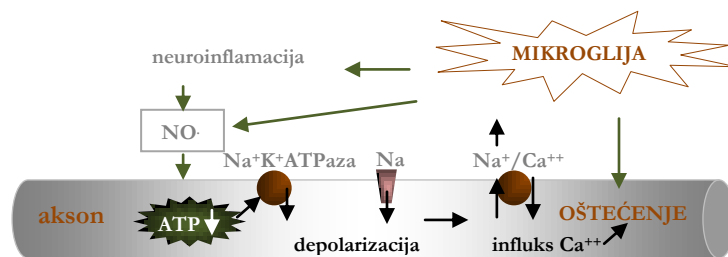
Ćelije CNS su izložene malim koncentracijama RKV i RAV i u fiziološkim uslovima, ali usled dobre antioksidativne zaštite njihov štetni efekat je zanemarljiv (Satoh i Lipton, 2007). Strukture CNS su posebno osetljive na dejstvo RKV i RAV, što je posledica izuzetno aktivnog oksidativnog metabolizma CNS, kada se 2-5% iskorišćenog O₂ pretvara u RKV u procesu ćelijskog disanja u mitohondrijama (Ames, 2000). Svoj efekat RKV i RAV ostvaruju u neposrednom okruženju u odnosu na mesto gde su stvoreni, difundujući u dijametru do 0.3 nm. Poređenja radi, veličina međulaminarnog prostora mijelinskog omotača je reda veličine 10 nm.

S druge strane, CNS ima relativno ograničen potencijal anaerobnog metabolisanja zbog čega je naročito osetljiv na hipoksiju (Yokoyama i sar. 2008). U uslovima male dostupnosti O₂, u mitohondrijama dolazi do dramatičnog povećanja koncentracije O₂⁻ (Bailey i sar. 2006). Konačno, neke ćelije u CNS, kao npr. oligodendrociti, imaju fiziološki nizak nivo antioksidativnog potencijala, suprotno relativno velikom energetskeg prometu (Charil i Filippi, 2007). Veliki procenat lipida u CNS je osnova njegove sklonosti ka iniciranju procesa lipidne peroksidacije. Pokazano je da je tkivo mozga osetljivije na opisana oštećenja u poređenju sa tkivom kičmene moždine ili perifernim nervnim sistemom (Macco i sar. 2013). Ovo može biti posledica manjeg sadržaja tiol redoks sistema u kičmenoj moždini i perifernim nervima u poređenju sa tkivom mozga (Schnell i sar. 1999). Pomenute različitosti se takođe vezuju za različite koncentracije GSH, s obzirom da GSH učestvuje u redukciji RKV i RAV, ali s druge strane, nezavisnim mehanizmima reaktivira inhibisane antioksidativne enzime u CNS. U najvećoj meri GSH se nalazi u astrocitima (do 5 mM), što je daleko više u odnosu na druge strukture CNS (Ortiz i sar. 2013).

1.3. OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES I NEUROINFLAMACIJA

1.3.1. Značaj oksidativnog stresa u neuroinflamaciji

Izvori stvaranja RKV u CNS su enzimski posredovani procesi u mitohondrijalnom respiratornom lancu, ksantin oksidaza, NADPH oksidaza, lipooksigenaza i ciklooksigenaza (COX), i neenzimski procesi poput autooksidacije dopamina i noradrenalina. Najznačajniji izvor RKV su mitohondrije u kojima se od ukupne količine metabolisanog kiseonika (20% ukupne dnevne potrošnje kiseonika), čak 3% konvertuje do O_2 . Peroksizomi su drugi značajan izvor RKV, oni su u velikom broju prisutni u oligodendrocitima u procesu aktivne mijelinizacije (Beal, 2003; Perkins, 2007). Iako u fiziološkim uslovima mikrogljalne ćelije nisu značajan izvor RKV, u uslovima neuroinflamacije dolazi do drastičnog povećanja koncentracije RKV kao posledice njihove aktivacije. Tretman mikrogljalnih ćelija u *in vitro* uslovima različitim proinflamatornim medijatorima, poput $INF-\gamma$ ili IL-1, dovodi do aktivacije mikroglije i enormnog stvaranja RKV, pri čemu se O_2 stvara u najvećoj meri (Garden i Moller, 2006). Ove ćelije su prisutne u perivaskularnom prostoru i u samom ognjištu demijelinizacije. One su smatraju depoima RKV u ovim patološkim stanjima i ključnim pokretačima procesa demijelinizacije koji je posredovan upravo RKV. Peroksinitrit je značajan u aktivaciji makrofaga s obzirom da konvertuje lipoproteine do oblika koji nezavisno od drugih faktora iniciraju fagocitnu aktivnost makrofaga, jer se vezuje za tzv. receptore čistače makrofaga (Ladeby i sar. 2005). Neuronu su takođe izvor RKV, s obzirom da u procesima električne aktivnosti u ćeliji nastaju RKV. Pretpostavka je da je u ovom procesu najznačajniji transaksosolemski transport Ca u ćeliju, kao i oslobađanje, Ca iz intracelularnih depoa u unutrašnjost ćelije (Slika 7).



Slika 7. Mehanizam nastanka demijelinizacije i neurodegeneracije

Na ovaj način se aktivira fosfolipaza A_2 , koja pokreće metabolizam arahidonske kiseline i stvaranje prostaglandina, leukotriena i tromboksana, dejstvom COX i lipooksigenaze (Androdias i sar. 2010). Ovi enzimi koriste O_2 i na taj način učestvuju u stvaranju RKV. Intenzivan metabolizam aksona u uslovima neuroinflamacije istovremeno je objašnjenje za pojavu spontanog, repetitivnog

okidanja u njima, sa pojavom odgovarajućih kliničkih ekvivalenata. Ovo je praćeno povećanjem ekstracelularne koncentracije K, što istovremeno aktivira astrocite, s obzirom da su astrociti značajni za puferovanje ekstracelularnih promena koncentracije jona K (Kornek i sar. 2000; Knoferle i sar. 2010).

Uloga T limfocita u stvaranju RKV je izuzetno značajna jer iako ove ćelije ne stvaraju NO, pokazana je njihova imunoreaktivnost na nitrotirozin koji nastaje difuzijom NO iz okolnog nervnog tkiva i interaguje sa O₂ koji je upravo stvoren u ovim ćelijama (Shah i sar. 2010; Pahan i Mondal, 2012).

Indirektni dokazi o postojanju intenzivnog oksidativnog stresa u neuroinflamaciji počivaju na praćenju koncentracija krajnjih produkata lipidne peroksidacije u toku neuroinflamacije (Fukuda i sar. 2009; Miller i sar. 2011). Neka istraživanja demijelinizacionih plakova nalaze povećano prisustvo lipidnom peroksidacijom izmenjenih molekula LDL u samim plakovima, makrofagima i astrocitima, paralelno sa porastom koncentracije krajnjih produkata lipidne peroksidacije (Hendrickx i sar. 2013). U ovom procesu dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline koja se enzimski konvertuje do prostaglandina ili se nenezimskim metabolisanjem prevodi do izoprostana. Izoprostani nastaju slobodno radikalskom peroksidacijom arahidonske kiseline, a od svih izoprostana posebno se 8-epi-PGF₂α, koristi kao biomarker oksidativnog stresa. Prostaglandini, posebno E₂, nezavisno i u sadejstvu sa NO mogu povećavati permeabilnost KMB (Miller i sar. 2011). Ipak, prostaglandini se smatraju uslovno patogenim u neuroinflamaciji s obzirom da njihov krajnji efekat u nervnom tkivu zavisi od intenziteta oksidativnog i nitrozativnog stresa u CNS (Zhu i sar. 2007).

Monociti obolelih od MS, i u periodu remisije bolesti pokazuju predisponiranost ka pokretanju proinflamatornog fenotipa kad se izlože dejstvu patogenog agensa u eksperimentalnim uslovima (Ponomarev i sar. 2005). Izvori RKV nisu samo ćelije CNS i leukociti koji infiltrišu CNS, već i eritrociti. Eritrociti obolelih od MS pokazuju veći rigiditet ćelije i smanjenu fluentnost ćelijske membrane, u poređenju sa ćelijama zdravih ispitanika (Xiang i sar. 2013). Ove promene shvaćene su kao posledica kontinuiranog oksidativnog oštećenja ovih ćelija koje postoji u MS (Oliveira i sar. 2012).

Oksidativni stres u CNS-u takođe uzrokuje promene transendotelijalnog transporta čime se omogućava dalja evolucija neuronflamatornog procesa (Satoh i Lipton, 2007). Najznajčajniji efekat RKV je oštećenje oligodendrocita, ključnih ćelija u procesu stvaranja mijelina u CNS. Iako mehanizmi oštećenja ovih ćelija nisu sasvim razjašnjeni, dokazana je izuzetno velika uloga oksidativnog stresa i NO u tom procesu (Przedborski i Ischiropoulos, 2005). Studije koje su u *in vitro* uslovima testirale osetljivost ovih ćelija na RKV i NO ukazale su da su oligodendrociti osetljivi na

koncentracije RKV i NO \cdot koje su bile daleko ispod toksičnih koncentracija za druge ćelije glije, astrocite i mikrogliju. Dodavanjem antioksidanasa ostvarivan je protektivni efekat na ovu ćelijsku liniju (Kim i sar. 2013).

Efekat RKV i NO \cdot posredovan je interakcijom ovih hemijskih vrsta sa metalima promenjive valentnosti, kakvo je Fe, kojim su oligodendrociti naročito bogati. S obzirom da su oligodendrociti izuzetno metabolički aktivne ćelije u procesu stvaranja mijelina i procesima remijelinizacije. U tim periodima ćelijske aktivnosti peroksizomalna frakcija oligodendrocita povećava volumen i gustinu, shodno metaboličkim zahtevima, te predstavlja značajan nezavisni izvor RKV (Singh i sar. 2004; Zeis i sar. 2008; Sullivan i sar. 2013). Dakle, i u procesu remijelinizacije koji se dešava paralelno sa procesom aktivne demijelinizacije, oligodendrociti su naročito predisponirani oštećenju posredstvom oksidativnog stresa. Usled toga oligodendrociti najčešće podležu procesu degeneracije i dolazi do parcijalne remijelinizacije i zaostajanja neurološkog oštećenja (Fancy i sar. 2010). Pored direktnog efekta koji ostvaruju na oligodendrocite, RKV i NO \cdot , direktno reaguju sa lipidnim i proteinskim komponentama mijelinskog omotača. Na ovaj način izmenjeni MBP i PLP podložniji su tripsin degradaciji, što sugeriše da i u *in vivo* uslovima, mijelin, koji je izmenjen oksidativnim i nitrozativnim stresom, lakše podleže degradaciji dejstvom ekstracelularnih proteaza, poput onih oslobođenih od strane makrofaga (Chaitanya i sar. 2013). Delaminacija mijelinskog omotača čini dostupnim nove količine mijelinskih komponenti oštećenju dejstvom RKV i RAV. Dejstvom RKV dolazi do povećanja koncentracije iRNK i proteinske ekspresije matriks metaloproteinaze (MMP-1), koja predstavlja intersticijalnu kolagenazu, koja aktivno učestvuje u procesu dalje demijelinizacije (Agrawal i sar. 2013). S druge strane, NO \cdot može ispoljiti inhibitorni efekat na aktivnost MMP, čime umanjuje njen štetni efekat (Uccelli i sar. 2003).

Poznato je da oksidativni stres i NO \cdot citotoksični efekat ostvaruju posredstvom enormnog oslobađanja glutamata čime se stvara tzv. glutamatergička ekscitotoksičnost. Oligodendrociti su posebno osetljivi na ovaj vid oštećenja, daleko više u poređenju sa astrocitima. Primera radi, citotoksični efekat glutamat ostvaruje na oligodendrocite u dozi od 200 μ M, dok su atrociti rezistentni i pri dozi od 5 mM glutamata (Willard i Koochekpour, 2013). U akutnim atacima bolesti beleži se povećana koncentracija glutamata, što je između ostalog posledica inhibicije njegovog preuzimanja od strane astrocita, nastala dejstvom proinflamatornih citokina, TNF- α , INF- γ , i IL-1 β na astrocite. Ekscitotoksičnost glutamata je posredovana smanjenjem koncentracije cistina, usled čega se smanjuje koncentracija i GSH (Mandolesi i sar. 2013). Oligodendrociti inače, u svim razvojnim oblicima, počev od progenitorne ćelije do zrelog oligodendrocita imaju upola manju koncentraciju GSH u poređenju sa astrocitima. To je posledica manje aktivnosti glutation sintetaze, upola manje aktivnosti GR u odnosu na astrocite, i daleko manje aktivnost (15% astrocitne aktivnosti) GSH-Px.

Nezreli oligodendrociti su osetljiviji na oksidativna oštećenja u odnosu na zrele oblike. Takođe, pokazana je manja aktivnost SOD u kulturi oligodendrocita u poređenju sa mikroglijalnim ćelijama i astrocitima (Arend i sar. 2013). Oligodendrocite karakteriše manji sadržaj metalotioneina, koji je bogat cisteinom, u poređenju sa astrocitima. Metalotionein je značajan antioksidans koji vezuje cink i bakar, i u uslovima stimulacije citokinima, pre svih IL-1, povećava svoju koncentraciju u astrocitima (Fernandez-Fernandez i sar. 2012).

S druge strane, oligodendrociti sadrže najveću količinu Fe koja se inače nalazi u CNS. U redukovanom obliku Fe je vezano za ADP i citrate i iz tih kompleksa pokreće oksidativne procese u kojima se stvara OH^- iz H_2O_2 čime dovodi do sekundarne inicijacije procesa lipidne peroksidacije (Bizzozero i sar. 2006). U neuroinflamaciji usled aktivacije mikroglije Fe može biti oslobođeno iz depoa, feritina i tranferina, i u uslovima smanjene aktivnosti SOD može biti okidač oksidativnog stresa (Stadtman i sar. 2003). Radiološkim pretragama CNS obolelih od MS pronadjeni se depoziti Fe (Rumzan i sar. 2013). Direktna povezanost poremećaja homeostaze Fe i pojave MS pokazana je u nekim ranijim istraživanjima (Abo-Krysha i Rashed, 2008).

1.3.2. Stvaranje i uloga NO^- u odgovoru na neuroinflamaciju

Pored već opisanih uloga u različitim neurobiološkim procesima, NO^- je izuzetno značajan i u patogenezi različitih neuropatoloških stanja, uključujući i neuroinflamaciju (Smith i Lassmann, 2002; Acar, 2003). U fiziološkim koncentracijama NO^- nije toksičan za nervno tkivo, dok u uslovima prekomernog stvaranja, slično kao i u drugim tkivima u organizmu, može interagovati sa metalima promenjive valentnosti i drugim biomolekulima usled čega dolazi do stvaranja RAV (Yokoyama i sar. 2008).

Iako je biorasploživost NO^- jako mala usled njegovog kratkog poluživota, NO^- u patološkim uslovima brzo dovodi stvaranja velikih količina ONOO^- . Ovo se ne dešava kada je aktivnost SOD u ćeliji dovoljna kako bi ukupnu količinu O_2^- dizmutovala i na taj način onemogućila njegovu interakciju sa NO^- . Ipak, u uslovima oksidativnog stresa, kada se stvara prekomerna količina O_2^- , čak i povećana aktivnost SOD nije dovoljna za dizmutaciju O_2^- čime se omogućava stvaranje velike količine ONOO^- (Alvarez i Radi, 2003). Njegov poluživot iznosi oko jedne milisekunde. Smatra se da ukupni štetni efekat NO^- nastaju posredstvom ONOO^- odnosno posredstvom hemijskih jedinjenja koja nastaju u interakciji ONOO^- sa drugim biomolekulima (Pacher i sar. 2007).

Povećana aktivnost iNOS, ali i konstitutivnih NOS (mada u manjoj meri), u astrocitima, oligodendrocitima, mikrogliji, Švanovim ćelijama i endotelu kapilara u CNS, smatraju se vodećim faktorima u odgovoru CNS na inflamatorni stimulus (Reiter, 2006; Jana i sar. 2009). Takođe,

povećano stvaranje NO \cdot zabeleženo je i u monocitima/makrofagima i limfocitima koji infiltriraju CNS u inflamaciji (Howell i sar. 2010; Cox i sar. 2013), uz proporcionalno smanjenje broja vijabilnih oligodendrocita u ispitivanim kulturama ćelija (Marshall i Stamler, 2002). Postoji različitost dobijenih rezultata u odnosu na stepen stvaranja NO \cdot nakon primene stimulatora iNOS (lipopolisaharidi, proinflamatorni citokini) u kulturi mikrogilije, oligodendrocita i astrocita humanog porekla. Dok su makrofagi pokazivali izuzetnu ekspresiju iNOS nakon stimulacije lipopolisaharidima (Hua i sar. 2012), astrociti su povećano stvarali NO \cdot jedino u odgovoru na proinflamatorne citokine (Argaw i sar. 2012; Motoyoshi-Yamashiro i sar. 2013). Dobijene različitosti tumačene su različitim efektom koji primenjeni induktori iNOS imaju na gensku ekspresiju nekih od ključnih transkripcionih faktora, kao npr. NF κ B, a koji su bili različito eksprimirani u testiranim ćelijskim kulturama. Takođe, uočeno je da primenjeni induktori iNOS imaju direktni, ali različiti efekat na biostabilnost iNOS iRNK, čime direktno utiču na smanjenje iNOS aktivnosti (Leiper i Nandi, 2011). Regulacija iNOS u mikrogiliji vezana je za promenu aktivnosti mitogen aktivirajuće protein kinaze (Jung i sar. 2009). Postoje dokazi da mnogi inflamatorni medijatori ispoljavaju nezavisni direktni efekat na kontrolu aktivnosti iNOS u mikrogiliji i astrocitima (Kim i sar. 2013). Eikosanoidi mogu smanjivati stvaranje NO \cdot , prostaglandin E $_2$ takođe smanjuje stvaranje NO \cdot smanjivanjem cAMP. Inhibicija COX povećava stvaranje NO \cdot u aktivisanim astrocitima humanog porekla (Zang i sar. 2012), dok suprotni efekat ostvaruje u astrocitima pacova (Rosado i sar. 2012). Arahidonska kiselina može ispoljiti i pozitivno i negativno dejstvo na iNOS. I sama koncentracija NO \cdot može biti regulator aktivnosti iNOS (Choi i sar. 2009). Smanjenje koncentracije NO \cdot dovodi do povećanja ekspresije iNOS i obrnuto (Moncada i Bolanos, 2006). Konačno, značajnu ulogu u regulaciji stvaranja NO \cdot ima i vaskularni endotel, s obzirom da stvoreni NO \cdot može difundovati kroz endotel i reagovati sa oksigenisanim hemoglobinom (Naughton i sar. 2002, Puca i sar. 2012), čime se njegova koncentracija u tkivu smanjuje. Citokini, IL-1, INF- γ i TNF- α , pojedinačno povećavaju stvaranje NO \cdot u gliji, premda imaju i značajan sinergistički efekat (Moncada i Bolanos, 2006). Na ovaj način glijalne ćelije stvarajući citokine ostvaruju povratni regulatorni efekat na sopstvenu iNOS, ali i iNOS ostalih ćelija CNS.

Suprotno, antiinflamatorni citokini, IL-4 i IL-10, TGF- β 1, smanjuju aktivnost iNOS u glijalnim ćelijama. Kontrola koncentracije citokina u neuroinflamaciji smatra se ključnom u regulaciji aktivnosti iNOS (Janssen-Heininger i sar. 2008). U nekim studijama je pokazan direktni stimulatorni efekat mijelina na stvaranje NO \cdot od strane makrofaga, dok se opsonizacijom mijelina antimijelinskim antitelima taj efekat pojačavao (Stys, 2005). Ipak, sam mijelin nije dominantni regulator stvaranja NO \cdot s obzirom da se i nakon njegove fagocitoze u ćelijama glije stvara povećana količina NO \cdot (Guix i sar. 2005). Ćelije glije se u u odgovoru na inflamatorni agens, povećanim stvaranjem NO \cdot i same izlažu njegovim štetnim svojstvima.

Međutim, u početnim fazama neuroinflamacije štetni efekat $\text{NO}\cdot$ je bitno ograničen s obzirom da se povećano stvaranje $\text{NO}\cdot$ i $\text{O}_2\cdot$, koje bi vodilo velikoj stvaranju $\text{ONOO}\cdot$ (medijatora svih oksidativnih i nitrozativnih oštećenja), ne javlja istovremeno (Forman i sar. 2004; Dinkova-Kostova i Talalay, 2008). Ipak, u uslovima intenzivne neuroinflamacije, na mestu stvaranja ognjišta zapaljenja, dolazi do gubitka takve kontrole, usled čega se potenciraju štetni efekti $\text{ONOO}\cdot$ na okolno nervno tkivo (Coffey i sar. 2002).

Jasno je da uloga $\text{NO}\cdot$ u patogenezi demijelinizacije nije direktna već je posredovana brojnim faktorima i medijatora neuroinflamacije (Contestabile i Ciani, 2004). Dokazi o povezanosti $\text{NO}\cdot$ i proinflamatornih citokina dobijeni su analizom uzoraka plazme i likvora pacijenata obolelih od MS, u kojima je pokazan porast koncentracije i $\text{NO}\cdot$ i raznih inflamatornih medijatora (Calabrese i sar. 2002; Marik i sar. 2007).

Povećana ekspresija iNOS pokazana je u kulturi perivaskularnih makrofaga, limfocita iz likvora i monocita periferne krvi, dobijenih od pacijenata u akutnoj fazi neuroinflamacije (Parratt i Prineas, 2010). Takođe, uočena je povećana koncentracija iNOS iRNK u MS plakovima (Saha i Pahan, 2006). Neke studije ukazuju na paralelni porast aktivnosti i iNOS i konstitutivnih formi NOS (eNOS i nNOS), u astrocitima u aktivnim demijelinizacionim lezijama, iako je daleko veći porast aktivnosti beležila iNOS (De Groot i sar. 1997; Kahl i sar. 2003). Povećana koncentracija produkata interakcije stvorenog $\text{ONOO}\cdot$ sa drugim biomolekulima, poput nitrotirozina, pronađena u toku akutizacije MS (Leung i sar. 2011), takođe ukazuje na povećano stvaranje $\text{NO}\cdot$ u neuroinflamaciji i demijelinizaciji. Takođe je pokazano da, kada je koncentracija arginina u *in vitro* uslovima mala, intenzivno se stvara $\text{O}_2\cdot$ i na taj način se favorizuje stvaranje $\text{ONOO}\cdot$, čime se istovremeno potenciraju njegova štetna dejstva (Carreras i Poderoso, 2007).

Ciljne strukture za $\text{NO}\cdot$ i $\text{ONOO}\cdot$ su tiolne grupe različitih proteina. U interakciji sa tiolima nastaju nitrozotiole (RSNO) koji se stvaraju i u fiziološkim uslovima, a stepen njihovog stvaranja direktno je zavisao od nivoa stvaranja $\text{NO}\cdot$ i $\text{O}_2\cdot$ (Brown i Bal-Price, 2003). Nitrozotiole su depoi $\text{NO}\cdot$ kojim se povećava bioraspoloživost $\text{NO}\cdot$ u organizmu, čime se u patološkim uslovima potenciraju njegova štetna dejstva (Calabrese i sar. 2006). Peroksinitrit učestvuje u nitrovanju tirozina stvarajući na taj način nitrotirozin (Alvarez i Radi, 2003).

U uslovima prekomernog stvaranja, $\text{NO}\cdot$ može inhibisati mnoge enzime, protein kinazu C, enzime uključene u proces ćelijskog disanja, uključujući akonitazu, NADPH-ubihinon oksidoreduktazu i sukcinat-ubihinon oksidoreduktazu (Carreras i Poderoso, 2007). Takav efekat je pokazan i u kulturi astrocita (Calabrese i sar. 2005). Pretpostavljeni mehanizam kojim $\text{NO}\cdot$ ostvaruje citotoksični efekat uključuje i umanjeње ukupnog energetskeg potencijala ćelije usled smanjene

produkcije ATP (Smith i Lassmann, 2002). Direktnim efektom NO \cdot smanjuje aktivnost različitih aktioksidativnih enzima poput, katalaze, GSH-Px i SOD (Calabrese i sar. 2009), menjajući u hemijskim interakcijama njihove konformacione strukture, pri čemu se istovremeno na ovaj način ekprimiraju neoepitopi koji nezavisnim mehanizmima indukuju aktivaciju specifičnog imuniteta. Na ovaj način dolazi do produkcije antitela. U prilog ovakvoj tvrdnji ide nalaz specifičnih IgM antitela na S-nitrozocistein koji je pronađen u pacijenata sa MS (Boullerne i sar. 2002). Efekat na ćelije NO \cdot ostvaruje direktno, posredstvom deaminacije DNK i istovremenom inhibicijom reparativnog enzima, DNK ligaze (Mancuso i sar. 2007). Ipak, i ovde, najveći štetni efekat NO \cdot ostvaruje posredstvom ONOO \cdot koji direktno reaguje sa DNK uzrokujući deaminaciju njenog molekula. Takva oštećenja dovode do aktivacije poli-(ADP)-riboza sintetaze koji za svoju aktivnost dodatno troši ćelijske depoe NAD $^{+}$ i ATP (Broniowska i sar. 2013).

I NO \cdot i ONOO \cdot mogu uticati na pojavu lipidne peroksidacije u CNS, čime se narušava permeabilnost i integritet ćelijskih struktura u CNS. U odnosu na ovaj process, NO \cdot i ONOO \cdot mogu ispoljiti različit efekat, u zavisnosti od uslova u kojima se dešava proces lipidne peroksidacije. Kada se O $_2$ stvara u većoj meri u odnosu na NO \cdot dolazi do stvaranja ONOO \cdot koji onda stimuliše proces lipidne peroksidacije. Suprotno, kada je stvaranje NO \cdot dominantnije u odnosu na stvaranje O $_2$, proces lipidne peroksidacije je smanjen, s obzirom da se u tim okolnosti NO \cdot troši u reakcijama terminacije lipidne peroksidacije, gde služi kao čistač stvorenih radikala (Stys, 2004). Dakle, NO \cdot može ispoljiti i prooksidantna i antioksidantna svojstva u zavisnosti od koncentracije O $_2$ (Przedborski i Ischiropoulos, 2005). Ovim se može objasniti različitost dobijenih rezultata u pokušaju terapijske primene inhibitora stvaranja NO \cdot sa ciljem smanjenja intenziteta lipidne peroksidacije.

Rezultati eksperimentalnih studija sprovedenih na kulturi oligodendrocita ukazuju na daleko veću osetljivost ove ćelijske linije na NO \cdot i njegove medijatore u poređenju sa astrocitima i mikroglijom (Prineas i Parratt, 2012; Paintlia i sar. 2013). Aktivisana mikroglija stvara velike količine NO \cdot čime direktno ostvaruje citotoksični efekat na okolne oligodendrocite. U nedavno sprovedenom istraživanju na kulturi ćelija glije pokazana je takođe veća senzitivnost oligodendrocita na oštećenje genetskog materijala i ćelijskog signalnog puta u uslovima prekomernog stvaranja NO \cdot , u poređenju sa drugim ćelijama glije (Contestabile i sar. 2012).

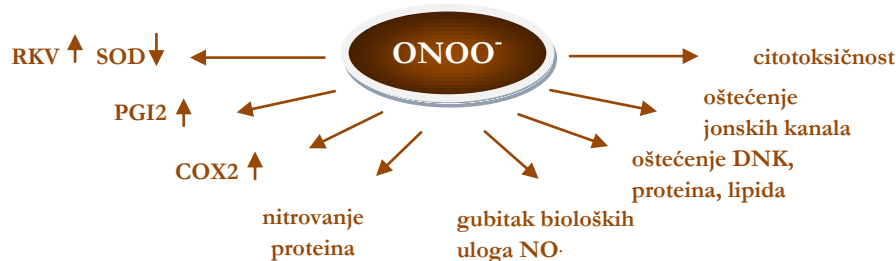
Štetni efekat NO \cdot na aksonalno oštećenje može biti direktna posledica njegovog štetnog uticaja na morfologiju i funkcionalnost jonskih kanala, što dovodi do blokova u provođenju (Knoferle i sar. 2010). Područja demijelinizacije smatraju se posebno osetljivim na porast koncentracije NO \cdot i njegove štetne efekte (Zhou i sar. 2005). Ovo je posledica direktnog uticaja NO \cdot na kanale K, Na, Ca i glutamatergičke kanale (Stirling i Stys, 2010). Iako se efekat NO \cdot u ćelijskog

signalizaciji ostvaruje posredstvom cGMP, pretpostavka je da se patogenetski značaj NO \cdot u pojavi smetnji provođenja ipak ne vezuju za ovaj medijator (Nikolaeva i sar. 2005; Papadopoulos i sar. 2006; Friese i sar. 2007).

1.3.3. Interakcija oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji

Iako je dobro poznata interakcija NO \cdot i O $_2\cdot$, u kojoj se stvara ONOO $^-$, pokazano je da NO \cdot , takođe, može inhibirati stvaranje O $_2\cdot$ u procesu ćelijskog disanja (Pacher i sar. 2005). Ovo nije posledica njihove međusobne interakcije već nekih drugih mehanizama za koje se pretpostavlja da nisu posredovani cGMP. Na ovaj način NO \cdot umanjuje štetne efekte O $_2\cdot$. Azot monoksid može vršiti inhibiciju proiliferacije limfocita, može inhibisati adherenciju leukocita za vaskularni endotel i migraciju leukocita kroz nervno tkivo, može inhibisati stvaranje INF- γ , blokirati stvaranje hidroksil radikala i učestvovati u terminaciji procesa lipidne peroksidacije, čime ispoljava i niz protektivnih efekata (Pacher i sar. 2007). Ovi efekti se uglavnom javljaju u najranijim fazama neuroinflamacije.

Ipak, generalno, efekti NO \cdot procenjuju se kao štetni s obzirom da nezavisnim mehanizmima NO \cdot vrši supresiju aktivnosti mnogih antioksidativnih enzima, SOD, glutation peroksidaze, katalaze (Slika 8). Ovaj efekat NO \cdot ostvaruje supresijom biosinteze njihovih iRNK (Reiter, 2006). Takođe, NO \cdot može direktno interagovati sa cistinskim ostacima, čime uzrokuje konformacione i funkcionalne promene u ovim enzimskim sistemima (Paget i Buttner, 2003).



Slika 8. Patogeni efekti ONOO $^-$ u neuroinflamaciji

Poslednjih godina izvesna istraživanja posvećena su ispitivanju uloge neuroinflamacije, oksidativnog i nitrozativnog stresa u pojavi, toku i ishodu MS (Gilgun-Sherki i sar. 2004; Koch i sar. 2006; Han i sar. 2008; Haider i sar. 2011), ali su retka ona koja preciznije i sveobuhvatnije definišu ulogu pomenutih patogenetskih faktora, definišući tačno mesto i intenzitet njihovog uticaja na pojavu, klinički tok, parakliničke nalaze i ishod bolesti, kao i njihovu međusobnu interakciju u patogenezi bolesti.

Čini se da su neophodna upravo istraživanja koja bi mogla dati odgovor na pitanje kada oksidativni i nitrozativni stres predstavljaju primarne fenomene u patogenezi neuroinflamacije, i njome uzrokovanih bolesti, a kada se javljaju kao koegzistirajući faktori i posledica predominantno neuroinflamatornih procesa. S obzirom da u nekim slučajevima, na osnovu raspoloživih kriterijuma nije moguće jasno definisati biološku aktivnost bolesti (MS), jer klinički nalaz ne mora biti podržan i pozitivnim radiološkim nalazom, i obrnuto (Brex i sar. 2001; Graber i Dhib-Jalbut, 2011; Corthals, 2011; Ortiz i sar. 2013), značajno bi bilo testiranje promene koncentracije i aktivnosti različitih biomarkera oksidativnog i nitrozativnog stresa u odnosu na druge kliničke i parakliničke korelate neuroinflamacije, s ciljem mogućeg identifikovanja tzv. surogat biomarkera neuroinflamacije.

Uzimajući u obzir napred navedeno i polazeći sa stanovišta da je CNS, još od najranije pojave neuroinflamacije i demijelinizacije pa nadalje, kontinuirano izložen stvaranju RKV, NO i RAV, čak i u periodu kliničke remisije (Tiberio i sar. 2006; Oliveira i sar. 2012), te da se radi o patofiziološkom kontinuumu dešavanja u obolelom organizmu, čini se realnim očekivanje o postojanju potencijalnih razlika u antioksidativnom potencijalu i stepenu oksidativnog i nitrozativnog oštećenja CNS između pacijenata koji su u različitim patogenetskim fazama neuroinflamacije, i koji shodno važećim kliničkim i radiološkim kriterijumima (Polman i sar. 2011) pripadaju različitim kliničkim fenotipovima bolesti. Drugim rečima, pitanje je u kojoj meri različitost kliničkih fenotipova podrazumeva i različit intenzitet oksidativnih i nitrozativnih oštećenja i stepena neuroinflamacije.

Shodno bifazičnoj patogenezi MS (Confavreux i Vukusic, 2006; Gonsette, 2008), u inicijalnoj manifestaciji bolesti (KIS), dominiraju neuroinflamatorni procesi za razliku od ponovljenih ataka klinički definisane bolesti (RRMS) kada bi shodno pretpostavci o patofiziološkoj iscrpljenosti, ukupnih i CNS adaptivnih i kompenzatornih antioksidativnih i antiinflamatornih mehanizama, njen intenzitet mogao biti manji, na osnovu čega bi se mogla objasniti i smanjena reparativnost CNS, odnosno akumulacija ireverzibilnih, neurodegenerativnih, promena i dalja progresija bolesti. Modulacijom neuroinflamatornih procesa, nitrozativnog i oksidativnog stresa, potencijalnim biofarmakološkim agensima mogao bi se učiniti pokušaj odlaganja sigurne evolucije reverzibilnih u ireverzibilna i trajna histološka, radiološka i klinička oštećenja. S obzirom na pretpostavljenu ključnu ulogu iNOS u uslovima neuroinflamacije pri primeni aminoguanidina (AG), selektivnog inhibitora iNOS, kao i N-acetil L cisteina (NAC), molekula sa antioksidativnim potencijalom, mogao bi se očekivati potencijalni protektivni efekat u neuroinflamaciji, iako su u dostupnoj literaturi rezultati sličnih istraživanja prilično neusaglašeni (Okuda i sar. 1998; Puerta i sar. 2000; Shin i sar. 2000; Gilgun-Sherki i sar. 2005).

Aktuelna, imunomodulatorna terapija za tretman neuroinflamacije u MS, tako bi mogla biti dopunjena nespecifičnom i/ili specifičnom antioksidativnom i antinitrozativnom terapijom još od najranije faze bolesti kada su prisutne reverzibilne promene CNS. Istovremeno, pojedini biomolekuli nitrozativnog i oksidativnog oštećenja mogli bi biti markeri za najraniju dijagnostiku, praćenje i procenu intenziteta neuroinflamacije, radiološke ili kliničke ekstenzije bolesti.

2.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je

1. Ispitivanje koncentracije parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (MDA, GSH, SOD, NO₂ i NO₃) u različitim strukturama CNS (u tkivu velikog mozga, malog mozga i kičmenoj moždini), u eksperimentalnoj neuroinflamaciji, izazvanoj indukovanjem EAE
2. Ispitivanje biohemijskih (MDA, GSH, SOD, NO₂ i NO₃), imunohistohemijskih (određivanjem ekspresije iNOS, EAAT1, OX42, ET1, GFAP) i kliničkih efekata (neurološki nalaz) modulacije eksperimentalne neuroinflamacije primenom potencijalnih neuroprotektora, selektivnog inhibitora iNOS, aminogvanidina (AG), i antioksidanta, N-acetil L cisteina (NAC)
3. Procena stepena korelacije vrednosti ispitivanih parametara (NO₂ i NO₃, MDA, GSH, SOD) sa imunohistohemijskim (iNOS, EAAT1, OX42, ET1, GFAP) i kliničkim nalazom nakon modulacije eksperimentalne neuroinflamacije primenom AG i NAC
4. Ispitivanje parametara biološko-biohemijskog sindroma neuroinflamacije, koncentracije parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (AOPP, SH grupe, MDA, SOD, NO₂ i NO₃) u plazmi, eritrocitima i likvoru pacijenata sa inicijalnom kliničkom prezentacijom demijelinizacione bolesti (KIS) i pacijenata sa akutnim atakom ranije definisane bolesti (RRMS)
5. Ispitivanje stepena međusobne povezanosti parametara biološko-biohemijskog sindroma neuroinflamacije, koncentracije parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (AOPP, SH grupe, MDA, SOD, NO₂ i NO₃) u plazmi, eritrocitima i likvoru i pola, starosti, učestalosti relapsa, imunološkog nalaza analize likvora, dužine trajanja bolesti (aktuelnih tegoba), u KIS i RRMS pacijenata
6. Ispitivanje stepena međusobne povezanosti parametara biološko-biohemijskog sindroma neuroinflamacije, vrednosti parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (AOPP, SH grupe, MDA, SOD, NO₂ i NO₃) u plazmi, eritrocitima i likvoru i težine kliničke slike merene EDSS u KIS i RRMS pacijenata

7. Ispitivanje stepena međusobne povezanosti parametara biološko-biohemijskog sindroma neuroinflamacije, vrednosti parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (AOPP, SH grupe, MDA, SOD, NO₂ i NO₃) u plazmi, eritrocitima i likvoru i radiološkog nalaza (volumen Gd vezujućih promena viđenih na T₁ sekvenci i broj T₂ hipertenzivnih promena na MR mozga) u KIS i RRMS pacijenata

3.

MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNA STUDIJA

3.1.1. Životinje

Ekperimentalni protokol istraživanja odobren je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu. Sve životinje uključene u istraživanje tretirane su u skladu sa preporukama *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 80-23, revidirano 1985)*. Korišćeno je 49 ženki Sprague Dawley pacova, starosti do 3 meseca, težine oko 300 g, koje su čuvane u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu, poštujući režim svetlost - mrak 12:12. Životinje su držane u plastičnim kavezima, pojene i hranjene *ad libitum*.

3.1.2. Izazivanje EAE

EAE je indukovana subkutanom injekcijom MBP, bovin tip, u dozi 50 µg, koji je bio dispergovan u fiziološkom rastvoru (FR) i pomešan sa ekvivalentnom dozom CFA, 0 i 7. dana u zadnju šapicu, pod anestezijom. Dve intraperitonealne injekcije (i.p.) od 200 ng Pertusis toxina davane su 0 i 1. dana eksperimenta.

Svaka životinja je randomizovana u jednu od 7 eksperimentalnih grupa, koje su bile sastavljene od 6 do 9 životinja:

- kontrolna grupa (KG) – životinje tretirane FR u dozi 0,3 ml/i.p/dnevno;
- EAE grupa – životinje tretirane FR u dozi od 0,3 ml/i.p/dnevno nakon izazivanja EAE;
- CFA – životinje tretirane CFA u dozi od 0,3 ml/i.p/dnevno;
- EAE + AG grupa – životinje tretirane AG (i.p.) u dozi od 100 mg/kg TT/dnevno nakon izazivanja EAE;
- AG – životinje tretirane AG (i.p.) u dozi od 100 mg/kg TT/dnevno;
- EAE + NAC – životinje tretirane NAC (i.p.) u dozi od 150 mg/kg TT/dnevno nakon izazivanja EAE;
- NAC grupa – životinje tretirane NAC (i.p.) u dozi od 150 mg/kg TT/dnevno

Životinje su žrtvovane 15. dana eksperimenta pod Ketalar anestezijom, dekapitacijom.

Za dalje imunohistohemijske analize uzorkovano je tkivo mozga dve životinje iz svake eksperimentalne grupe i odmah zamrzavano na -80° C. Od ostalih životinja iz svake grupe (6-8 životinja po grupi), tkiva CNS – veliki mozak (VM – intrakranijalno nervno tkivo bez moždanog stabla i cerebeluma), mali mozak (MM) i kičmena moždina (KM) ispirana su u FR, a potom su pripremani 10% homogenati korišćenjem teflonskog tučka. Nakon pripreme, homogenati su čuvani na -20°C do izvođenja planiranih analiza.

3.1.3. Kliničko skorovanje

Kod svih životinja vršena je procena kliničkog (neurološkog) nalaza, na dnevnom nivou. Klinička slika EAE je procenjena na sledeći način (Sajad i sar. 2009):

- 1 = bez nalaza;
- 2 = pad tonusa repa;
- 3 = blaga slabost zadnjih nogu;
- 4 = umerena slabost zadnjih nogu;
- 5 = teška slabost zadnjih i blaga do umerena slabost prednjih nogu;
- 6 = smrt.

3.1.4. Biohemijske analize

3.1.4.1. Koncentracija nitrata i nitrita

Nakon deproteinizacije uzoraka, koncentracija NO[·] je određivana merenjem koncentracije NO₂ i NO₃ (μmol/mg proteina), stabilnih degradacionih produkata NO[·], direktnom spektrofotometrijskom metodom po Griessu (Griess reagens: 1.5% sulfanilamid u 1 M HCl plus 0.15% N-(1-naphthyl)ethylendiamin dihydrochlorid u destilovanoj vodi). Nitrati su prethodno kadmijumom redukovani do nitrita (Navaro-Gonzalvez i sar. 1998).

3.1.4.2. Koncentracija malondialdehida

Intenzitet lipidne peroksidacije je određivan merenjem koncentracije MDA (nmol/mg proteina), bazirano na reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (Andreeva i sar. 1988).

3.1.4.3. Koncentracija redukovanog glutationa

Koncentracija GSH (nmol/mg proteina) je merena spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Elmanovog reagensa (Sedlak i Lindsday, 1968).

3.1.4.4. Aktivnost superoksid dizmutaze

Aktivnost SOD je određivana metodom po Minami i Yoshikawi (1979), koja se bazira na inhibiciji autooksidacije pirogalola. Superoksidni anjon formiran autooksidacijom pirogalola obrazuje obojeno jedinjenje sa NBT. Kao „čistač“, O₂⁻, SOD inhibira ovu reakciju, gde jedna jedinica enzimske aktivnosti predstavlja 50% inhibicije. Aktivnost je izražavana kao nmol/mg proteina.

3.1.4.5. Koncentracija proteina

Koncentracija proteina u ispitivanim uzorcima je određivana metodom po Lowry-ju (1951).

3.1.5. Imunohistohemija

Smrznuti sagitalni iseći subkortikalnog paraventrikularnog regiona velikog mozga, debljine oko 8 μm , pomešani su sa poli-l-lizinom na vazduhu, a potom su fiksirani u acetonu. Inaktivacija endogene peroksidaze izvršena je upotrebom H_2O_2 sa Na-azidom (Dako Cytomation) u trajanju od 15 minuta. Uzorci su potom inkubirani u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi sa jednim od sledećih primarnih antitela: mišja monoklonska anti-iNOS (dilucija 1:25, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mišja monoklonska ED1, anti-CD68 antitela koja prepoznaju lizosomalne membrane tj. za njih asocirane antigene u makrofagima/mikroglijji (dilucija 1:10, Abcam, Cambridge, UK); mišja monoklonska OX42, anti-CD11b/c antitela koja reaguju sa epitopom zajedničkim sa CD11b/c koji je eksprimiran na monocitima/makrofagima i mikroglijji (dilucija 1:100, Abcam, Cambridge, UK); mišja monoklonska antitela na GFAP (dilucija 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), koji je specifični marker astrocita; zečja poliklonska antitela anti-EAAT1, koja reaguju sa glutamat-aspartat transporterom u CNS uzorcima pacova (dilucija 1:200, Abcam, Cambridge, UK).

Nakon ispiranja u TRIS puferu, imunoperoxidazno bojenje je urađeno EnVision kompleksom antitela korišćenjem DakoCytomation EnVision + System-HRP kita (Dako, Glostrup, Denmark). Bojenje je potom nastavljeno korišćenjem tečnog 3,3'-diaminobenzidina (DAB), što je zbog precipitacije izazvalo braon prebojenost antigenih struktura. U negativnim kontrolnim uzorcima, iseći su inkubirani sa FR bez primarnih antitela. Uzorci su potom obezbojavani hematoksilinom, dehidratisanim alkoholom i ksilenom, nakon čega je vršena fiksacija u Kaiser gelu (Merck, Germany). Ekspresija iNOS i EAAT1 procenjivana je intenzitetom prebojenosti uzoraka (negativno, slabo – svetlo braon; umereno – zlatna prebojenost; intenzivno – tamno braon), kao i distribucijom prebojenosti (homogeno (>50% pozitivnih ćelija), heterogeno (>5%, ali <50%), ili samo pojedinačne ćelije (<5%) (Tao i sar. 2001; Khan i sar. 2005). Homogenost ili heterogenost procenjivana je kao intenzivna i označavana sa (+++), umerena (++) ili slaba (+) za slučaj da je bilo <5% pozitivnosti. U imunohistohemijskoj analizi ED1, OX42 i GFAP, procena ekspresije vršena je brojanjem pozitivnih ćelija na 5 slučajno izabranih polja (40x) svakog isečka, a potom je bio računat prosečan broj pozitivnih ćelija (Dalmau i sar. 2003; Gosselin i sar. 2009).

Za procenu imunoreaktivnosti analiziranih isečaka korišćen je ImageJ software, Nacionalnog Instituta za zdravlje. Istraživač koji je analizirao isečke nije imao uvid u to kojoj eksperimentalnoj grupi pripadaju analizirani uzorci.

3.2. KLINIČKA STUDIJA

Klinički protokol istraživanja odobren je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu. Informisani pristanak je dobijen od svakog pacijenta pre uključivanja u istraživanje, u skladu sa preporukama *World medical association Declaration of Helsinki - Ethical principles for medical research involving human subjects* (usvojena 1964, revidirana 1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2002, 2004, 2008, 2013).

3.2.1. Kontrolna grupa pacijenata

U kontrolnoj grupi je bilo 30 pacijenata, nepušača (20 žena i 10 muškaraca), starosti od 23 do 45 godina, koji su bili primljeni na Kliniku za neurologiju KC Niš radi kompletnog dijagnostičkog sagledavanja, a pod sumnjom na postojanje demijelinizacione bolesti. Njihov klinički nalaz podrazumevao je prisustvo reverzibilnih neuroloških simptoma i znakova, u odsustvu pozitivnog nalaza u sprovedenim laboratorijskim, biohemijskim i radiološkim analizama. Konačna dijagnoza ovih pacijenata isključila je postojanje organske patologije CNS.

3.2.2. Pacijenti KIS grupe

U KIS grupu je bilo 50 pacijenata (15 muškaraca i 35 žena), starosti 17 do 57 godina, koji su bili primljeni na Kliniku za neurologiju KC Niš, zbog akutnog ili subakutnog razvoja neuroloških simptoma, pod kliničkom sumnjom na postojanje demijelinizacionog oboljenja. Sve kliničke, laboratorijske i radiološke analize, kod ovih pacijenata učinjene su neposredno po prijemu na Kliniku. Nakon što je isključena mogućnost alternativnih dijagnoza na osnovu rezultata svih preduzetih dijagnostičkih postupaka, i u odsustvu podataka iz lične anamneze o postojanju sličnih tegoba u ranijem periodu, a kako nisu bili ispunjeni svi dijagnostički kriterijumi za dijagnozu konačne MS (Polman i sar. 2011), u ovoj grupi pacijenata postavljena je dijagnoza KIS.

3.2.3. Pacijenti RRMS grupe

U RRMS grupu je bilo 57 pacijenata (12 muškaraca i 45 žena), starosti 23-58 godina, koji su bili primljeni na Kliniku za neurologiju KC Niš, sa kliničkom manifestacijom akutnih ataka ranije definisane MS, sa postojanjem odvojenih ataka (diseminovanost u vremenu) i sa potvrdom diseminovanosti promena u prostoru (klinička prezentacija odvojenih lezija CNS) (Polman i sar. 2011). Kod svih pacijenata sprovedene su detaljne kliničke, laboratorijske i radiološke pretrage. U nameri da se isključi mogućnost da se u ovu grupu uključe i pacijenti sa drugim kliničkim atakom koji bi mogao biti sporo progredirajući diseminovani encefalomijelitis, uzeto je da interval između prethodnog i aktuelnog ataka bolesti mora biti duži od 6 meseci. Samo pacijenti kod kojih je bolest klasifikovana kao RRMS (Lublin i Reingold, 1996; Polman i sar. 2011), bili su uključeni u ovu grupu.

Pacijenti sa drugim formama MS, kao i oni sa komorbidnim stanjima, nisu uključeni u istraživanje, kao ni RRMS pacijenti koji su primili imunosupresivnu, interferonsku ili kortikosteroidnu terapiju unutar 6 meseci pre uključivanja u ispitivanje.

U obe ispitivane grupe (KIS i RRMS) pacijenti nisu bili aktivni pušači u poslednjih godinu dana.

Svi pacijenti dalje su klasifikovani prema starosti, polu, vremenu od pojave neuroloških simptoma do prijema na Kliniku, dužini bolesti (RRMS), učestalosti relapsa (RRMS), nalazu izoelektričnog fokusiranja likvora i seruma, zahvaćenosti određenih struktura CNS, težini kliničke slike i radiološkog nalaza.

3.2.4. Klinička procena bolesti

Kod svih KIS i RRMS pacijenata težina kliničke prezentacije procenjivana je korišćenjem skale statusa proširene onesposobljenosti (engl. *Kurtzke's Extended Disability Status Scale* - EDSS) (Kurtzke, 1983). U odnosu na učestalost dobijenih EDSS vrednosti svi pacijenti su za potrebe daljih ispitivanja bili podeljeni na podgrupe sa blagom do umerenom, odnosno teškom kliničkom slikom.

3.2.5. Biohemijske analize

3.2.5.1. Uzorkovanje krvi i CST

Krv i likvor su uzorkovani istovremeno.

Krv je kod svih pacijenata uzorkovana venepunkcijom antekubitalne vene nakon 12h gladovanja, u jutarnjim satima, u epruvetama koje sadrže 500 mM EDTA kao antikoagulans za potrebe određivanja parametara biološko-biohemijskog sindroma zapaljenja, odnosno u hepariniziranim epruvetama (za sve preostale analize), koje su potom centrifugirane na 4500g 10 minuta, a nakon toga je plazma odvajana i čuvana na -80°C do sprovođenja planiranih biohemijskih analiza. Preostali eritrociti su ispirani tri puta u hladnom FR, a potom hemolizirani dodavanjem 9 ekvivalentnih količina hladne demineralizovane vode nakon čega su hemolizati čuvani na -80°C do izvođenja analiza. Nijedan uzorak nije bio stariji od 6 meseci u momentu sprovođenja analiza. Svi uzorci izlagani su sobnoj temperaturi jedino za vreme analiza. Sve biohemijske analize izvedene su na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

Uzorci likvora dobijani su lumbalnom punkcijom subarahnoidalnog prostora u ležećem, bočnom položaju, u nivou L3-L4. Deo uzoraka je korišćen za citološke analize i potrebe izoelektričnog fokusiranja, a deo je odmah centrifugiran na 10000g 3 minuta na 4°C kako bi se otklonili ćelijski elementi, a potom zamrznut na -80°C do sprovođenja planiranih biohemijskih analiza. U dobijenim uzorcima nije bilo znakova krvarenja. Rezultati izoelektričnog fokusiranja interpretirani su u odnosu na prisustvo odnosno odsustvo oligoklonalnih traka u likvoru sa

odgovarajućim nalazom u serumu. Permeabilnost KMB procenjjivana je odnosom koncentracije albumina u serumu odnosno likvoru.

3.2.5.2. Koncentracija nitrata i nitrita

Koncentracija NO[•] je određivana merenjem koncentracije NO₂ i NO₃ (μmol/l), direktnom spektrofotometrijskom metodom po Griessu (Griess reagent: 1.5% sulfanilamid u 1 M HCl plus 0.15% N-(1-naphthyl)ethylendiamin dihydrochlorid u destilovanoj vodi), u plazmi i likvoru (Navarro-Gonzalez i sar. 1998).

3.2.5.3. Koncentracija malondialdehida

Koncentracija MDA je određivana u plazmi, hemolizatima i likvoru spektrofotometrijskom metodom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Koncentracija TBARS izražena je kao koncentracija MDA (μmol) na litar (plazme i likvora), odnosno g Hb (hemolizat) (Andreeva i sar. 1988).

3.2.5.4. Koncentracija uznapredovalih produkata oksidacije proteina

Koncentracija AOPP je određivana u plazmi, hemolizatima i likvoru pomoću H₂O, KI i sirćetne kiseline, spektrofotometrijskom metodom, na 340 nm (Witko-Sarsat i sar. 1996). Dobijene vrednosti izražene su kao μmol na litar (plazma i likvor), odnosno g Hb (hemolizat).

3.2.5.5. Koncentracija sulfhidrilnih grupa

Ukupna količina (proteinskih i neproteinskih) SH grupa je određivana u plazmi, i likvoru, dok je u hemolizatima određivana koncentracija GSH, spektrofotometrijskom metodom korišćenjem 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) (Sedlak i Lindsay, 1968; Hu, 1994). Dobijene vrednosti izražene su kao μmol na litar (plazma i likvor), odnosno g Hb (hemolizat).

3.2.5.6. Aktivnost superoksid dizmutaze

Aktivnost SOD merena je metodom po Minami i Yoshikawa (1979), koja je bazirana na inhibiciji autooksidacije pirogalola. Superoksidni anjon formiran autooksidacijom pirogalola obrazuje obojeno jedinjenje sa NBT. Kao čistač O₂⁻, SOD inhibiše ovu reakciju, gde jedna jedinica enzimske aktivnosti predstavlja 50% inhibicije. Dobijene vrednosti izražene su kao U na litar (plazma i likvor), odnosno g Hb (hemolizat).

3.2.6. Radiološki nalaz

Tkivo CNS je ispitivano magnetnom rezonancom sa 1.5 T (Avanto, Siemens, Erlangen, Germany). MR protokol uključivao je sledeće konvencionalne spin eho sekvence: aksijalnu T₁-weighted

(vreme repeticije (VR) = 500 milisekundi, eho vreme (EV) = 78 milisekundi, broj ekcitacija (BE) = 2) i *T₂-weighted* (VR = 4700 milisekundi, EV = 93 milisekundi, BE = 2) sa debljinom preseka 5 mm, i prostorom između preseka od 0,5 mm, veličine piksela od 0,9 x 0,9 mm.

Intravenski je aplikovano Gd kontrastno sredstvo (Gadovist, Schering, Berlin, Germany) u dozi od 0,1 mmol/kg telesne mase. Broj i/ili volumen hiperintenzivnih promena viđenih na *T₂* sekvenci kao i volumen Gd vezujućih promena viđenih na *T₁* sekvenci uzimani su za potrebe analiza. Svi MR nalazi interpretirani su od strane neuroradiologa koji nije imao uvid u klinički nalaz, niti dijagnostičku klasifikaciju pacijenata. U odnosu na broj opisanih promena izvršena je podela unutar obe grupe pacijenata na one sa manjim i one sa većim brojem radioloških promena u odnosu na srednje vrednosti unutar svake grupe.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Nakon završenog istraživanja formirana je jedinstvena baza podataka u softverskom paketu SPSS (verzija 13.0) sa kojom je vršene dalja statističke obrada i analiza dobijenih rezultata.

Korišćeni su sledeći statistički postupci:

- Deskriptivna statistika: mere centralne tendencije (srednja vrednost, medijana, mod) i mere varijabiliteta (standardna devijacija, varijansa, interkvartilni raspon);
- Analitička statistika: metode za analizu značajnosti dobijenih razlika (parametrijski i/ili neparametrijski – Studentov t test, t test za uparene i nezavisne uzorke, testovi za testiranje intergrupnih varijansi (ANOVA), Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal Wallisov test. Svi testovi primenjivani su tamo gde je to bilo adekvatno uzimajući u obzir distribuciju vrednosti dobijenih varijabli, veličinu uzorka i željenu analizu), i metode za analizu povezanosti testiranih varijabli (Pearsonov koeficijent linearne korelacije, Spearmanov koeficijent korelacije rangova, linearna korelaciona i regresiona analiza).

4.

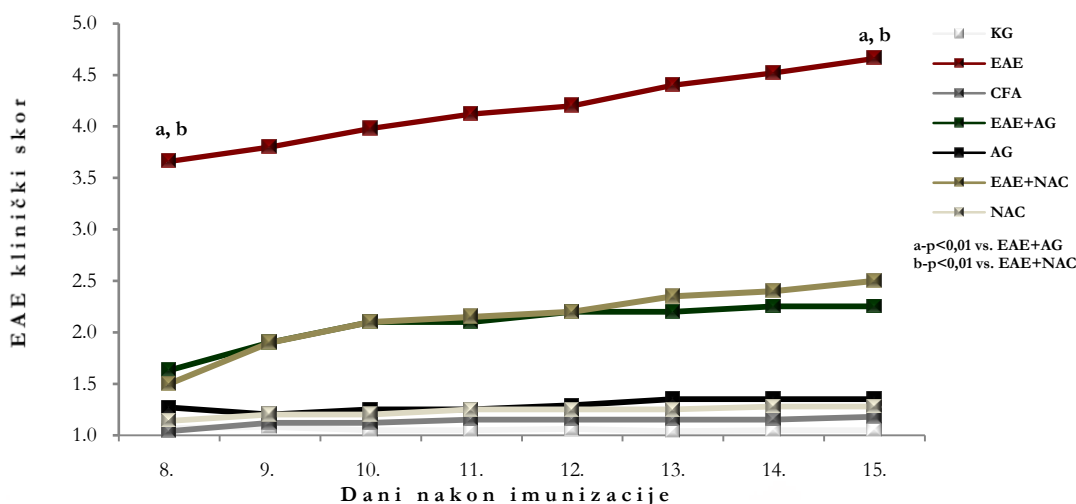
REZULTATI

4.1. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1.1. Uticaj aplikovanih supstanci na kliničko ispoljavanje EAE

Prve kliničke manifestacije EAE, u EAE životinja koje nisu tretirane AG i NAC, javile su se između 7. i 9. dana eksperimenta, uz progresiju kliničkih znakova od pada tonusa repa do slabosti zadnjih nogu i potprečaznog dela trupa (rang između 3 i 4, od 7. do 10. dana eksperimenta).

Kod EAE životinja koje su tretirane AG i NAC vreme pojave kliničkih znakova EAE se poklapa sa vremenom javljanja kod netretiranih životinja (između 7. i 9. dana eksperimenta), pri čemu je progresija kliničke slike bila manja u odnosu na netretirane EAE životinje, unutar prva 2 dana od početka kliničke prezentacije EAE.



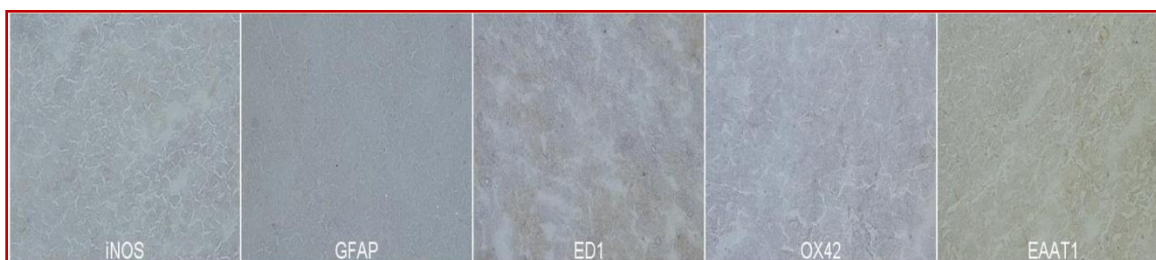
Grafikon 1. Tok i klinički skor EAE

Bolest se u obe tretirane grupe (EAE+AG i EAE+NAC) inicijalno prezentovala na skali rangova između 1 i 2 (pad tonusa repa uz neznatnu slabost zadnjih nogu), uz neznatnu progresiju sve do kraja trajanja eksperimenta. Poređenjem nalaza u inicijalnoj kliničkoj prezentaciji EAE (na početku eksperimenta), između tretiranih i netretiranih EAE životinja, uočena je statistički značajna razlika, $p=0,0015$ (EAE vs. EAE+AG) i $p=0,001$ (EAE vs. EAE+NAC). Takav trend održan je do kraja trajanja eksperimenta kada je zabeležen klinički nalaz u obe tretirane EAE grupe na skali rangova između 2 i 3 (slabost zadnjih nogu izraženijeg stepena), što je bio blaži nalaz u poređenju sa kliničkim nalazom EAE netretiranih životinja koje su imale klinički skor između 4 i 5 (oduzetost svih ekstremiteta), $p=0,0018$ (EAE vs. EAE+AG) i $p=0,0015$ (EAE vs. EAE+NAC).

Iako je efekat AG na ublažavanje toka i kliničke slike EAE bio veći u odnosu na efekat koji je ostvario NAC, nije dobijena statistička potvrda preimućstva AG u odnosu na NAC u ostvarivanju protektivnih efekata na klinički tok EAE ($p=0,085$ na početku, EAE+AG vs. EAE+NAC; $p=0,1$ na kraju, EAE+AG vs. EAE+NAC). Razvoj kliničkih znakova EAE od početka ekspresije do kraja trajanja eksperimenta, skorovan na EAE skali, prikazan je na Grafikonu 1.

4.1.2. Uticaj aplikovanih supstanci na imunohistohemijski nalaz u EAE

Rezultati imunohistohemijske obrade isečaka paraventrikularnog regiona prednjeg mozga, kontrolne grupe i EAE životinja bez tretmana i onih koje su tretirane sa AG i NAC prikazani su na slikama 9 i 10.



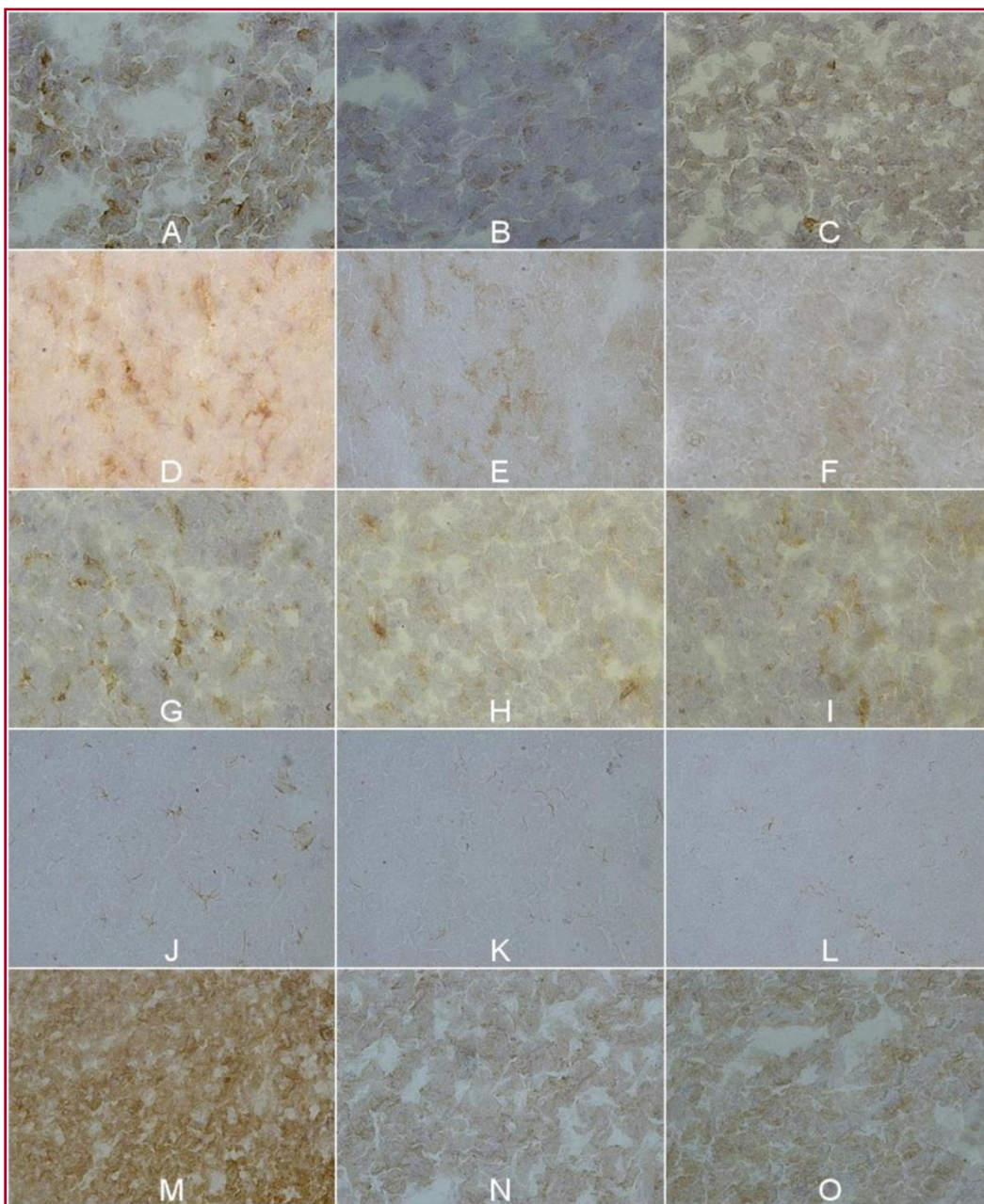
Slika 9. Ispitivani biomarkeri u uzorcima kontrolne grupe životinja

Poređenjem ekspresije analiziranih biomarkera uočava se odsustvo ili slaba ekspresija u KG (Slika 9) u poređenju sa svim EAE grupama (Slika 10). Ekspresija iNOS i EAAT1 nisu uočene ($p<0,001$; EAE, EAE+AG, EAE+NAC vs. KG), dok su GFAP+ astrociti ($p<0,001$; EAE, EAE+AG, EAE+NAC vs. KG) ili aktivisani makrofagi/mikroglia ($p<0,001$; EAE, EAE+AG, EAE+NAC vs. KG) bili izuzetno retki u KG.

U uzorcima EAE životinja, koje nisu tretirane sa AG i NAC, i onih koje su tretirane ovim supstancama, ekspresija iNOS je bila ograničena na citoplazmu pojedinačnih ćelija ili ćelija grupisanih u manje klastere. Inducibilna NOS pokazala je visoku ekspresiju (+++) u velikom broju ćelija iz EAE grupe, u poređenju sa uzorcima dobijenim iz EAE+AG (+) i EAE+NAC (+) grupe, u kojima je uočena slaba iNOS ekspresija (Slika 10, A-C; $p<0,05$).

Broj i gustina ED1 (Slika 10, D-F) i OX42 (Slika 10, G-I) pozitivnih ćelija (monociti, makrofagi i mikroglia) bio je značajno veći u uzorcima dobijenih od životinja EAE grupe koje nisu tretirane (+++), u poređenju sa EAE grupama koje su tretirane sa AG i NAC (+) ($p<0,05$).

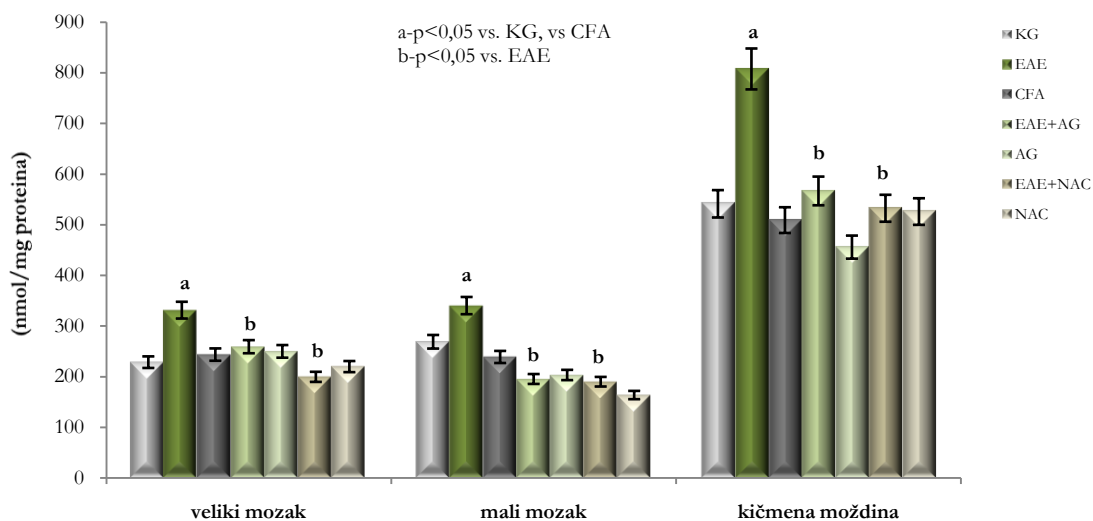
Broj GFAP pozitivnih astrocita (Slika 10, J-L) je bio veći u uzorcima EAE netretiranih životinja (+++), u odnosu na AG i NAC tretirane EAE grupe (+) ($p < 0,05$). Ekspresija ekscitatornog aminokiselinskog transportera (EAAT1) (Slika 10, M-O) pokazala je difuznu distribuciju sa izrazitim povećanjem signala u uzorcima EAE netretiranih životinja (+++), u poređenju sa rezultatima dobijenim iz AG i NAC tretiranih grupa ($p < 0,05$).



Slika 10. iNOS (A-C), ED1 (D-F), OX42 (G-I), GFAP (J-L) i EAAT1 (M-O), u uzorcima EAE životinja bez tretmana (A, D, G, J, M) i EAE životinja tretiranih sa AG (B, E, H, K, N) i sa NAC (C, F, I, L, O)

4.1.3. Uticaj aplikovanih supstanci na nivo nitrata i nitrita u EAE

Dobijeni rezultati, prikazani na Grafikonu 2, ukazuju da je nivo NO_2 i NO_3 bio značajno viši u EAE grupi ($331,2 \pm 31,4$ nmol/mg proteina - VM; $340,1 \pm 31,7$ nmol/mg proteina - MM, $807,3 \pm 57,2$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na KG ($228,3 \pm 22,4$ nmol/mg proteina - VM; $268,6 \pm 42,7$ nmol/mg proteina - MM, $541 \pm 47,8$ nmol/mg proteina - KM) i grupu koja je tretirana sa CFA ($243,3 \pm 21,4$ nmol/mg proteina - VM; $238,6 \pm 30,2$ nmol/mg proteina - MM, $508,8 \pm 35,2$ nmol/mg proteina - KM).



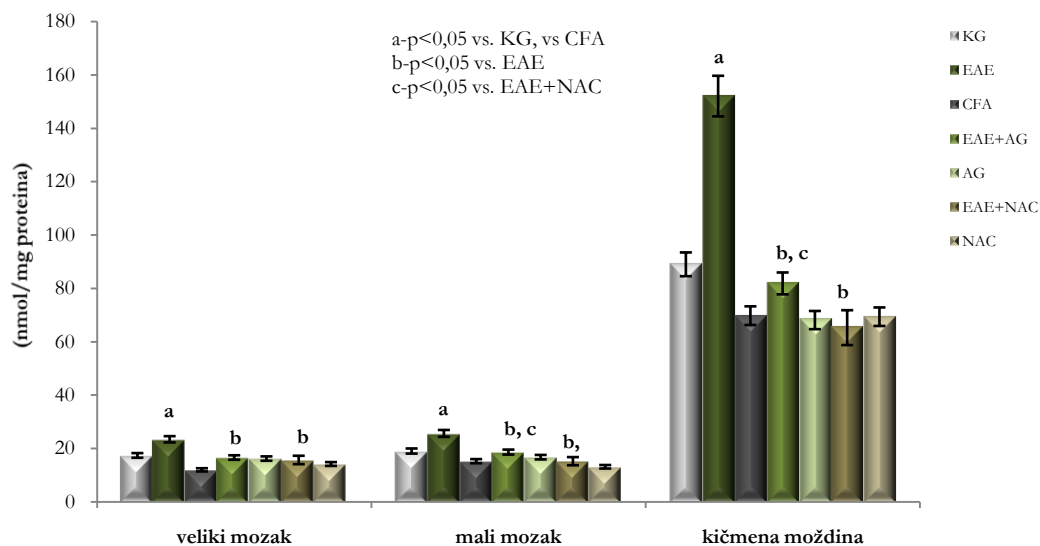
Grafikon 2. Koncentracija NO_2 i NO_3 u CNS EAE životinja sa i bez tretmana AG i NAC

Dobijena razlika je visoko statistički značajna za sve pojedinačne delove CNS EAE netretiranih životinja, ($p=0,0008$ za VM i MM, $p=0,0005$ za KM) u odnosu na vrednosti u KG. Poređenjem vrednosti pojedinačnih delova CNS, najveći porast koncentracije NO produkata je zabeležen u homogenatima tkiva KM ($p=0,0004$ u odnosu na VM i MM). Tretman EAE životinja AG značajno je smanjivao nivo NO_2 i NO_3 u svim ispitivanim strukturama CNS ($258,9 \pm 12,3$ nmol/mg proteina - VM; $195,1 \pm 32,6$ nmol/mg proteina - MM, $566,4 \pm 57,1$ nmol/mg proteina - KM), u poređenju sa EAE životinjama koje nisu tretirane ovim agensom ($p=0,0009$ za VM, $p=0,0003$ za MM, $p=0,0005$ za KM). Takođe, tretman EAE životinja NAC pokazao je statistički značajno smanjenje nivoa metabolita NO , u svim analiziranim strukturama CNS ($199,3 \pm 21,3$ nmol/mg proteina - VM; $189,7 \pm 22,6$ nmol/mg proteina - MM, $532,2 \pm 37,4$ nmol/mg proteina - KM), u odnosu na EAE životinje koje nisu imale nikakav tretman ($p=0,0003$ za VM, $p=0,0002$ za MM, $p=0,0004$ za KM).

Poređenjem ostvarenih efekata AG i NAC na smanjenje koncentracije produkata NO₂, uočen je intenzivniji efekat NAC u odnosu na AG ($p=0,007$ za VM, $p=0,045$ za MM, $p=0,056$ za KM).

4.1.4. Uticaj aplikovanih supstanci na intenzitet lipidne peroksidacije u EAE

Koncentracije MDA, krajnjeg produkta procesa lipidne peroksidacije, bile su značajno više u svim ispitivanim strukturama CNS, u EAE životinja ($23,5 \pm 4,4$ nmol/mg proteina - VM; $25,7 \pm 2,7$ nmol/mg proteina - MM, $152,1 \pm 17,2$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na KG ($17,4 \pm 2,9$ nmol/mg proteina - VM; $19,1 \pm 2,5$ nmol/mg proteina - MM, $89,1 \pm 10,2$ nmol/mg proteina - KM) i grupu životinja koja je tretirana sa CFA ($12,1 \pm 3,9$ nmol/mg proteina - VM; $15,3 \pm 3,7$ nmol/mg proteina - MM, $71,1 \pm 15,4$ nmol/mg proteina - KM), $p=0,009$ za VM, $p=0,0015$ za MM, $p=0,0003$ za KM.



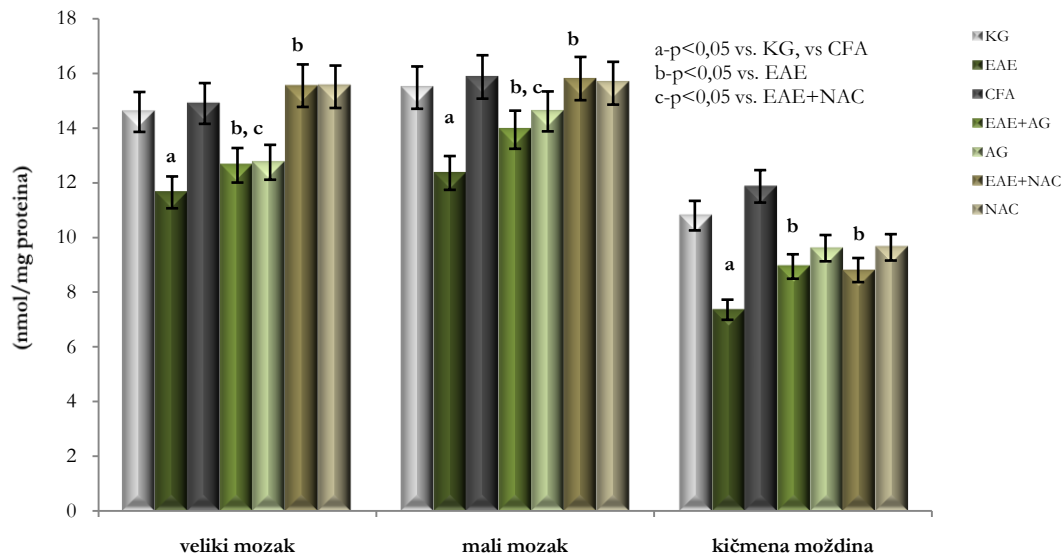
Grafikon 3. Koncentracija MDA u CNS EAE životinja sa i bez tretmana AG i NAC

Najviše koncentracije MDA zabeležene su u homogenatima tkiva KM ($p=0,00004$, u odnosu na VM i MM) (Grafikon 3) Tretman AG doveo je do smanjenja koncentracije MDA u svim ispitivanim strukturama CNS EAE životinja ($16,7 \pm 2,4$ nmol/mg proteina - VM; $16,8 \pm 3$ nmol/mg proteina - MM, $68,1 \pm 19,2$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na EAE životinje koje nisu tretirane ovim agensima ($p=0,0006$ za VM, $p=0,0002$ za MM, $p=0,00025$ za KM). Tretman NAC izazvao je značajno smanjenje nivoa MDA, u svim analiziranim strukturama CNS ($15,7 \pm 3,9$ nmol/mg proteina - VM; $15,3 \pm 2,8$ nmol/mg proteina - MM, $65,3 \pm 21,2$ nmol/mg proteina - KM), u odnosu na EAE životinje koje nisu imale nikakav tretman ($p=0,0006$ za VM, $p=0,00011$ za MM, $p=0,00025$ za KM).

Poređenjem ostvarenih efekata AG i NAC na smanjenje koncentracije MDA, uočen je izrazitiji efekat NAC u odnosu na AG ($p=0,07$ za VM, $p=0,05$ za MM, $p=0,035$ za KM).

4.1.5. Uticaj aplikovanih supstanci na koncentraciju GSH u EAE

Koncentracije GSH beležile su pad u svim ispitivanim delovima CNS, u EAE životinja ($11,6\pm 2,4$ nmol/mg proteina - VM; $12,4\pm 3,7$ nmol/mg proteina - MM, $7,4\pm 2,2$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na KG ($14,6\pm 3,4$ nmol/mg proteina - VM; $15,5\pm 3,4$ nmol/mg proteina - MM, $10,8\pm 1,2$ nmol/mg proteina - KM) i CFA grupu ($14,9\pm 2,4$ nmol/mg proteina - VM; $15,9\pm 2$ nmol/mg proteina - MM, $11,9\pm 2,2$ nmol/mg proteina - KM), $p=0,0085$ za VM, $p=0,0075$ za MM, $p=0,005$ za KM.



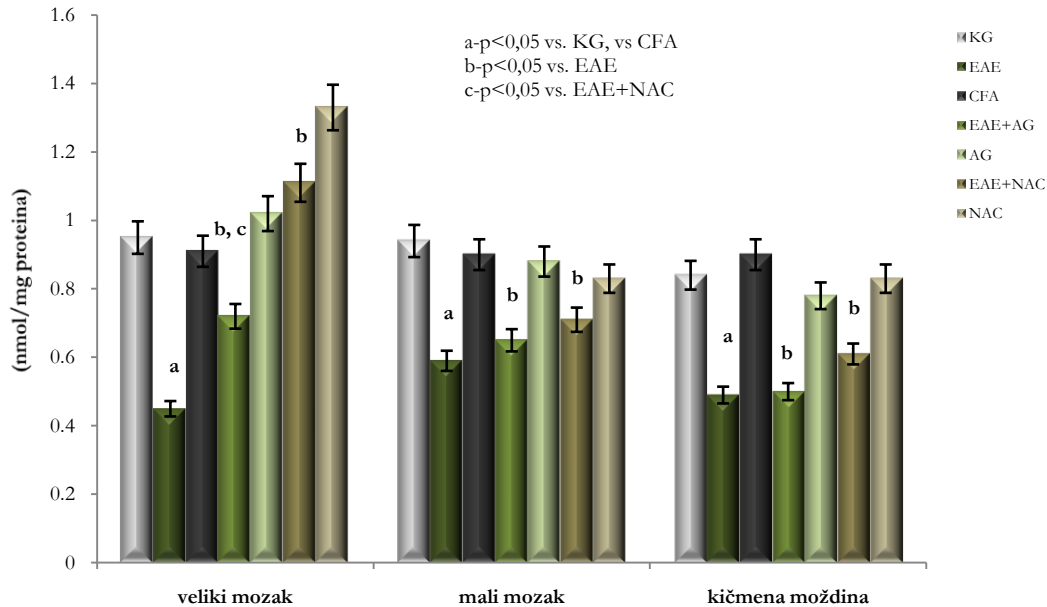
Grafikon 4. Koncentracija GSH u CNS EAE životinja sa i bez tretmana AG i NAC

Na Grafikonu 4, se uočava da tretman AG dovodi do povećanja koncentracije GSH u svim ispitivanim strukturama CNS EAE životinja ($12,6\pm 1,9$ nmol/mg proteina - VM; $13,9\pm 2,9$ nmol/mg proteina - MM, $8,9\pm 1,8$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na EAE životinje koje nisu tretirane ovim agensima ($p=0,075$ za VM, $p=0,067$ za MM, $p=0,071$ za KM). Tretman NAC pokazao je povećanje koncentracije GSH, u svim analiziranim strukturama CNS ($15,5\pm 2,9$ nmol/mg proteina - VM; $15,8\pm 2,2$ nmol/mg proteina - MM, $8,8\pm 1,2$ nmol/mg proteina - KM), u odnosu na EAE životinje koje nisu imale nikakav tretman, $p=0,001$ za VM, $p=0,009$ za MM, $p=0,061$ za KM.

Poređenjem ostvarenih efekata AG i NAC na povećanje koncentracije GSH, uočen je intenzivniji efekat NAC u odnosu na AG ($p=0,018$ za VM, $p=0,025$ za MM, $p=0,085$ za KM).

4.1.6. Uticaj aplikovanih supstanci na aktivnost SOD u EAE

Dobijeni rezultati pokazuju da je aktivnost SOD bila značajno snižena u EAE životinja ($0,45\pm0,09$ nmol/mg proteina - VM; $0,59\pm0,07$ nmol/mg proteina - MM, $0,49\pm0,1$ nmol/mg proteina - KM) u poređenju sa KG ($0,95\pm0,1$ nmol/mg proteina - VM; $0,94\pm0,2$ nmol/mg proteina - MM, $0,84\pm0,1$ nmol/mg proteina - KM) i grupom koja je tretirana sa CFA ($0,91\pm0,1$ nmol/mg proteina - VM; $0,9\pm0,1$ nmol/mg proteina - MM, $0,9\pm0,1$ nmol/mg proteina - KM), u svim ispitivanim strukturama CNS, $p=0,0005$ za VM, $p=0,009$ za MM, $p=0,001$ za KM.

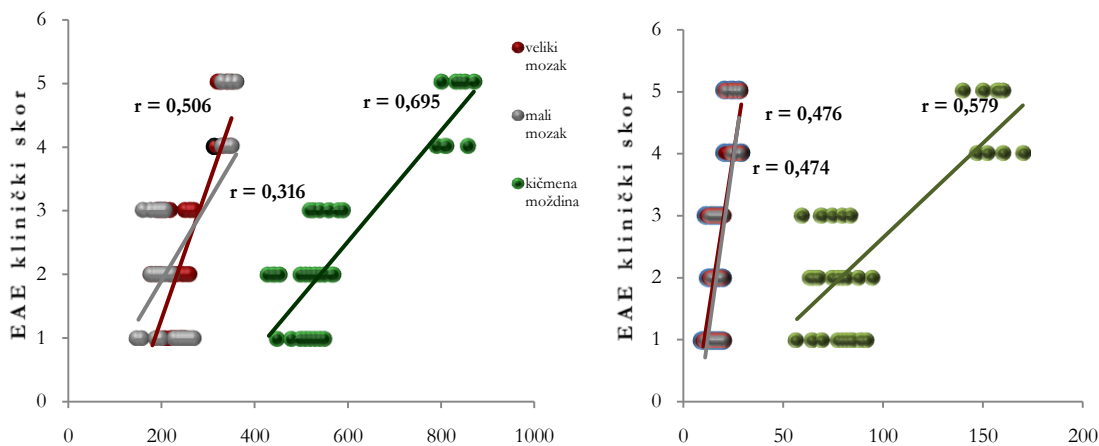


Grafikon 5. Aktivnost SOD u CNS EAE životinja sa i bez tretmana AG i NAC

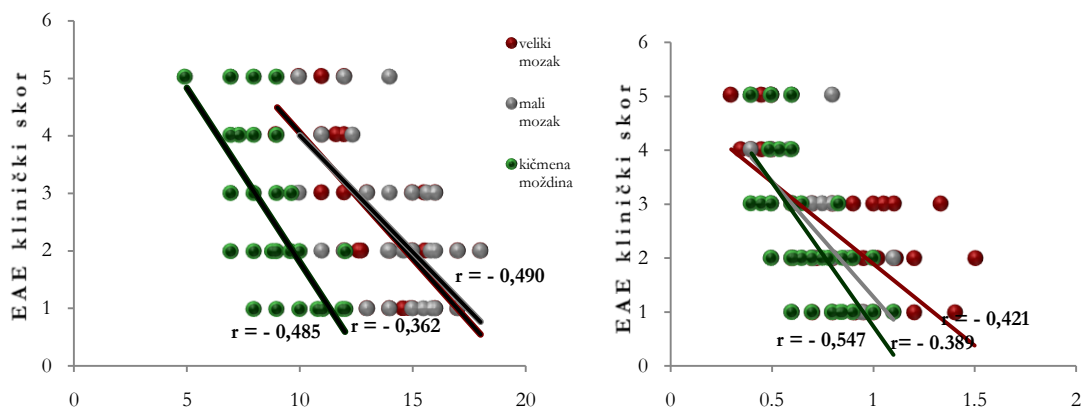
Na Grafikonu 5 se vidi da tretman AG dovodi do povećanja aktivnosti SOD u svim ispitivanim strukturama CNS EAE životinja ($0,72\pm0,09$ nmol/mg proteina - VM; $0,65\pm0,09$ nmol/mg proteina - MM, $0,5\pm0,1$ nmol/mg proteina - KM) u odnosu na EAE životinje koje nisu tretirane ovim agensima, $p=0,001$ za VM, $p=0,08$ za MM, $p=0,09$ za KM. Tretman NAC pokazao je povećanje aktivnosti SOD, u svim analiziranim strukturama CNS ($1,11\pm0,12$ nmol/mg proteina - VM; $0,71\pm0,17$ nmol/mg proteina - MM, $0,61\pm0,17$ nmol/mg proteina - KM), u odnosu na EAE životinje koje nisu imale nikakav tretman, $p=0,0095$ za VM, $p=0,055$ za MM, $p=0,065$ za KM.

Poređenjem ostvarenih efekata AG i NAC na povećanje aktivnosti SOD, uočen je izraženiji efekat NAC u odnosu na AG ($p=0,025$ za VM, $p=0,075$ za MM, $p=0,055$ za KM).

4.1.7. Korelacije koncentracija ispitivanih parametara i kliničkog skora EAE



Grafikon 6. Korelacije koncentracije NO₂ i NO₃ (levo) i MDA (desno) sa EAE kliničkim skorom



Grafikon 7. Korelacije koncentracije GSH (levo) i aktivnosti SOD (desno) sa EAE kliničkim skorom

Analizom korelacije koncentracija ispitivanih parametara i težine kliničke prezentacije EAE (Grafikon 6), uočena je pozitivna korelacija EAE nalaza i koncentracija NO₂ metabolita u svim analiziranim kompartmanima CNS, VM ($r=0,506$, $p=0,02$), MM ($r=0,316$, $p=0,015$), KM ($r=0,695$, $p=0,01$). Takođe, porast na skali kliničkog skora EAE pokazao je pozitivnu korelaciju sa vrednostima MDA, u svim analiziranim tkivima (Grafikon 6), VM ($r=0,476$, $p=0,025$), MM ($r=0,474$, $p=0,02$), KM ($r=0,579$, $p=0,015$).

Na Grafikonu 7 se uočava negativna linearna povezanost promene koncentracije GSH, u svim pojedinačnim delovima CNS i težine kliničkog nalaza EAE, VM ($r=-0,362$, $p=0,025$), MM ($r=-0,490$, $p=0,01$), KM ($r=-0,485$, $p=0,01$). Analizom korelacije promena aktivnosti SOD u CNS i težine kliničke slike EAE (Grafikon 7), uočena je takođe negativna linearna povezanost promene aktivnosti SOD u svim strukturama CNS, VM ($r=-0,421$, $p=0,03$), MM ($r=-0,389$, $p=0,035$), KM ($r=-0,547$, $p=0,013$).

4.2. KLINIČKI DEO

4.2.1. Opšte karakteristike pacijenata

Poređenjem godina života KIS (37,5 godina (17-57)), RRMS pacijenata (40 godina (23-58)) i pacijenata KG (35 godina (23-45)) nisu uočene statistički značajne razlike, $p=0,065$ KIS vs. KG; $p=0,052$ RRMS vs. KG; $p=0,073$ KIS vs. RRMS. Pacijenti KIS grupe bili su mlađi u poređenju sa RRMS što je očekivano s obzirom na 58elap ovo pacijenti sa prvom kliničkom manifestacijom bolesti. U obe grupe, žene su bile dominantnije zastupljene u odnosu na muškarce (KIS – 35/15, RRMS – 45/12), $p=0,021$ KIS (ženski pol vs. muški pol); $p=0,018$ (ženski pol vs. muški pol).

Tabela 1. Opšte karakteristike pacijenata

	KG	KIS	RRMS
broj	30	50	57
žene/muškarci	20/10	35/15 ^a	45/12 ^a
starost (godine)	35 (23-45)	37,5 (17-57)	40 (23-58)
broj meseci od pojave neuroloških simptoma	/	2 (1-12)	1 (1-12)
dužina bolesti (meseci)	/	/	84 (1-396)
broj 58elapse po godini	/	/	0,5 (0.2-1)

^a $p<0,05$, broj žena vs. broj muškaraca

U pogledu trajanja aktuelnih kliničkih simptoma i znakova bolesti, računato od momenta njihove pojave do momenta aktuelne hospitalizacije, tj uključivanja u istraživanje, nisu dobijene statistički značajne različitosti između KIS i RRMS pacijenata (2 meseca (1-12), za obe grupe; $p>0,05$). Dužina trajanja bolesti, računato od momenta postavljanja definitivne dijagnoze RRMS, u RRMS pacijenata iznosila je od 1 do 396 meseci (vrednost medijane 84), dok se broj 58elapse kretao od 0,2 do 1 na godinu dana (vrednost medijane 0,5). Rezultati su prikazani u Tabeli 1.

4.2.2. Vrednosti parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije

Vrednosti svih parametara biološko-biohemijskog sindroma zapaljenja u plazmi i likvoru (Tabela 2) bile su izrazitije povećane u KIS i RRMS pacijenata u odnosu na pacijente KG ($p < 0,05$).

Tabela 2. Vrednosti parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije

	KG	KIS	RRMS
Sedimentacija (SE/č)	5 (2-17)	22 (2-31) ^a	18 (3-33) ^a
Broj leukocita /Gr/Ly/Mo (x10 ⁹ /L ⁻¹)	5 (4-9)/4 (3-7)/1.5 (0,9-2,5)	9 (3,7-14)/7 (2,7-11,2)/2 (0,7-3,1) ^a	8 (4,1-19,8)/6 (2,1-13,8)/2 (1,1-4,2) ^a
C-reaktivni protein (CRP) (mg/L)	2 (0-10)	12 (2-21) ^a	9 (2-18) ^{a,b}
Fibrinogen (mg/dL)	3 (2-5)	9 (5-13) ^a	6 (4-10) ^{a,b}
Broj eritrocita (x 10 ¹² /L)	4,79±0,9	4,05±0,75 ^a	3,55±0,8 ^{a,b}
Hemoglobin (g/dL)	14±0,85	13,4±1,04 ^a	12,7±1,15 ^a
Hematokrit (%)	42,3±2,1	39,5±4,3	36,5±6,1 ^{a,b}
Gr/Ly (u likvoru)	1(0-2)/0	3 (0-8)/5 (0-10)	3 (0-8)/2 (0-5)
OKT+/OKT- (u likvoru)	/	15/35 ^c	53/4 ^c
Indeks propustljivosti KMB/N	4±1,05/20	5,9±0,95/29 ^a	6,2±0,7/15 ^a
prot/alb (u plazmi, g/L)	66,4±17,2/39±10,1	64,2±12/42,3±9,5	60,2±10,2/43,9±11,1
prot/alb (u likvoru, g/L)	0,25±0,1/0,16±0,05	0,32±0,13/0,25±0,11 ^a	0,42±0,23/0,27±0,11 ^{a,b}

a- $p < 0,05$, vs. kontrolna grupa; b- $p < 0,05$, vs. KIS; c- $p < 0,05$, OKT+ vs. OKT-

Poređenjem dobijenih vrednosti između KIS i RRMS pacijenata dobijene su sledeće značajnosti: SE je bila više ubrzana u KIS (22/č (2-31) u odnosu na RRMS (18 (3-33)) pacijente, $p=0,057$; CRP je pokazivao više vrednosti u KIS (12 mg/L (2-21) u poređenju sa RRMS (9 mg/L (2-18)) pacijentima, $p=0,062$; vrednosti fibrinogena bile su izrazitije povećane u KIS (9 g/L (5-13) u poređenju sa RRMS (6 g/L (4-10)) pacijentima, $p=0,035$. Ukupan broj leukocita, kao i broj pojedinačnih ćelijskih fenotipova bele loze, bio je blago viši u KIS ($9 \times 10^9/L$ ($3,7-14 \times 10^9/L$)) u odnosu na RRMS ($8 \times 10^9/L$ ($4,1-19,8 \times 10^9/L$)) grupu pacijenata, $p=0,08$.

Analiza dobijenih vrednosti hematograma ukazala je na pad broja eritrocita, hematokrita i koncentracije 59elapse59in u KIS i RRMS pacijenata u odnosu na KG ($p < 0,05$). Broj eritrocita bio je viši u KIS ($4,05 \pm 0,75 \times 10^{12}/L$) u odnosu na RRMS pacijente ($3,55 \pm 0,8 \times 10^{12}/L$), $p=0,045$. Koncentracija 59elapse59in je bila viša u KIS ($13,4 \pm 1$ g/dL) u odnosu na RRMS grupu ($12,7 \pm 1,1$ g/dL), $p=0,08$. Isti trend je uočen i u analizi vrednosti hematokrita, poređenjem KIS ($39,5 \pm 4,3$) i RRMS ($36,5 \pm 6,1$) pacijenata, $p=0,085$.

Nije uočena značajna razlika u broju polimorfonukleara u likvoru između KIS i RRMS grupe, $p=0,9$, dok je poređenjem broja limfocita u likvoru, veći porast uočen u KIS (5 (0-10)) u odnosu na RRMS (2 (0-5)) pacijente, $p=0,038$. Kod većeg broja RRMS pacijenata (54 pacijenta) dokazano je prisustvo oligoklonalnih traka (OKT+) na izoelektričnom fokusiranju likvora i seruma u odnosu na broj KIS pacijenata (15 pacijenata) koji su imali OKT+, $p=0,025$.

Narušenost KMB, definisana kao povećanje odnosa koncentracije albumina u likvoru u odnosu na vrednosti u serumu $>7,0 \times 10^{-3}$, uočena je kod 7 KIS i 11 RRMS pacijenata. Kod ostalih pacijenata obe grupe dobijene razlike u proceni permeabilnosti KMB, između KIS ($5,9 \pm 0,95$) i RRMS ($6,2 \pm 0,7$) pacijenata, nisu bile statistički značajne ($p=0,08$). Koncentracije ukupnih proteina u likvoru bile su više u RRMS ($0,42 \pm 0,23$ g/L) u odnosu na pacijente KIS grupe ($0,32 \pm 0,13$ g/L), $p=0,032$. Nisu uočene statistički značajne razlike koncentracija albumina u likvoru između KIS ($0,25 \pm 0,1$ g/L) i RRMS pacijenata ($0,27 \pm 0,1$ g/L), $p=0,07$.

Takođe, poređenjem koncentracije ukupnih proteina u plazmi između KIS ($64,2 \pm 12$ g/L) i RRMS ($60,2 \pm 10,2$ g/L) grupe, i plazmatskih koncentracija albumina KIS ($42,3 \pm 9,5$ g/L) i RRMS ($43,9 \pm 11,1$ g/L) grupe, nisu uočene statistički značajne razlike, $p=0,072$ i $p=0,084$.

4.2.3. Neurološki nalaz KIS i RRMS pacijenata

Uočeno je da najveći broj pacijenata ima simptome i znake afekcije više od jednog funkcionalnog sistema CNS (Tabela 3), u obe, KIS (35 pacijenata) i RRMS grupi (47 pacijenata), $p=0,035$ (KIS vs. RRMS). Kod ostalih pacijenata obe grupe dominantan neurološki nalaz bila je piramidna (KIS – 11, RRMS – 9 pacijenata), $p=0,075$, i senzorna (KIS – 3, RRMS – 1 pacijent) ošteta, kao i smetnje vida (KIS – 1 pacijent).

Tabela 3. Neurološki nalaz kod KIS i RRMS pacijenata

	KIS	RRMS
Piramidna lezija	11	9
Senzitivni ispadi	3	1
Smetnje vida	1	/
Oštećenje više od jednog funkcionalnog sistema	35	47 ^a

a- $p < 0,05$, vs. KIS

Demografske karakteristike pacijenata, trajanje neuroloških tegoba do momenta dolaska na bolničko lečenje, broj relapsa i ukupno trajanje bolesti od momenta postavljanja dijagnoze (za RRMS pacijente), u odnosu na vrednosti medijane EDSS, prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Karakteristike pacijenata u odnosu na vrednosti EDSS

	EDSS (KIS)		EDSS (RRMS)	
	≤ 3	> 3	≤ 5	> 5
broj	26	24	30	27
žene/muškarci	19/7	16/8	27/3	18/9
starost (godine)	37 (17-57)	38 (26-52)	39 (23-59)	41 (23-58)
broj meseci od pojave neuroloških simptoma	1 (1-12)	4 (1-12) ^a	1 (1-12)	1 (1-12)
prethodno trajanje bolesti (meseci)	/	/	46 (1-250)	96 (8-396) ^b
broj relapsa po godini	/	/	0,75 (0,2-1)	0,5 (0,25-1)

a-p<0,05, vs. KIS EDSS≤3; b-p<0,05, vs. RRMS EDSS≤5

Uočena je statistička značajnost u razlici trajanja tegoba do dolaska na bolničko lečenje u KIS pacijenta sa većim (vrednost medijane 1 mesec (1-12 meseci)) u odnosu na KIS pacijente sa manjim EDSS (vrednost medijane 4 meseca (1-12 meseci)), p=0,025. Poređenjem dužine trajanja bolesti (od momenta postavljanja dijagnoze definitivne RRMS), uočeno je da RRMS pacijenti sa većim EDSS imaju duže trajanje bolesti (vrednost medijane 96 meseci (8-396 meseci)), u odnosu na one koji imaju manji EDSS (vrednost medijane 46 meseci (1-250 meseci)) (p=0,0013).

Poređenjem ostalih dobijenih vrednosti u podgrupama KIS i RRMS pacijenata podeljenih na osnovu EDSS nalaza, nisu dobijene statistički značajne razlike (p>0,05).

4.2.4. Radiološki nalaz KIS i RRMS pacijenata

Podaci koje se odnose na radiološki nalaz (Tabela 5), ukazuju da je kod 37 pacijenata KIS grupe i svih RRMS pacijenata uočeno postojanje T₂ hiperintenzivnih signala (p=0,035, RRMS vs. KIS). Ovi podaci su dobijeni na osnovu rezultata sprovedene MR prilikom aktuelne hospitalizacije, kao i uvidom u raniju medicinsku dokumentaciju pacijenata. Za potrebe detaljnijih analiza u ovom istraživanju, korišćeni su samo MR nalazi koji su načinjeni u toku aktuelne hospitalizacije, kod 16 pacijenata KIS i 15 pacijenata RRMS grupe.

Uočeno je da je ukupan broj, i broj supratentorijskih hiperintenzivnih signala viđenih na T₂ sekvenci, bio statistički značajno veći u grupi RRMS pacijenata (vrednost medijane za ukupan broj lezija i broj lezija supratentorijske lokalizacije – 40 (5-84 supratentorijske, 3-70 infratentorijske lokalizacije)) u odnosu na iste karakteristike u KIS pacijenata (vrednost medijane za ukupan broj lezija - 9 (0-56), vrednost medijane za ukupan broj supratentorijskih lezija - 8 (0-80)), p=0,023 i p=0,03.

Volumen Gd vezujućih lezija, viđenih na T₁ sekvenci, je bio statistički značajno veći u RRMS grupi, kako u mozgu (277,7±109,1 mm³), tako i kičmenoj moždini (641,3±210,2 mm³), u poređenju sa istim nalazom u mozgu (146,5±46,8 mm³) i kičmenoj moždini (446,6±120,1 mm³) pacijenata iz KIS grupe, p=0,031 (za mozak), p=0,04 (za kičmenu moždinu).

Tabela 5. Radiološki nalaz kod KIS i RRMS pacijenata

	KIS		RRMS	
	mozak	kičmena moždina	mozak	kičmena moždina
T ₂ hiperintenzivne lezije				
Ukupan broj	9 (0-56)/16	/	40 (5-84)/15 ^a	/
Supratentorijski	8 (0-80)/16	/	40 (3-70)/15 ^a	/
Infratentorijski	2 (0-10)/16	/	3 (0-14)/15	/
T ₁ Gd+ lezije (broj)	2 (0-3)/16	1 (0-2)/9	2 (1-2)/15	1 (0-2)/7
T ₁ Gd+ lezije (mm ³)	146,5±46/16	546,6±120/9	277,7±109/15 ^a	641,3±250,2/7 ^a
Ukupan broj pacijenata sa T ₂ -hiperintenzivnim lezijama	37		57 ^a	

a-p<0,05, vs. KIS

4.2.5. Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na starost pacijenata

Dobijene vrednosti ispitivanih parametara u plazmi, likvoru i hemolizatima, u odnosu na starost pacijenata prikazani su na Tabeli 6.

Uočeno je da stariji pacijenti imaju veće koncentracije NO₂ i NO₃, u odnosu na mlađe pacijente, i u KIS (plazma - p=0,034; likvor – p=0,04), i u RRMS grupi (plazma – p=0,03; likvor – p=0,025). Slično, koncentracija MDA u svim ispitivanim medijumima bila je veća u grupi starijih u odnosu na mlađe pacijente, u obe ispitivane grupe, KIS (plazma – p=0,07; likvor – p=0,06; hemolizat – p=0,09), i u RRMS grupi (plazma – p=0,055; likvor – p=0,065; hemolizat – p=0,06). Koncentracije AOPP beležile su porast u grupi starijih pacijenata i u KIS (plazma – p=0,05; likvor – p=0,06; hemolizat – p=0,055), i u RRMS grupi (plazma – p=0,06; likvor – p=0,04; hemolizat – p=0,095).

Tabela 6. Vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na starost pacijenata

Starost (godine)	KIS		RRMS	
	starost ≤ 37,5 /26	starost > 37,5 /24	starost ≤ 40 /30	starost > 40 /27
NO₂ i NO₃				
(μmol/L plazme)	88,7±9,7	98,6±9 ^a	75,8±7,7	85,4±7,4 ^b
(μmol/L likvora)	16,2±3,4	22,2±4,2 ^a	14,5±3,8	19,3±4,1 ^b
MDA				
(μmol/L plazme)	9,4±1,2	9,8±1,5	8,9±1	9,3±1,1
(μmol/L likvora)	4,1±0,8	4,7±0,65	3,8±0,6	4,2±0,5
(μmol/g Hb hemolizata)	0,6±0,12	0,64±0,1	0,78±0,1	0,83±0,14
AOPP				
(μmol/L plazme)	94,3±6,7	100,3±7,1 ^a	72,7±6	78,2±7,5
(μmol/L likvora)	47±7,1	51,2±8,7	32,7±6,2	39,2±7 ^b
(μmol/g Hb hemolizata)	0,89±0,16	1,1±0,1	1±0,12	1,1±0,15
SH grupe				
(μmol/L plazme)	184,2±16,5	172,3±14,4 ^a	147,1±12,1	127,3±10 ^b
(μmol/L likvora)	82,2±9,4	74,6±8,6 ^a	42,2±6,3	28,5±7,6 ^b
(μmol GSH/g Hb hem.)	6,8±0,54	6,83±0,42	5,3±0,5	5,1±0,4
SOD				
(U/mL plazme)	2,3±0,4	1,9±0,3	2,4±0,2	1,6±0,2 ^b
(U/mL likvora)	0,25±0,04	0,15±0,06 ^a	0,26±0,03	0,18±0,04
(U/g Hb hemolizata)	2131±258	1973±354 ^a	1954±358	1875±320 ^b

a-p<0,05, vs. KIS starost≤37,5; b-p<0,05, vs. RRMS starost≤40

Istovremeno, uočen je pad vrednosti SH u plazmi i likvoru, odnosno GSH u hemolizatima, u starijih u odnosu na mlađe i u KIS (plazma – p=0,025; likvor – p=0,04; hemolizat – p=0,9) i u RRMS pacijenata (plazma – p=0,015; likvor – p=0,035; hemolizat – p=0,75). Trend pada aktivnosti SOD sa porastom godina života zabeležen je i u KIS (plazma – p=0,065; likvor – p=0,031; hemolizat – p=0,05) i u RRMS pacijenata (plazma – p=0,025; likvor – p=0,031; hemolizat – p=0,07).

4.2.6. Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na pol pacijenata

Analizom dobijenih vrednosti ispitivanih parametara, u odnosu na pol pacijenata (Tabela 7), uočeno je da muškarci imaju više vrednosti koncentracija NO₂ i NO₃, u odnosu na žene, i u KIS (plazma – p=0,06; likvor – p=0,075), i u RRMS grupi (plazma – p=0,065; likvor – p=0,023). Koncentracija MDA u svim ispitivanim medijumima bila je selektivno viša u žena u odnosu na muškarce, u obe ispitivane grupe, KIS (plazma – p=0,078; likvor – p=0,045; hemolizat – p=0,9), i u RRMS grupi (plazma – p=0,85; likvor – p=0,95; hemolizat – p=0,6).

Koncentracije AOPP beležile su porast koncentracije u muškaraca u odnosu na žene i u KIS (plazma – $p=0,58$; likvor – $p=0,6$; hemolizat – $p=0,55$), i u RRMS pacijenata (plazma – $p=0,06$; likvor – $p=0,06$; hemolizat – $p=0,55$).

Tabela 7. Vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na pol pacijenata

Pol/broj	KIS		RRMS	
	žene / 35	muškarci / 15	žene / 45	muškarci / 12
NO₂ i NO₃				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	89,4 \pm 9,5	96,3 \pm 9,1	78,7 \pm 6,7	82,1 \pm 7,5
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	18,1 \pm 3,9	20,4 \pm 4	15,5 \pm 3	19,3 \pm 3,1 ^a
MDA				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	9,7 \pm 1,2	9,5 \pm 1,2	9,2 \pm 1	9 \pm 1
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	4,8 \pm 0,7 ^a	4 \pm 0,6	4,2 \pm 0,5	4 \pm 0,4
($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	0,62 \pm 0,1	0,62 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,82 \pm 0,1
AOPP				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	96,1 \pm 6,5	98,3 \pm 7	73,5 \pm 6,1	77,2 \pm 7
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	48 \pm 7	50,5 \pm 7,4	34,8 \pm 6,2	37,2 \pm 6,9
($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	0,9 \pm 0,11	1 \pm 0,11	1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
SH grupe				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	176,1 \pm 14,5	180,9 \pm 14	127,1 \pm 12,1	147,3 \pm 10,4 ^a
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	76,2 \pm 7,4	80,6 \pm 8	30,7 \pm 6,9	40,5 \pm 7 ^a
GSH ($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	6,8 \pm 0,4	6,67 \pm 0,5	4,9 \pm 0,4	5,1 \pm 0,34
SOD				
(U/mL plazme)	2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
(U/mL likvora)	0,20 \pm 0,04	0,21 \pm 0,06	0,18 \pm 0,02	0,25 \pm 0,04 ^a
(U/g Hb hemolizata)	2051 \pm 281	2178 \pm 314	1784 \pm 325	1980 \pm 300 ^a

a- $p<0,05$, vs. žene

Uočen je pad vrednosti SH grupa u plazmi i likvoru, odnosno GSH u hemolizatima, u žena u odnosu na muškarce i u KIS (plazma – $p=0,095$; likvor – $p=0,055$; hemolizat – $p=0,65$) i RRMS pacijenata (plazma – $p=0,025$; likvor – $p=0,025$; hemolizat – $p=0,07$). Pad aktivnosti SOD bio je dominantniji u žena u odnosu na muškarce i u KIS (plazma – $p=0,075$; likvor – $p=0,3$; hemolizat – $p=0,05$) i u RRMS pacijenata (plazma – $p=0,065$; likvor – $p=0,03$; hemolizat – $p=0,045$).

4.2.7. Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na nalaz OKT u likvoru

Analizom dobijenih vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo ili odsustvo oligoklonalnih traka (OKT+/OKT-) u plazmi i/ili likvoru (Tabela 8), uočen je porast koncentracije NO₂ i NO₃, MDA i AOPP, i pad koncentracije SH grupa i aktivnosti SOD u grupi OKT+ u odnosu na OKT- i u KIS i u RRMS grupi.

Tabela 8. Vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo oligoklonalnih traka

	KIS		RRMS	
OKT/broj	OKT+/15	OKT-/35	OKT+/53	OKT-/4
NO₂ i NO₃				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	97,8 \pm 9 ^a	90,5 \pm 9,4	84,5 \pm 6,5	75,9 \pm 7,7
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	23,1 \pm 3,5 ^a	16,5 \pm 4	21 \pm 3,6	13,9 \pm 3,5
MDA				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	9,9 \pm 1 ^a	9,1 \pm 1,3	9,9 \pm 1	8,1 \pm 1,1
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	5,4 \pm 0,8 ^a	3,9 \pm 0,5	4,9 \pm 0,6	3,8 \pm 0,35
($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	0,72 \pm 0,1 ^a	0,55 \pm 0,1	0,89 \pm 0,1	0,75 \pm 0,1
AOPP				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	100,1 \pm 6,9	96,3 \pm 7,3	79,3 \pm 6,5	71,2 \pm 6,7
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	54,3 \pm 7 ^a	44,5 \pm 8,4	40,8 \pm 5,2	31,4 \pm 6
($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	1,1 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
SH grupe				
($\mu\text{mol/L}$ plazme)	170,2 \pm 13,5 ^a	185,8 \pm 13,9	130,1 \pm 11,1	144,6 \pm 12,4
($\mu\text{mol/L}$ likvora)	74,5 \pm 7,1 ^a	83,6 \pm 7,8	33,4 \pm 6,9	37,5 \pm 6,9
GSH ($\mu\text{mol/g}$ Hb hemolizata)	6,7 \pm 0,35	6,6 \pm 0,65	4,8 \pm 0,35	5,4 \pm 0,3
SOD				
(U/mL plazme)	1,9 \pm 0,25 ^a	2,4 \pm 0,21	1,8 \pm 0,15	2,2 \pm 0,22
(U/mL likvora)	0,19 \pm 0,05 ^a	0,23 \pm 0,05	0,2 \pm 0,03	0,23 \pm 0,05
(U/g Hb hemolizata)	2007 \pm 222 ^a	2258 \pm 224	1845 \pm 285	1990 \pm 210

a-p<0,05, vs. OKT-

S obzirom na mali broj OKT- pacijenata u RRMS grupi (4 pacijenta) koji nije dozvolio validnu procenu statističke značajnosti dobijenih razlika vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na OKT+ RRMS pacijente (53 pacijenta), statistička obrada je vršena samo za KIS pacijente.

Tako su u KIS grupi uočene više vrednosti koncentracija NO₂ i NO₃ u OKT+ u odnosu na OKT- pacijente (plazma – p=0,045; likvor – p=0,025). Koncentracija MDA u svim ispitivanim medijumima bila je viša u OKT+ u odnosu na OKT- pacijente ove grupe (plazma – p=0,05; likvor – p=0,019; hemolizat – p=0,03). Koncentracije AOPP su bile više u OKT+ u odnosu na OKT- pacijente (plazma – p=0,65; likvor – p=0,045; hemolizat – p=0,045).

Uočen je pad vrednosti SH grupa u plazmi i likvoru, odnosno GSH u hemolizatima, u OKT+ u odnosu na OKT- pacijente KIS grupe (plazma – p=0,035; likvor – p=0,05; hemolizat – p=0,85). Aktivnosti SOD ukazivale su na pad u OKT+ u odnosu na OKT- pacijente (plazma – p=0,035; likvor – p=0,04; hemolizat – p=0,041).

4.2.8. Koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na učestalost relapsa

Nisu uočene statistički značajne razlike poređenjem vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na učestalost pojave relapsa u RRMS pacijenata (Tabela 9), $p > 0,05$.

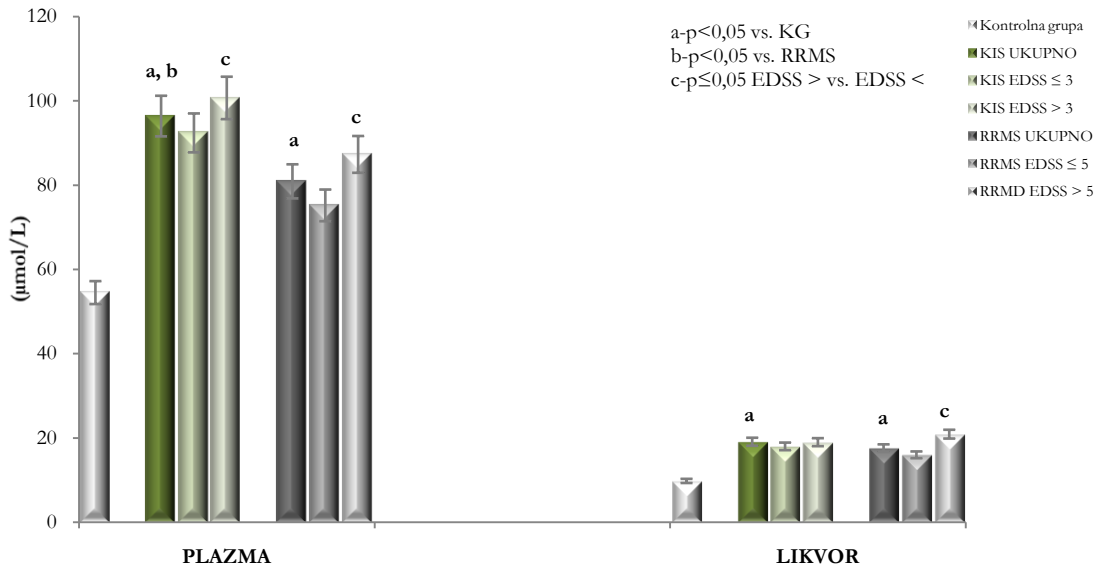
Tabela 9. Vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na učestalost relapsa u RRMS pacijenata

RRMS		
Učestalost relapse (godišnje)	≤ 0.5	> 0.5
NO₂ i NO₃		
(μmol/L plazme)	79,8±8,7	80,4±8,1
(μmol/L likvora)	16,5±3,2	18,3±4
MDA		
(μmol/L plazme)	9,1±1	9,1±1
(μmol/L likvora)	4,15±0,5	4,1±0,3
(μmol/g Hb hemolizata)	0,9±0,1	0,92±0,1
AOPP		
(μmol/L plazme)	76,9±6,1	78,2±6,5
(μmol/L likvora)	37,7±6	38,2±6,7
(μmol/g Hb hemolizata)	1±0,1	1,1±0,12
SH grupe		
(μmol/L plazme)	147,1±12,1	127,3±10,4
(μmol/L likvora)	40,7±6,9	30,5±7
GSH (μmol/g Hb hemolizata)	5,19±0,4	4,9±0,34
SOD		
(U/mL plazme)	2±0,2	2,1±0,2
(U/mL likvora)	0,2±0,03	0,22±0,04
(U/g Hb hemolizata)	1804±325	1883±230

4.2.9. Koncentracije nitrata i nitrita u KIS i RRMS pacijenata

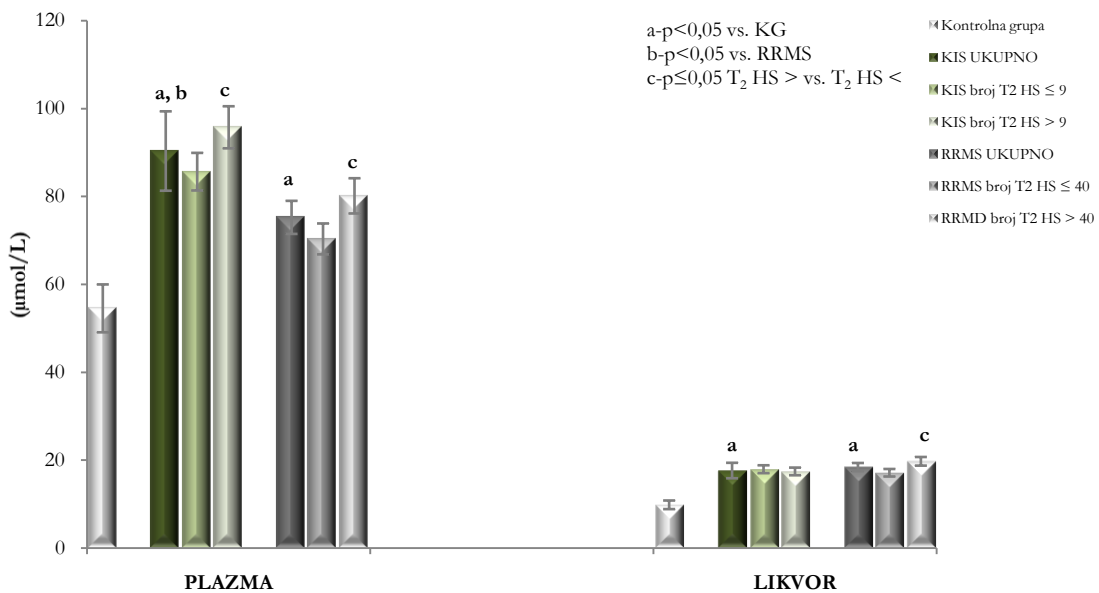
Dobijene vrednosti za NO₂ i NO₃ u plazmi i likvoru (grafikoni 8, 9 i 10), u KIS (plazma – 96,4±10,1 μmol/L; likvor – 19,1±5,5 μmol/L) i RRMS grupi (plazma – 80,9±12,1 μmol/L; likvor – 17,6±5,2 μmol/L), pokazale su statistički značajno više vrednosti u odnosu na KG (plazma – 54,5±9,3 μmol/L; likvor – 9,8±4,2 μmol/L), $p=0,0014$ (KIS vs. KG - plazma), $p=0,0015$ (KIS vs. KG - likvor); $p=0,0019$ (RRMS vs. KG - plazma), $p=0,002$ (RRMS vs. KG - likvor).

Poređenjem dobijenih odnosa koncentracije NO₂ i NO₃ u plazmi u odnosu na koncentraciju NO₂ i NO₃ u likvoru, u KIS i RRMS grupi, nisu uočene statističke značajnosti ($p > 0,05$). Dobijene vrednosti NO₂ i NO₃ koncentracija u plazmi i likvoru, bile su više u KIS u odnosu na RRMS pacijente ($p=0,037$, plazma; $p=0,065$, likvor).



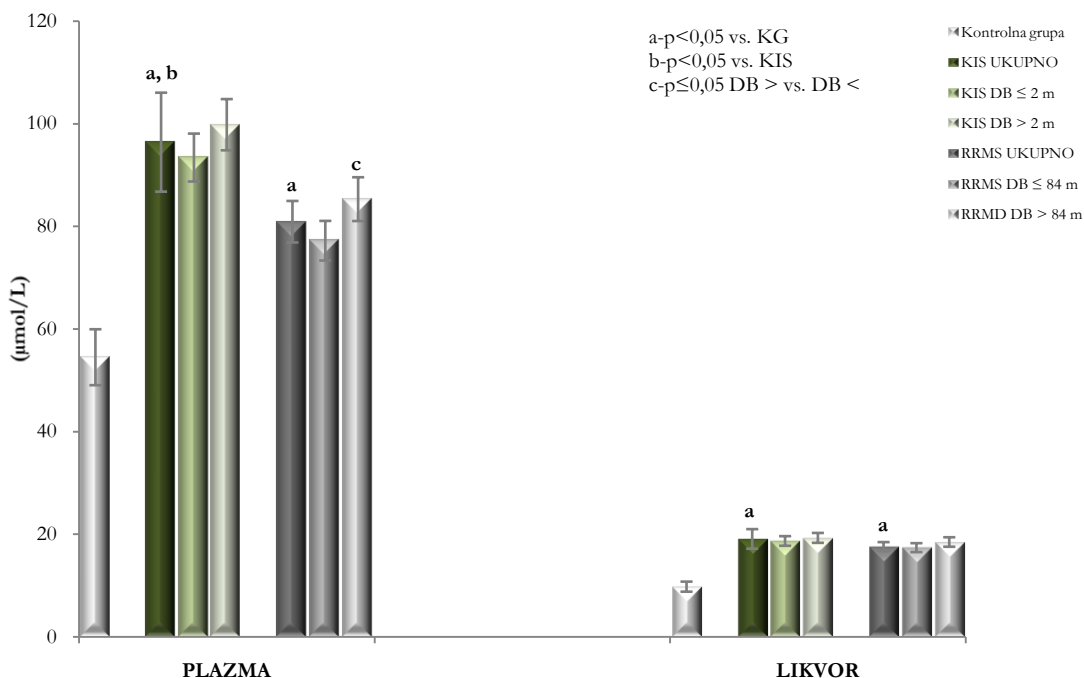
Grafikon 8. Koncentracija NO₂ i NO₃ u odnosu na EDSS

Pacijenti sa većim EDSS (Grafikon 8) imali su više vrednosti NO₂ i NO₃ koncentracija u odnosu na pacijente sa manjim EDSS, i u KIS (plazma – 100,7±15,2 vs. 92,4±9,3 μmol/L (p=0,05); likvor – 19±4,5 vs. 18±4,4 μmol/L (p=0,09)), i u RRMS grupi (plazma – 87,3±15,4 vs. 75,2±10,3 μmol/L (p=0,025); likvor – 20,9±5,5 vs. 16,1±4,4 μmol/L (p=0,04)).



Grafikon 9. Koncentracija NO₂ i NO₃ u odnosu na broj T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu

Dobijene koncentracije NO₂ i NO₃ u KIS i RRMS podgrupama nastalim deljenjem pacijenata u odnosu na ukupan broj T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu, na one sa manjim i one sa većim brojem (Grafikon 9) ukazale su na postojanje razlika, i u KIS (plazma – 95,7±10,5 vs. 85,6±9,5 μmol/L (p=0,05); likvor – 17,4±6,8 vs. 17,9±7,1 μmol/L (p=0,09)), i u RRMS grupi (plazma – 70,3±8,9 vs. 80,1±10,1 μmol/L (p=0,05); likvor – 19,7±5,9 vs. 17,1±5,2 μmol/L (p=0,025)).



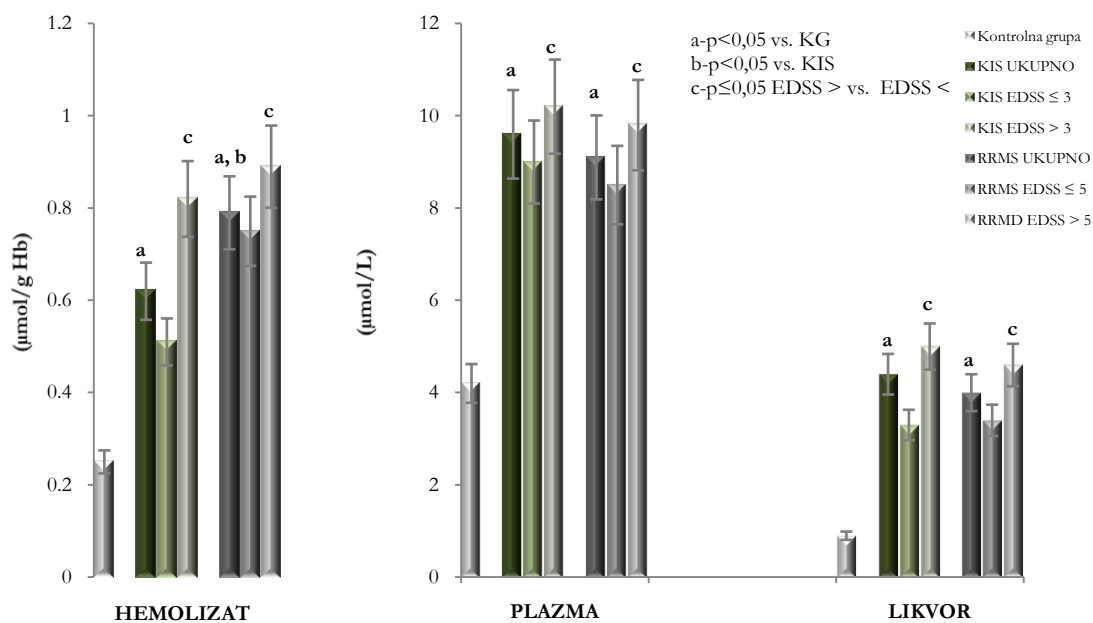
Grafikon 10. Koncentracija NO₂ i NO₃ u odnosu na dužinu trajanja bolesti (tegoba)

Analiza dobijenih vrednosti NO₂ i NO₃, podeljenih u odnosu na dužinu trajanja bolesti (za RRMS grupu), tj dužinu trajanja aktuelnih neuroloških simptoma i znakova (za KIS grupu), na grupu onih sa kraćim i grupu onih sa dužim trajanjem tegoba (Grafikon 10) ukazale su na postojanje viših koncentracija NO₂ i NO₃ u pacijenata sa dužim trajanjem tegoba, kako u KIS (plazma – 99,8±9,5 vs. 93,4±8,5 μmol/L (p=0,06); likvor – 19,3±3,1 vs. 18,7±4,5 μmol/L (p=0,095)), tako i u RRMS grupi (plazma – 85,3±9,9 vs. 77,2±8,1 μmol/L (p=0,05); likvor – 18,5±4,9 vs. 17,4±4,2 μmol/L (p=0,07)).

4.2.10. Koncentracije MDA u KIS i RRMS pacijenata

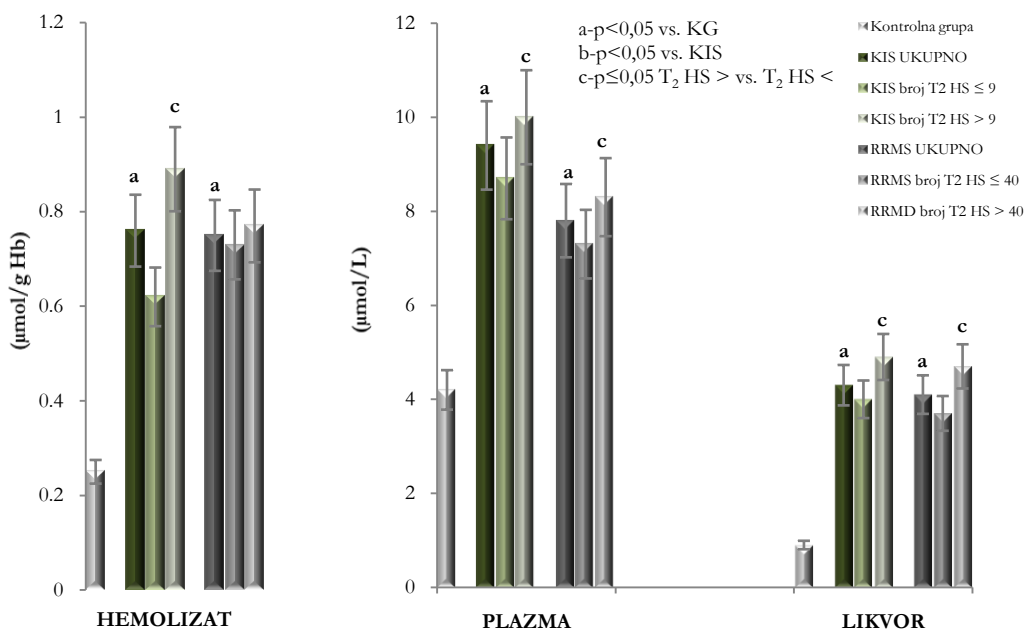
Vrednosti MDA u svim vrstama uzoraka (grafikoni 11, 12 i 13), i u KIS (plazma – $9,6 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/L}$; likvor – $4,4 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/L}$, hemolizat – $0,62 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g Hb}$) i u RRMS grupi (plazma – $9,1 \pm 1$ $\mu\text{mol/L}$; likvor – $4 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$, hemolizat – $0,79 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g Hb}$), pokazale su značajno više vrednosti u odnosu na KG (plazma – $4,2 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/L}$; likvor – $0,9 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/L}$, hemolizat – $0,79 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g Hb}$), $p=0,001$ (KIS vs. KG - plazma), $p=0,001$ (KIS vs. KG - likvor), $p=0,0012$ (KIS vs. KG - hemolizati); $p=0,001$ (RRMS vs. KG - plazma), $p=0,001$ (RRMS vs. KG - likvor), $p=0,0008$ (RRMS vs. KG - hemolizati). Poređenjem dobijenih odnosa koncentracije MDA u plazmi u odnosu na koncentraciju MDA u likvoru, u KIS i RRMS grupi, nije uočeno postojanje statističke značajnosti ($p > 0,05$). Dobijene vrednosti MDA koncentracija u plazmi i likvoru, bile su značajno više u KIS u odnosu na RRMS pacijente ($p=0,075$, plazma; $p=0,08$, likvor), dok su vrednosti MDA koncentracije u hemolizataima bile više u RRMS u poređenju sa KIS grupom ($p=0,039$).

Pacijenti sa većim EDSS (Grafikon 11) imali su više vrednosti MDA koncentracija u svim vrstama uzoraka u odnosu na pacijente sa manjim EDSS, i to kako u KIS (plazma – $10,2 \pm 1,8$ vs. $9 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,04$); likvor – $5 \pm 1,5$ vs. $3,9 \pm 1,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,035$), hemolizat – $0,82 \pm 0,19$ vs. $0,51 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,003$)), tako i u RRMS grupi (plazma – $9,8 \pm 1,7$ vs. $8,5 \pm 1,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,0012$); likvor – $4,6 \pm 1,1$ vs. $3,4 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,05$), hemolizat – $0,89 \pm 0,14$ vs. $0,75 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,0011$)).



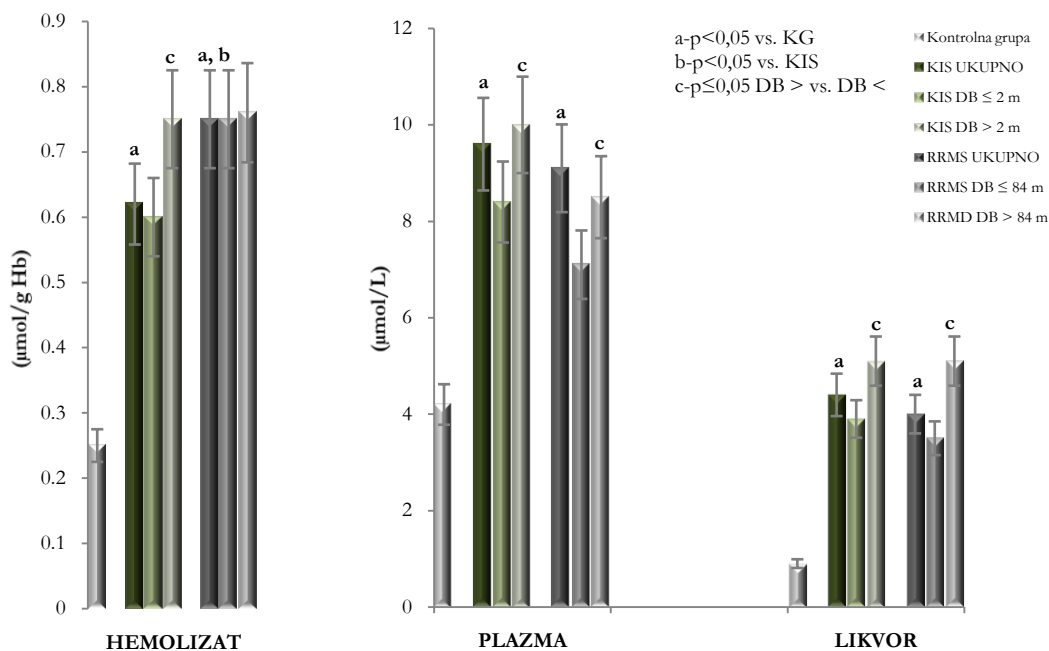
Grafikon 11. Koncentracija MDA u odnosu na EDSS

Analizom koncentracija MDA u KIS i RRMS podgrupama sa manjim u odnosu na one sa većim brojem T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu (Grafikon 12) ukazale su na postojanje viših koncentracija MDA u grupi pacijenata sa većim u odnosu na one sa manjim brojem pomenutih signala, i to kako u KIS (plazma – 10±1,5 vs. 8,7±1,5 μmol/L (p=0,045); likvor – 4,9±1,1 vs. 4±0,8 μmol/L (p=0,05), hemolizat – 0,89±0,14 vs. 0,62±0,11 μmol/g Hb (p=0,025)), tako i u RRMS grupi (plazma – 8,3±1,3 vs. 7,3±1,5 μmol/L (p=0,04); likvor – 4,7±1,3 vs. 3,7±1 μmol/L (p=0,035), hemolizat – 0,77 ±0,12 vs. 0,73±0,14 μmol/g Hb (p=0,12)).



Grafikon 12. Koncentracija MDA u odnosu na broj T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu

Analiza dobijenih vrednosti MDA u podgrupama pacijenata sa kraćim i onih sa dužim trajanjem tegoba (Grafikon 13) ukazale su na postojanje viših koncentracija MDA u pacijenata sa dužim trajanjem bolesti u odnosu na one sa kraćim trajanjem bolesti, i to u svim vrstama uzorak, i u KIS (plazma – 10±2,5 vs. 8,4±1,5 μmol/L (p=0,03); likvor – 5,1±1,1 vs. 3,9±1,2 μmol/L (p=0,035), hemolizat – 0,75±0,1 vs. 0,6±0,09 μmol/g Hb (p=0,037)), i u RRMS grupi (plazma – 8,5±1,9 vs. 7,1±1,3 μmol/L (p=0,035); likvor – 5,1±0,9 vs. 3,5±1,2 μmol/L (p=0,025), hemolizat – 0,76±0,1 vs. 0,75±0,1 μmol/g Hb (p=0,15)).



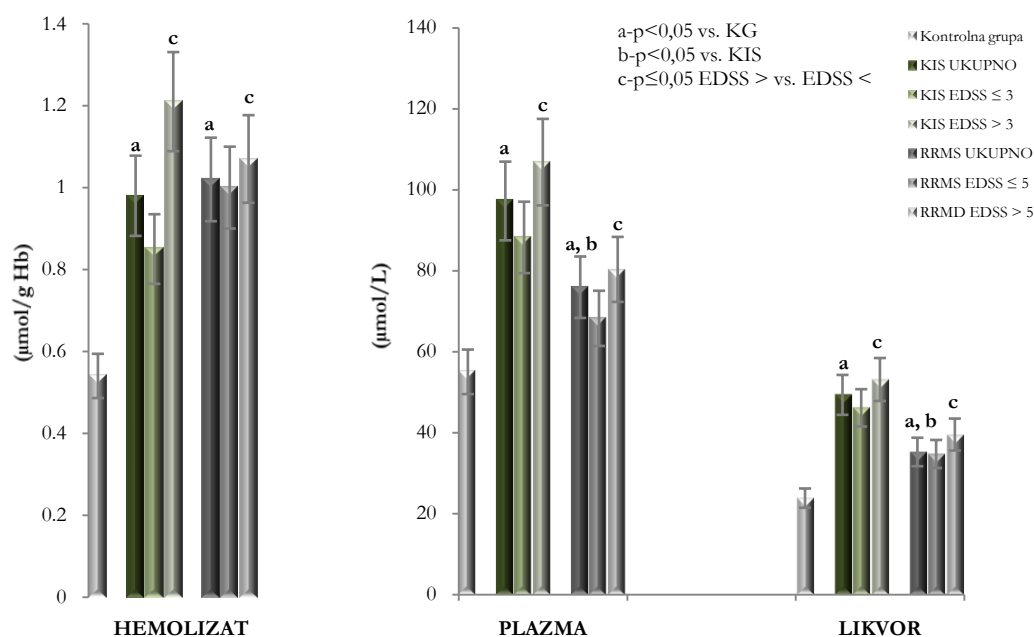
Grafikon 13. Koncentracija MDA u odnosu na dužinu trajanja bolesti (tegoba)

4.2.11. Koncentracije AOPP u KIS i RRMS pacijenata

Dobijene vrednosti za AOPP u svim vrstama uzoraka (grafikoni 14, 15 i 16), u obe grupe, KIS (plazma – $97,2 \pm 17$ μmol/L; likvor – $49,3 \pm 8,5$ μmol/L, hemolizat – $0,98 \pm 0,15$ μmol/g Hb) i RRMS (plazma – $75,9 \pm 15$ μmol/L; likvor – $35,2 \pm 7,2$ μmol/L, hemolizat – $1,02 \pm 0,11$ μmol/g Hb), bile su značajno više u odnosu na vrednosti u KG (plazma – $55 \pm 10,3$ μmol/L; likvor – $23,5 \pm 8$ μmol/L, hemolizat – $0,54 \pm 0,08$ μmol/g Hb), $p=0,001$ (KIS vs. KG - plazma), $p=0,0012$ (KIS vs. KG - likvor), $p=0,001$ (KIS vs. KG - hemolizati); $p=0,005$ (RRMS vs. KG - plazma), $p=0,005$ (RRMS vs. KG - likvor), $p=0,0009$ (RRMS vs. KG - hemolizati). Poređenjem dobijenih odnosa koncentracije AOPP u plazmi u odnosu na koncentraciju AOPP u likvoru, u svakoj od ispitivanih grupa, nisu uočene statističke značajnosti ($p>0,05$). Koncentracije AOPP u plazmi i likvoru bile su značajno više u KIS u odnosu na RRMS pacijente ($p=0,025$, plazma; $p=0,03$, likvor), dok takav trend nije uočen kod vrednosti AOPP u hemolizatima ($p=0,12$).

Pacijenti sa većim EDSS (Grafikon 14) imali su više koncentracije AOPP u svim vrstama uzoraka u odnosu na pacijente sa manjim EDSS, kako u KIS (plazma – $106,8 \pm 17$ vs. $88,2 \pm 12,3$ μmol/L ($p=0,001$); likvor – $53,1 \pm 6,5$ vs. $46,1 \pm 7,4$ μmol/L ($p=0,04$), hemolizat – $1,21 \pm 0,15$ vs. $0,85 \pm 0,07$ μmol/g Hb ($p=0,028$)), tako i u RRMS grupi (plazma – $106,8 \pm 17$ vs. $88,2 \pm 12,3$ μmol/L

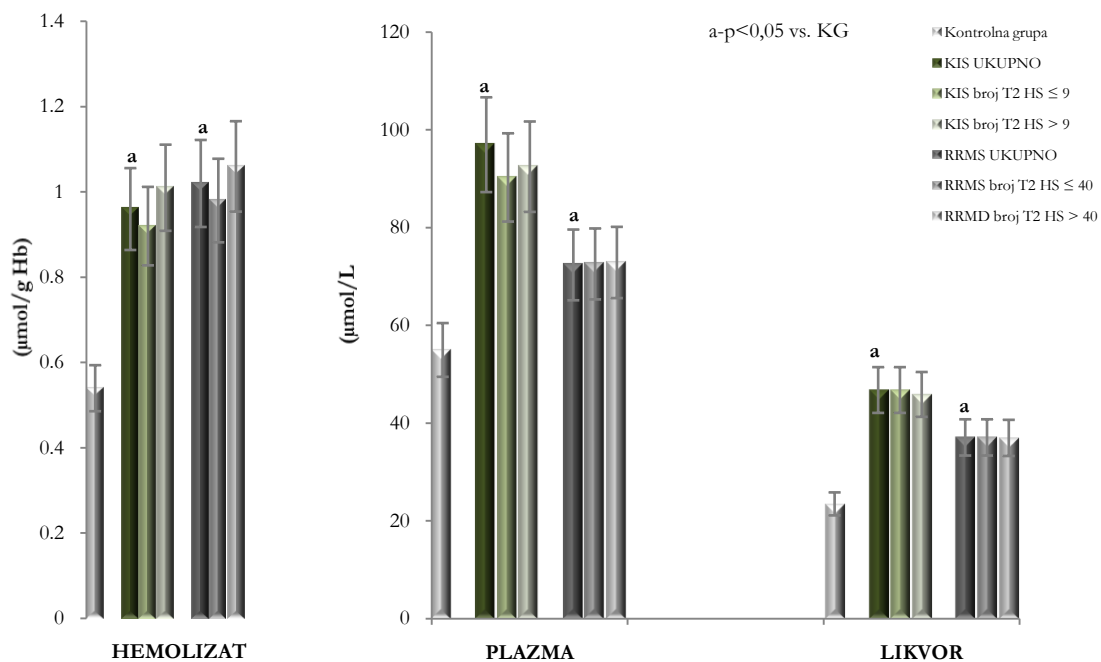
($p=0,001$); likvor – $53,1\pm 6,5$ vs. $46,1\pm 7,4$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,04$), hemolizat – $1,21\pm 0,15$ vs. $0,85\pm 0,07$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,0015$)).



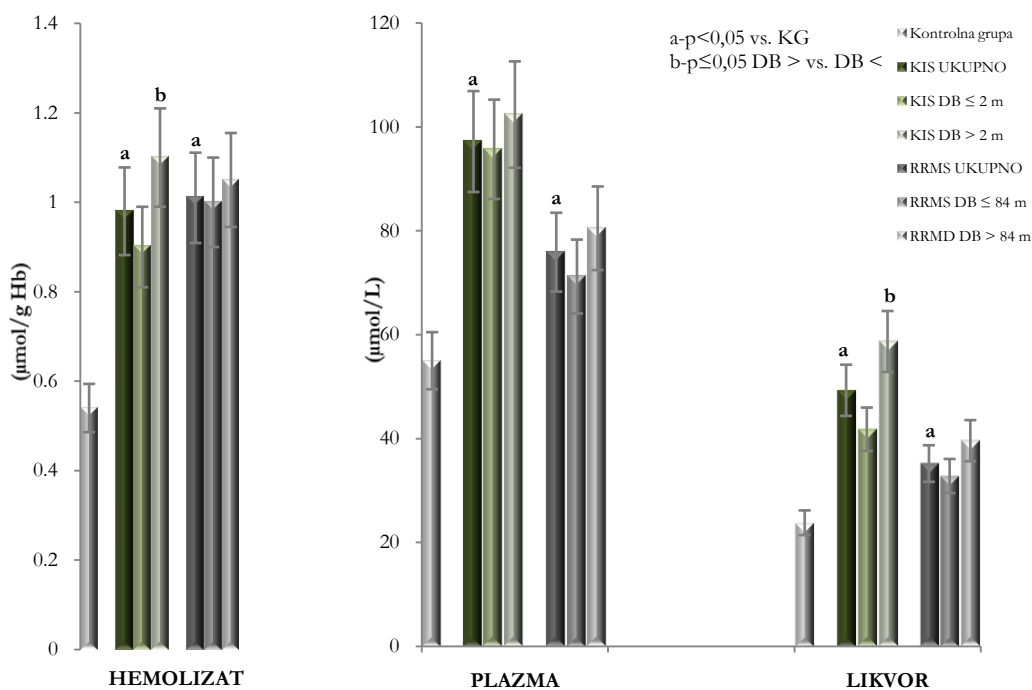
Grafikon 14. Koncentracija AOPP u u odnosu na EDSS

Vrednosti AOPP u KIS i RRMS podgrupama nastalim deljenjem pacijenata u odnosu na ukupan broj T_2 hiperintenzivnih signala u mozgu, na one sa manjim i one sa većim brojem (Grafikon 15) nisu ukazale na statističku značajnost, ni u KIS (plazma – $92,5\pm 9,5$ vs. $90,3\pm 8,5$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,08$); likvor – $45,9\pm 10$ vs. $46,8\pm 8,1$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,09$), hemolizat – $1,01\pm 0,1$ vs. $0,92\pm 0,07$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,071$)), ni u RRMS grupi (plazma – $72,9\pm 13,9$ vs. $72,6\pm 15,1$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,09$); likvor – $37\pm 7,9$ vs. $37,1\pm 9,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,09$), hemolizat – $1,06\pm 0,1$ vs. $0,98\pm 0,11$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,08$)).

Analiza dobijenih vrednosti AOPP u svim medijumima, podeljenih u odnosu na dužinu trajanja bolesti (za RRMS grupu), tj dužinu trajanja aktuelnih neuroloških simptoma i znakova (za KIS grupu), na grupu onih sa kraćim i grupu onih sa dužim trajanjem tegoba (Grafikon 16) ukazale su na postojanje viših koncentracija AOPP u pacijenata sa dužim trajanjem bolesti, i u KIS (plazma – $102,4\pm 17,5$ vs. $95,7\pm 8,5$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,07$); likvor – $58,7\pm 10,1$ vs. $41,8\pm 8,5$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,03$), hemolizat – $1,1\pm 0,1$ vs. $0,9\pm 0,09$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,013$)), i u RRMS grupi (plazma – $80,5\pm 11,9$ vs. $71,2\pm 13,1$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,065$); likvor – $39,6\pm 8,9$ vs. $32,8\pm 7,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,06$), hemolizat – $1,05\pm 0,1$ vs. $1\pm 0,11$ $\mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,081$)).



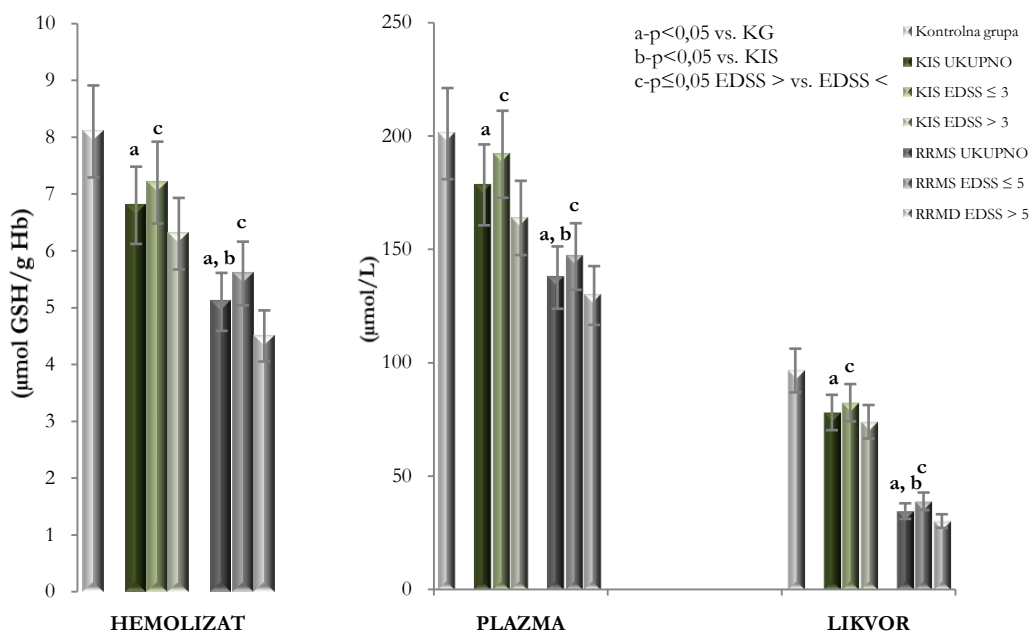
Grafikon 15. Koncentracija AOPP u u odnosu na broj T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu



Grafikon 16. Koncentracija AOPP u odnosu na dužinu trajanja bolesti (tegoba)

4.2.12. Koncentracije SH grupa u KIS i RRMS pacijenata

Dobijene vrednosti za SH grupe u ispitivanim uzorcima (grafikoni 17, 18 i 19), u KIS (plazma – $178,4 \pm 15 \mu\text{mol/L}$; likvor – $78 \pm 10 \mu\text{mol/L}$, hemolizat – $6,82 \pm 0,5 \mu\text{mol/g Hb}$), i u RRMS grupi (plazma – $137,5 \pm 16,1 \mu\text{mol/L}$; likvor – $34,5 \pm 6,8 \mu\text{mol/L}$, hemolizat – $5,15 \pm 0,7 \mu\text{mol/g Hb}$), ukazale su na nižu koncentraciju SH grupa u odnosu na vrednosti u KG (plazma – $201 \pm 23 \mu\text{mol/L}$; likvor – $96,5 \pm 10,5 \mu\text{mol/L}$, hemolizat – $8,1 \pm 0,8 \mu\text{mol/g Hb}$), $p=0,02$ (KIS vs. KG - plazma), $p=0,03$ (KIS vs. KG - likvor), $p=0,0025$ (KIS vs. KG - hemolizat); $p=0,004$ (RRMS vs. KG - plazma), $p=0,003$ (RRMS vs. KG - likvor), $p=0,0007$ (RRMS vs. KG - hemolizat). Poređenjem dobijenih odnosa koncentracije SH u plazmi u odnosu na koncentraciju SH u likvoru u RRMS grupi dobijena je statistički značajna razlika u poređenju sa KIS grupom ($p < 0,05$). Koncentracija SH grupa u plazmi, likvoru i hemolizatu, bile su značajno više u KIS u odnosu na RRMS pacijente ($p=0,015$, plazma; $p=0,005$, likvor; $p=0,009$, hemolizat).

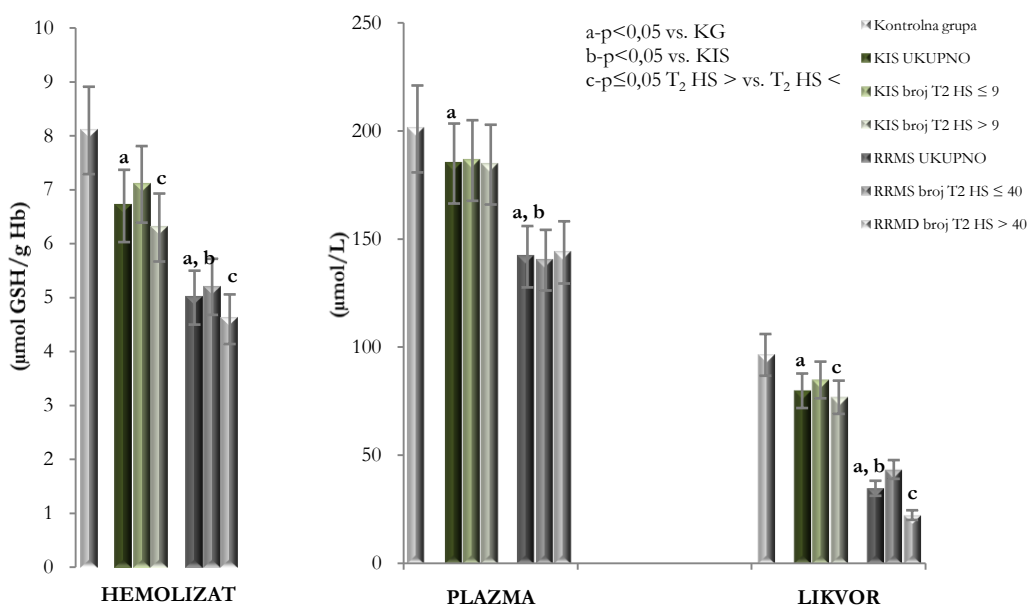


Grafikon 17. Koncentracija SH grupa u odnosu na EDSS

Pacijenti sa većim EDSS (Grafikon 17) imali su niže vrednosti SH koncentracija (GSH u hemolizatu) u odnosu na pacijente sa manjim EDSS, i u KIS (plazma – $163,8 \pm 15$ vs. $191,9 \pm 14 \mu\text{mol/L}$ ($p=0,002$); likvor – $73,9 \pm 10,4$ vs. $82,3 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ ($p=0,045$), hemolizat – $6,34 \pm 0,5$ vs. $7,22 \pm 0,35 \mu\text{mol/g Hb}$ ($p=0,018$)), i u RRMS grupi (plazma – $129,6 \pm 17,2$ vs. $146,8 \pm 15,1 \mu\text{mol/L}$

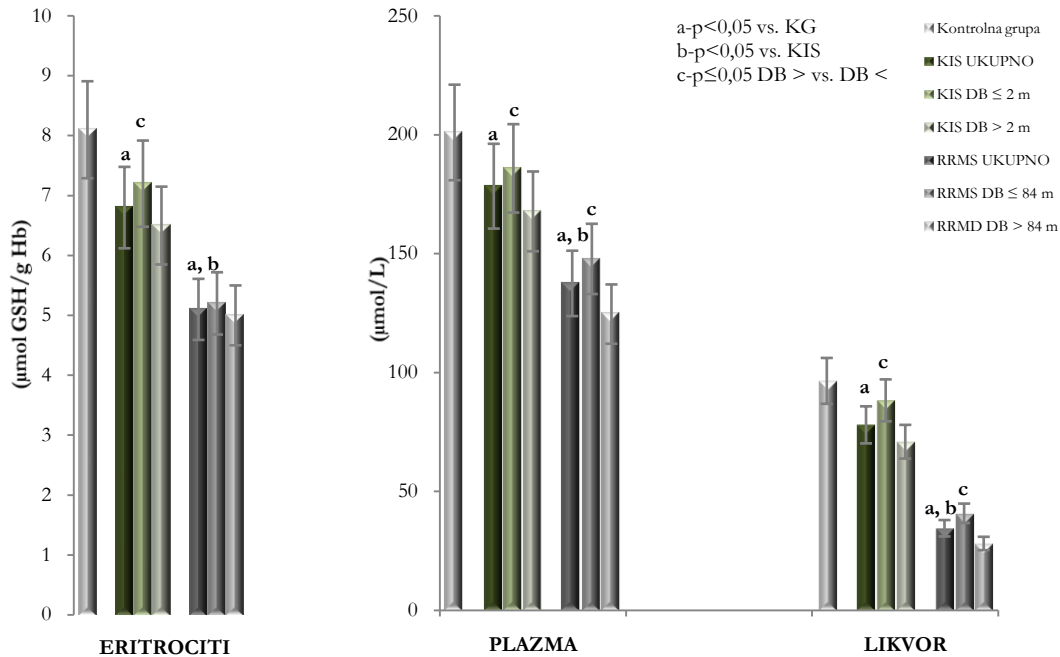
($p=0,01$); likvor – $30,1\pm 8$ vs. $38,8\pm 4,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,04$), hemolizat – $4,59\pm 0,7$ vs. $5,6\pm 0,7$ $\mu\text{mol/g}$ Hb ($p=0,012$)).

Poređenjem koncentracija SH grupa (GSH u hemolizatu) u KIS i RRMS podgrupama sa manjim i onih sa većim brojem T_2 hiperintenzivnih signala u mozgu (Grafikon 18) ukazale su na postojanje razlika, i u KIS (plazma – $186,4\pm 10,2$ vs. $184,5\pm 13,8$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,8$); likvor – $84,9\pm 8,7$ vs. $76,9\pm 7,7$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,05$), hemolizat – $7,05\pm 0,27$ vs. $6,3\pm 0,17$ $\mu\text{mol/g}$ Hb ($p=0,023$)), i u RRMS grupi (plazma – $140,3\pm 10,2$ vs. $143,9\pm 13$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,9$); likvor – $43,5\pm 8,1$ vs. $22,4\pm 8,9$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,001$), hemolizat – $5,28\pm 0,25$ vs. $4,68\pm 0,31$ $\mu\text{mol/g}$ Hb ($p=0,017$)).



Grafikon 18. Koncentracija SH u u odnosu na broj T_2 hiperintenzivnih signala u mozgu

Analiza dobijenih vrednosti u odnosu na dužinu trajanja bolesti ukazala je na postojanje viših koncentracija SH grupa (GSH u hemolizatu) u pacijenata sa kraćim trajanjem u odnosu na pacijente sa dužim trajanjem bolesti, i u KIS (plazma – $185,9\pm 12,5$ vs. $167,8\pm 18,5$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,05$); likvor – $88,3\pm 8,1$ vs. $70,9\pm 8,5$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,025$), hemolizat – $7,2\pm 1,2$ vs. $6,5\pm 0,9$ $\mu\text{mol/g}$ Hb ($p=0,029$)), i u RRMS grupi (plazma – $147,8\pm 12,9$ vs. $124,6\pm 12,1$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,005$); likvor – $40,8\pm 5,9$ vs. $28,1\pm 7,2$ $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,032$), hemolizat – $5,2\pm 0,9$ vs. 5 ± 1 $\mu\text{mol/g}$ Hb ($p=0,073$)), Grafikon 19.



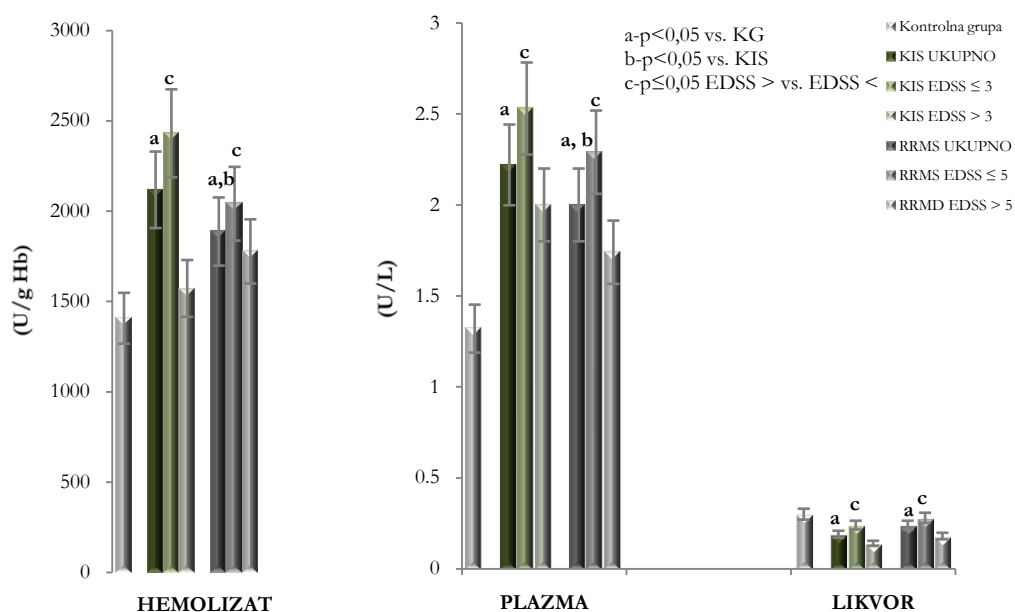
Grafikon 19. Koncentracija SH u odnosu na dužinu trajanja bolesti (tegoba)

4.2.13. Aktivnost SOD u KIS i RRMS pacijenata

Aktivnosti SOD u plazmi i hemolizatu (grafikoni 20, 21 i 22), i u KIS (plazma – $2,22 \pm 0,4$ U/mL; hemolizat - 2118 ± 357 U/g Hb) i u RRMS grupi (plazma – $2,02 \pm 1,6$ U/mL; hemolizat - 1887 ± 410 U/g Hb), ukazale su na značajno više vrednosti u odnosu na KG (plazma – $1,32 \pm 0,5$ U/mL; hemolizat - 1407 ± 250 u/g Hb), $p=0,003$ (KIS vs. KG - plazma), $p=0,002$ (KIS vs. KG - hemolizat); $p=0,0013$ (RRMS vs. KG - plazma), $p=0,009$ (RRMS vs. KG - hemolizati). Aktivnost SOD beležila je pad vrednosti u likvoru i u KIS ($0,19 \pm 0,09$ U/mL) i RRMS grupi ($0,24 \pm 0,08$ U/mL), u odnosu na KG ($0,30 \pm 0,07$ U/mL), $p=0,025$ (KIS vs. KG), $p=0,034$ (RRMS vs. KG). Poređenjem dobijenih odnosa aktivnosti SOD u plazmi u odnosu na aktivnost SOD u likvoru, u KIS i RRMS grupi, nije uočeno postojanje statistički značajnih razlika ($p > 0,05$). Aktivnost SOD u plazmi i hemolizatima bile su više u KIS u odnosu na RRMS pacijente ($p=0,056$, plazma; $p=0,02$, hemolizat), dok su vrednosti SOD aktivnosti u likvoru bile više u RRMS u poređenju sa KIS grupom ($p=0,08$).

Pacijenti sa većim EDSS (Grafikon 20) imali su nižu SOD aktivnost u svim vrstama uzoraka u odnosu na pacijente sa manjim EDSS, i to kako u KIS (plazma – $2 \pm 1,5$ vs. $2,53 \pm 0,26$ U/mL ($p=0,042$); likvor – $0,14 \pm 0,9$ vs. $0,24 \pm 0,1$ U/mL ($p=0,02$), hemolizat – 1572 ± 266 vs. 2431 ± 350 U/g Hb ($p=0,001$)), tako i u RRMS grupi (plazma – $1,74 \pm 0,9$ vs. $2,29 \pm 1,1$ U/mL ($p=0,04$); likvor –

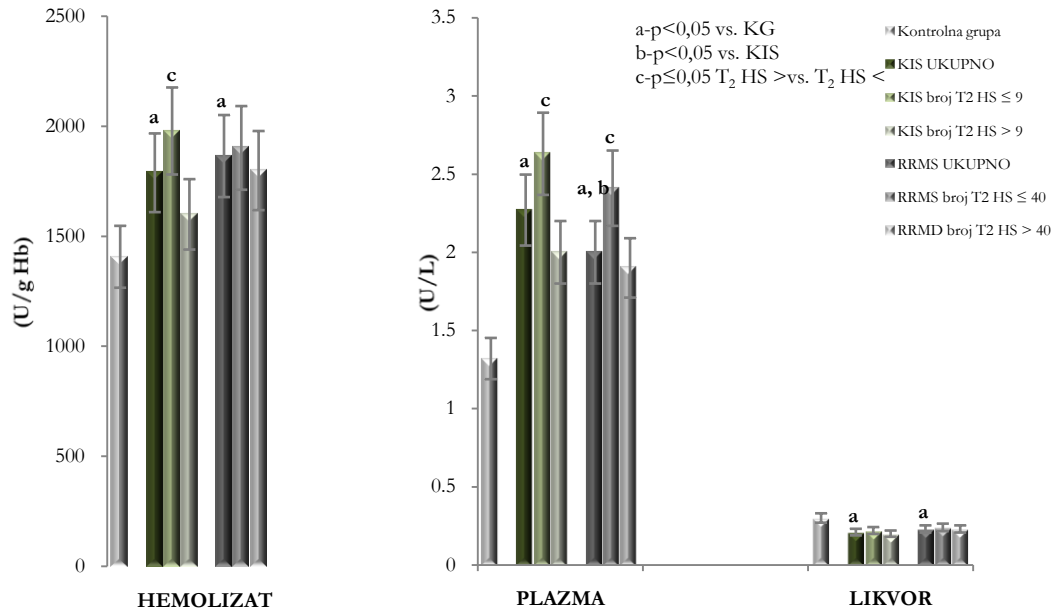
0,18±0,05 vs. 0,28±0,08 U/mL ($p=0,015$), hemolizat – 1777±265 vs. 2042±312 U/g Hb ($p=0,023$)).



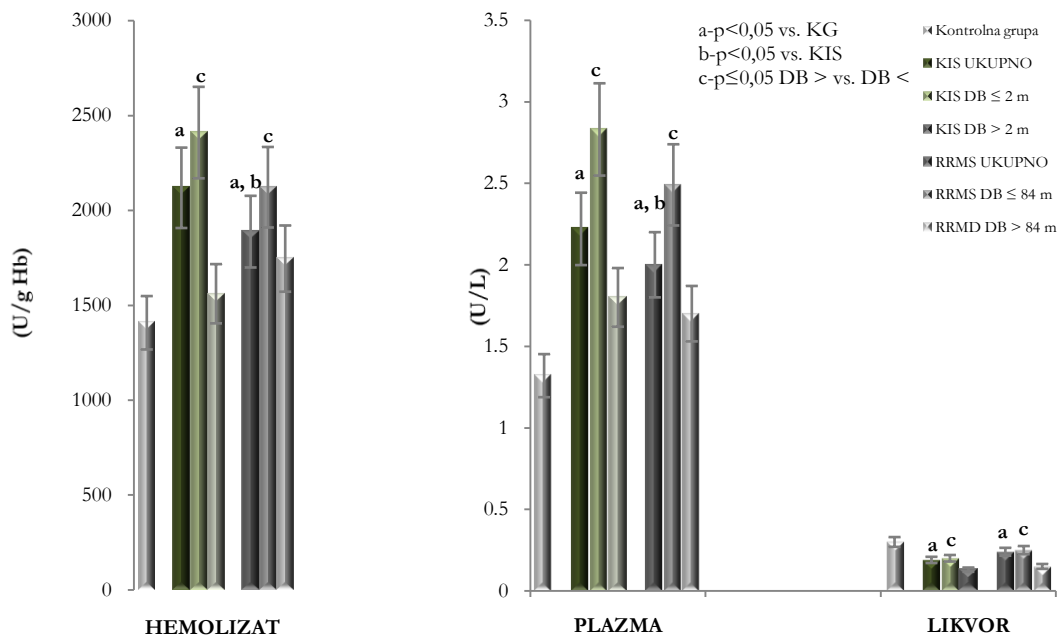
Grafikon 20. Aktivnost SOD u odnosu na EDSS

Poređenjem aktivnosti SOD u KIS i RRMS podgrupama sa manjim u odnosu na one sa većim brojem T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu (Grafikon 21) ukazale su na postojanje viših aktivnosti SOD u grupi pacijenata sa manjim u odnosu na one sa većim brojem pomenutih signala, i to kako u KIS (plazma – 2,64±1,2 vs. 2±0,8 U/mL ($p=0,042$); likvor – 0,22±0,07 vs. 0,20±0,09 U/mL ($p=0,85$), hemolizat – 1979±212 vs. 1600±208 U/g Hb ($p=0,009$)), tako i u RRMS grupi (plazma – 2,41±1,1 vs. 1,9±0,8 U/mL ($p=0,03$); likvor – 0,24±0,08 vs. 0,23±0,07 U/mL ($p=0,95$), hemolizat – 1902±211 vs. 1799±195 U/g Hb ($p=0,061$)).

Analiza dobijenih vrednosti SOD u podgrupama pacijenata sa kraćim i onih sa dužim trajanjem tegoba (Grafikon 22) ukazale su na postojanje viših aktivnosti SOD u pacijenata sa kraćim trajanjem bolesti u odnosu na one s dužim trajanjem bolesti, i to u svim vrstama uzoraka, i u KIS (plazma – 2,83±1 vs. 1,8±0,8 U/mL ($p=0,022$); likvor – 0,2±0,09 vs. 0,13±0,09 U/mL ($p=0,045$), hemolizat – 2409±202 vs. 1560±158 U/g Hb ($p=0,0005$)), i u RRMS grupi (plazma – 2,49±1,1 vs. 1,7±0,9 U/mL ($p=0,037$); likvor – 0,25±0,09 vs. 0,15±0,07 U/mL ($p=0,01$), hemolizat – 2121±192 vs. 1745±150 U/g Hb ($p=0,002$)).



Grafikon 21. Aktivnost SOD u odnosu na broj T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu



Grafikon 22. Aktivnost SOD u odnosu na dužinu trajanja bolesti (tegoba)

4.2.14. Korelacije kliničkog i radiološkog nalaza i dužine trajanja tegoba

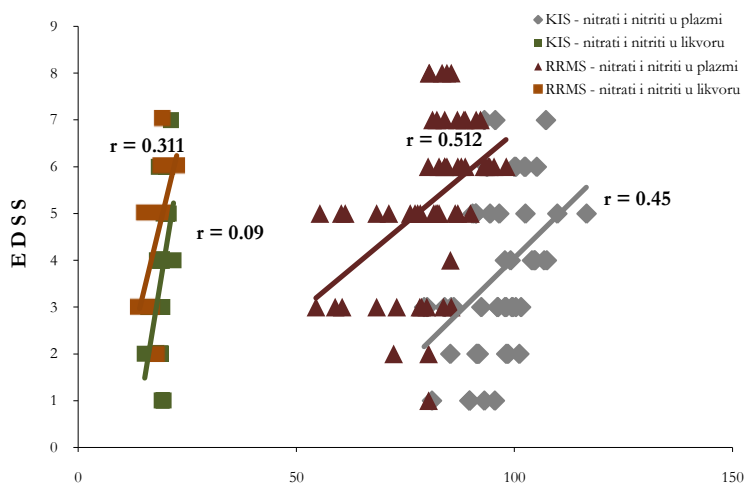
U obe ispitivane grupe, uočeno je postojanje pozitivne korelacije između EDSS vrednosti i ukupnog broja T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu, $r=0,41$; $p=0,009$ (KIS), $r=0,52$; $p=0,007$ (RRMS).

Pozitivna korelacija uočena je između EDSS vrednosti i dužine trajanja aktuelnih tegoba (KIS) odnosno dužine trajanja bolesti (RRMS), $r=0,51$; $p=0,002$ (KIS), $r=0,61$; $p=0,001$ (RRMS). Pozitivna korelacija uočena je i između broja T₂ hiperintenzivnih signala u mozgu i dužine trajanja tegoba, $r=0,48$; $p=0,008$ (KIS), $r=0,68$; $p=0,003$ (RRMS).

Poređenjem volumena Gd-vezujućih lezija viđenih na T₁ sekvenci i dužine trajanja tegoba nisu uočene statistički značajne korelacije, $r=0,11$; $p=0,096$ (KIS), $r=0,12$; $p=0,2$ (RRMS). Takođe, poređenjem EDSS vrednosti sa volumenom T₁ Gd-vezujućih lezija u mozgu, nisu dobijene statistički značajne korelacije, $r=0,21$; $p=0,085$ (KIS), $r=0,18$; $p=0,09$ (RRMS).

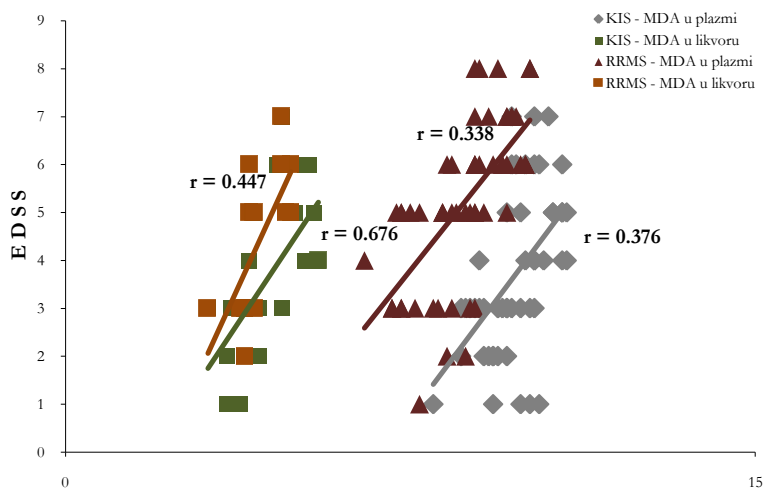
4.2.15. Korelacije ispitivanih parametara i kliničkog nalaza

Uočeno je postojanje pozitivnih korelacija različite statističke značajnosti, između EDSS i koncentracija NO₂ i NO₃ u plazmi i likvoru (Grafikon 23), i u KIS ($r=0,45$, $p=0,023$ (plazma); $r=0,09$, $p=0,81$ (likvor)) i u RRMS grupi ($r=0,512$, $p=0,01$ (plazma); $r=0,311$, $p=0,04$ (likvor)).



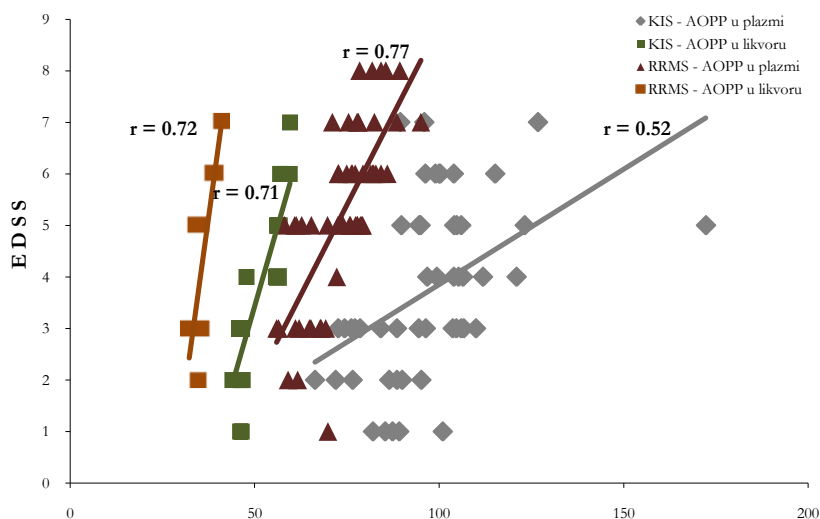
Grafikon 23. Korelacija vrednosti NO₂ i NO₃ u plazmi i likvoru i EDSS

Testiranjem korelacije koncentracija MDA i EDSS (Grafikon 24), dobijeni su rezultati koji ukazuju na postojanje pozitivne korelacije ovih varijabli, i to kako u KIS ($r=0,376$, $p=0,009$ (plazma); $r=0,676$, $p=0,001$ (likvor); $r=0,39$, $p=0,007$ (hemolizat)), tako i u RRMS grupi ($r=0,338$, $p=0,021$ (plazma); $r=0,447$, $p=0,009$ (likvor); $r=0,42$, $p=0,005$ (hemolizat)).



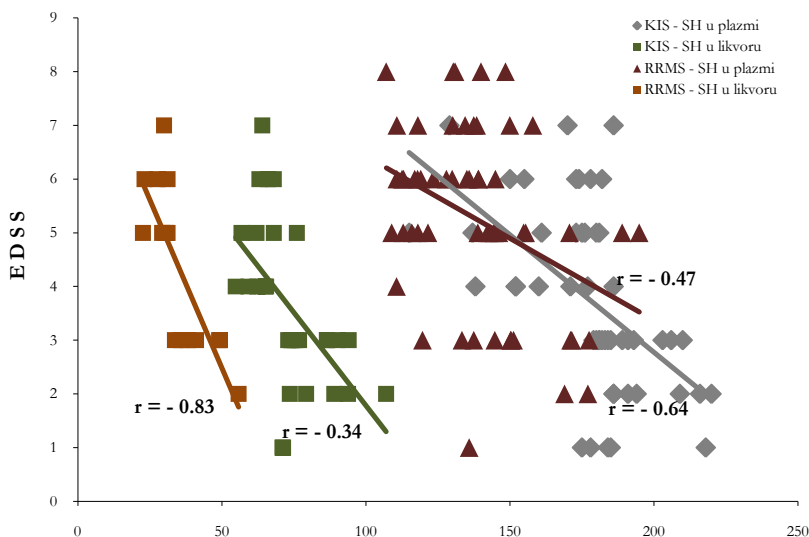
Grafikon 24. Korelacija vrednosti MDA u plazmi i likvoru i EDSS

Pozitivna korelacija takođe je uočena između koncentracije AOPP i EDSS (Grafikon 25), i u KIS ($r=0,52$, $p=0,001$ (plazma); $r=0,71$, $p=0,0005$ (likvor); $r=0,47$, $p=0,003$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=0,77$, $p=0,007$ (plazma); $r=0,72$, $p=0,006$ (likvor); $r=0,14$, $p=0,083$ (hemolizat)).



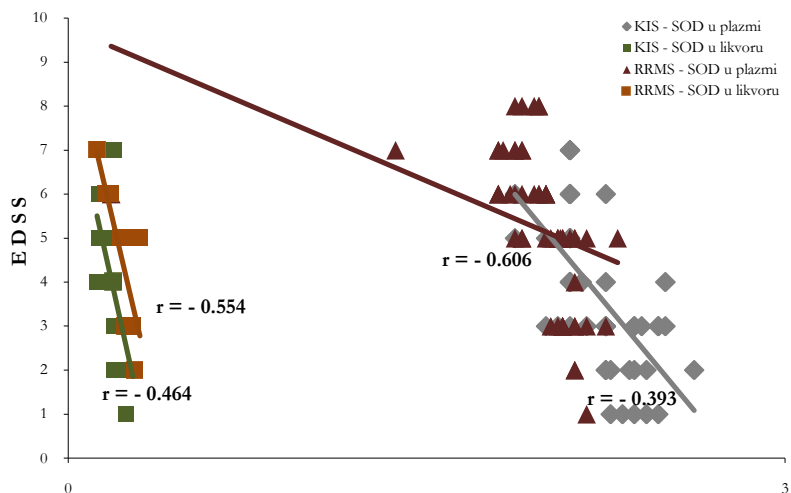
Grafikon 25. Korelacija vrednosti AOPP u plazmi i likvoru i EDSS

Suprotno prethodnom, uočena je negativna korelacija koncentracije SH grupa i EDSS (Grafikon 26), i u KIS ($r=-0,64$, $p=0,008$ (plazma); $r=-0,34$, $p=0,0095$ (likvor); $r=-0,513$, $p=0,004$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,47$, $p=0,0085$ (plazma); $r=-0,83$, $p=0,006$ (likvor); $r=-0,498$, $p=0,004$ (hemolizat)).



Grafikon 26. Korelacija vrednosti SH grupa u plazmi i likvoru i EDSS

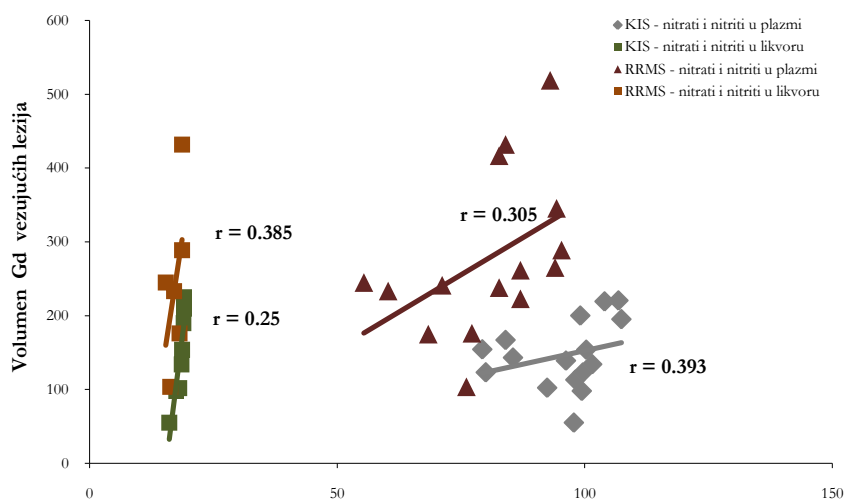
Takođe, negativna korelacija dobijena je prilikom ispitivanja povezanosti aktivnosti SOD i EDSS (Grafikon 27), u KIS ($r=-0,393$, $p=0,01$ (plazma); $r=-0,464$, $p=0,005$ (likvor); $r=-0,61$, $p=0,004$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,606$, $p=0,008$ (plazma); $r=-0,554$, $p=0,009$ (likvor); $r=-0,52$, $p=0,007$ (hemolizat)).



Grafikon 27. Korelacija aktivnosti SOD u plazmi i likvoru i EDSS

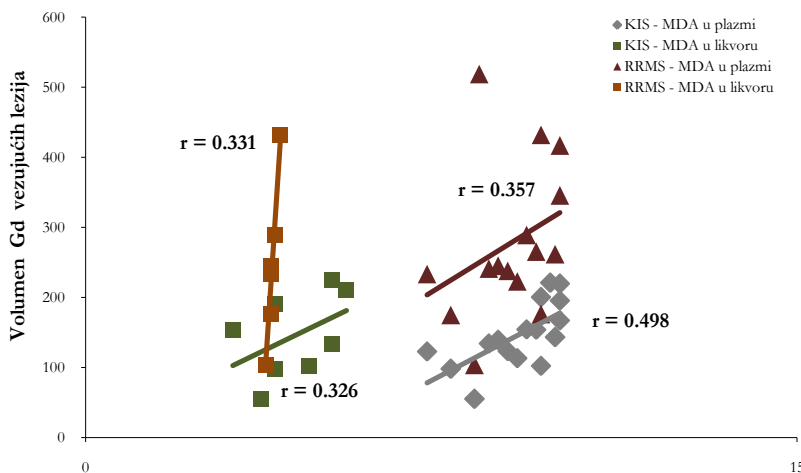
4.2.16. Korelacije ispitivanih parametara i radiološkog nalaza

Analizom povezanosti dobijenih koncentracija za NO_2 i NO_3 u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija u mozgu viđenih na T_1 sekvenci (Grafikon 28), uočena je selektivno značajna pozitivna korelacija, u obe ispitivane grupe, i u KIS ($r=0,393$, $p=0,03$ (plazma); $r=0,25$, $p=0,042$ (likvor)) i u RRMS grupi ($r=0,385$, $p=0,023$ (plazma); $r=0,305$, $p=0,04$ (likvor)).



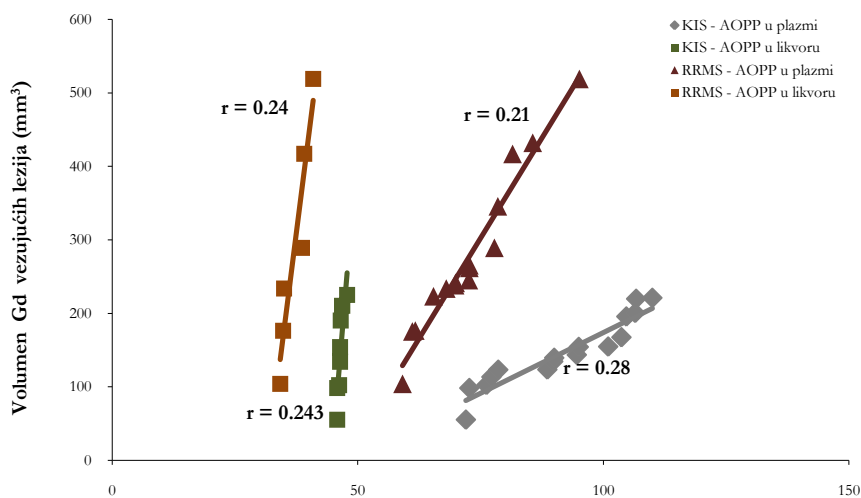
Grafikon 28. Korelacija vrednosti NO_2 i NO_3 u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija

Testiranjem korelacija dobijenih koncentracija za MDA i radiološkog nalaza (Grafikon 29), dobijeni su rezultati koji ukazuju na postojanje pozitivne korelacije, u KIS ($r=0,498$, $p=0,01$ (plazma); $r=0,326$, $p=0,009$ (likvor); $r=0,37$, $p=0,003$ (hemolizat)), i u RRMS grupi ($r=0,357$, $p=0,03$ (plazma); $r=0,331$, $p=0,049$ (likvor); $r=0,18$, $p=0,079$ (hemolizat)).



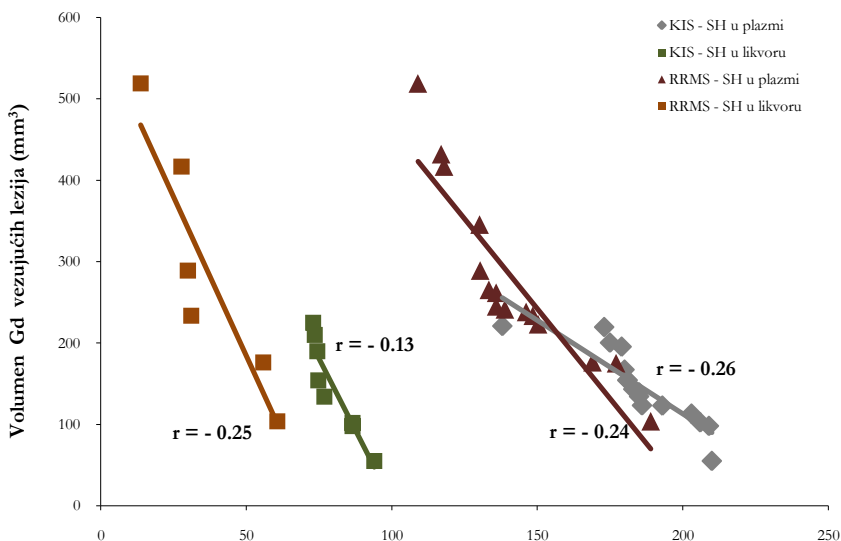
Grafikon 29. Korelacija vrednosti MDA u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija

Testiranjem povezanosti promena koncentracije AOPP i volumena Gd-vezujućih lezija u mozgu (Grafikon 30), dobijena je slaba korelacija testiranih varijabli, i u KIS ($r=0,28$, $p=0,07$ (plazma); $r=0,243$, $p=0,066$ (likvor); $r=0,18$, $p=0,067$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=0,21$, $p=0,065$ (plazma); $r=0,24$, $p=0,07$ (likvor); $r=0,15$, $p=0,075$ (hemolizat)).



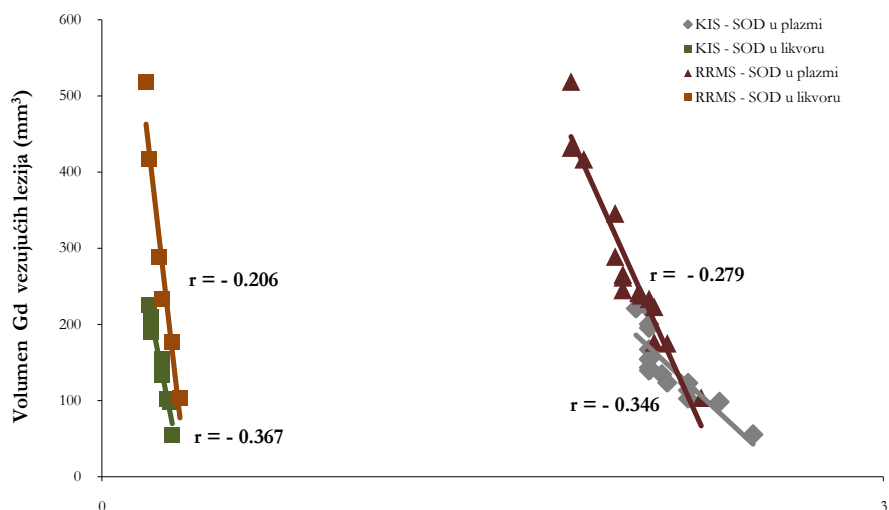
Grafikon 30. Korelacija vrednosti AOPP u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija

Takođe, slaba povezanost je uočena i između promena koncentracije SH grupa i volumena Gd-vezujućih lezija u mozgu (Grafikon 31), u KIS ($r=-0,26$, $p=0,06$ (plazma); $r=-0,13$, $p=0,756$ (likvor); $r=-0,351$, $p=0,008$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,24$, $p=0,085$ (plazma); $r=-0,25$, $p=0,057$ (likvor); $r=-0,454$, $p=0,005$ (hemolizat)).



Grafikon 31. Korelacija vrednosti SH grupa u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija

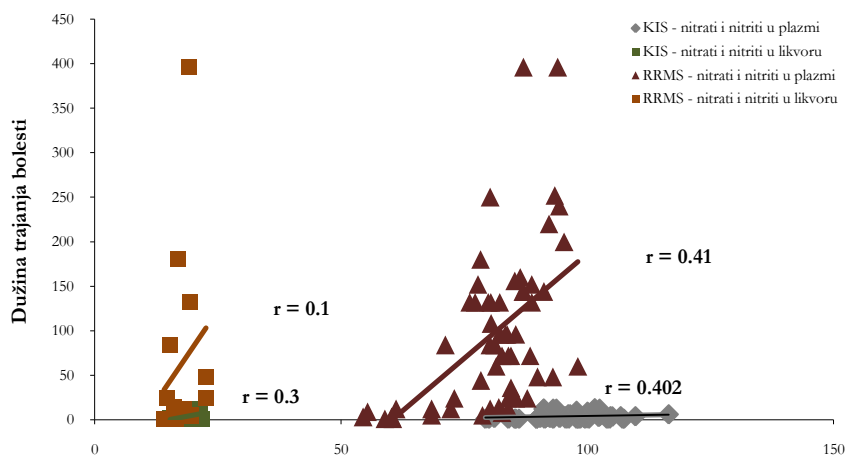
Prilikom ispitivanja povezanosti promene aktivnosti SOD i volumena Gd-vezujućih lezija u mozgu (Grafikon 32), potvrđena je negativna linearna povezanost, i u KIS ($r=-0,346$, $p=0,01$ (plazma); $r=-0,367$, $p=0,021$ (likvor); $r=-0,42$, $p=0,004$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,279$, $p=0,052$ (plazma); $r=-0,206$, $p=0,075$ (likvor); $r=-0,14$, $p=0,064$ (hemolizat)).



Grafikon 32. Korelacija aktivnosti SOD u plazmi i likvoru i volumena Gd-vezujućih lezija

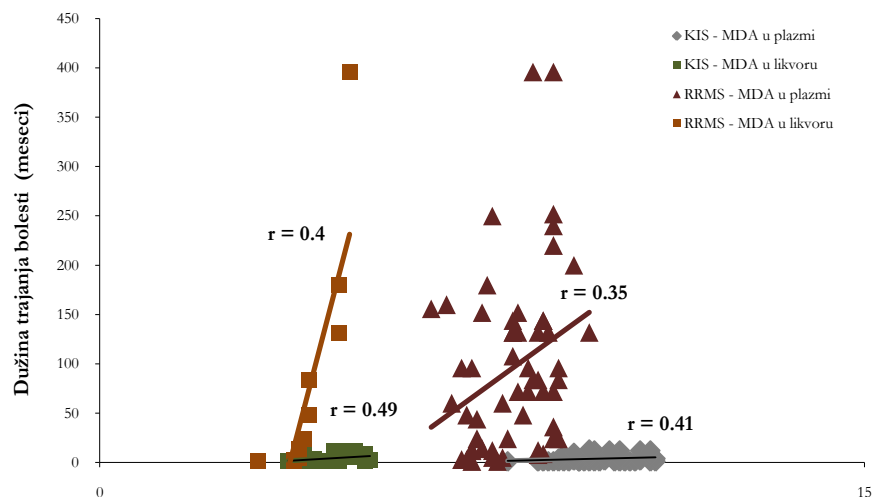
4.2.17. Korelacije ispitivanih parametara i dužine trajanja tegoba

Analizom povezanosti dobijenih koncentracija za NO_2 i NO_3 u plazmi i likvoru i dužine trajanja aktuelnih tegoba (KIS grupa), odnosno dužine trajanja bolesti (RRMS) (Grafikon 33), uočena je pozitivna korelacija, i u KIS ($r=0,402$, $p=0,0015$ (plazma); $r=0,1$, $p=0,5$ (likvor)) i u RRMS grupi ($r=0,41$, $p=0,02$ (plazma); $r=0,3$, $p=0,05$ (likvor)).



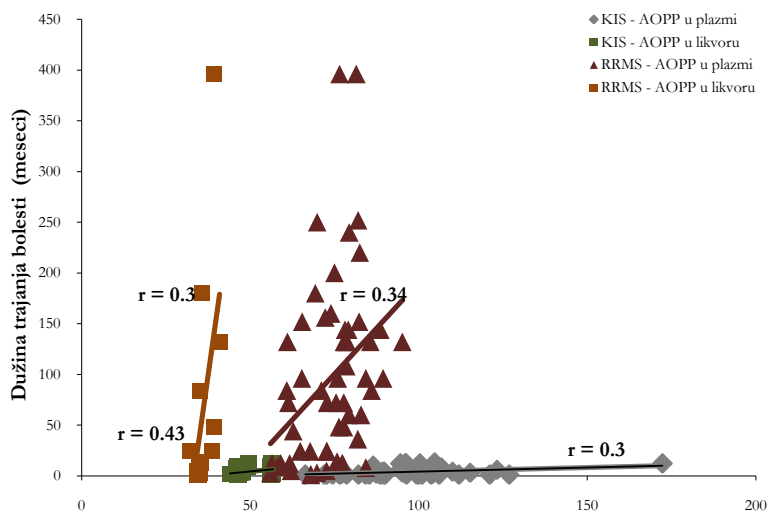
Grafikon 33. Korelacija vrednosti NO_2 i NO_3 u plazmi i likvoru i dužine trajanja tegoba

Takođe, uočeno je postojanje pozitivne korelacije između dobijenih koncentracija MDA i dužine trajanja tegoba (bolesti) (Grafikon 34), i u KIS ($r=0,41$, $p=0,02$ (plazma); $r=0,49$, $p=0,015$ (likvor); $r=0,47$, $p=0,008$ (hemolizat)), i u RRMS grupi ($r=0,35$, $p=0,04$ (plazma); $r=0,4$, $p=0,02$ (likvor); $r=0,12$, $p=0,079$ (hemolizat)).



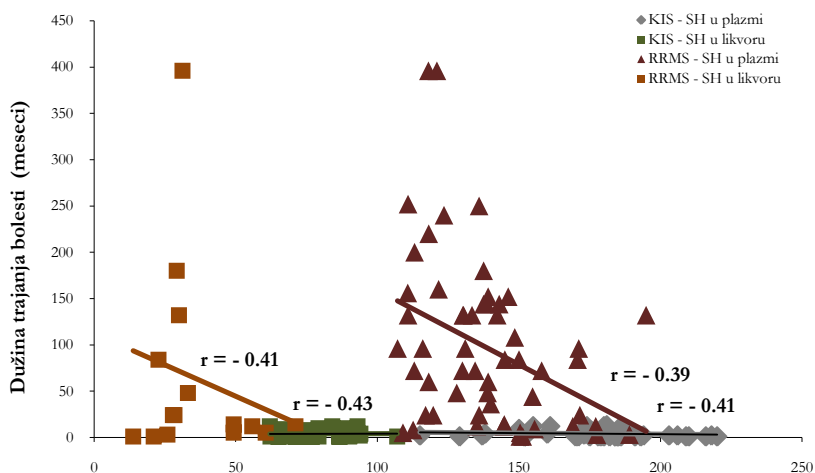
Grafikon 34. Korelacija vrednosti MDA u plazmi i likvoru i dužine trajanja tegoba

Pozitivna povezanost promena koncentracije AOPP i dužine trajanja tegoba (bolesti) (Grafikon 35) uočena je u obe grupe, KIS ($r=0,3$, $p=0,04$ (plazma); $r=0,43$, $p=0,029$ (likvor); $r=0,41$, $p=0,0025$ (hemolizat)), i RRMS ($r=0,34$, $p=0,02$ (plazma); $r=0,3$, $p=0,03$ (likvor); $r=0,12$, $p=0,085$ (hemolizat)).



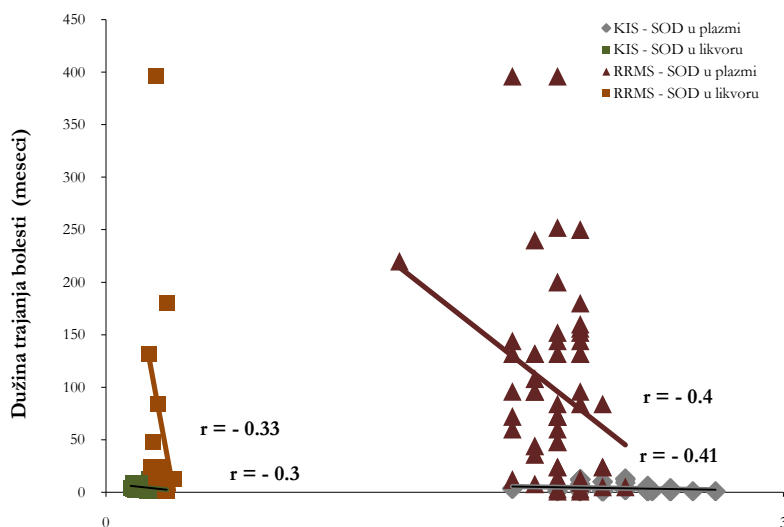
Grafikon 35. Korelacija vrednosti AOPP u plazmi i likvoru i dužine trajanja tegoba

Između koncentracija SH grupa i dužine trajanja tegoba (bolesti) (Grafikon 36), uočeno je postojanje negativne korelacije, i u KIS ($r=-0,41$, $p=0,012$ (plazma); $r=-0,43$, $p=0,01$ (likvor); $r=-0,412$, $p=0,0025$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,39$, $p=0,02$ (plazma); $r=-0,41$, $p=0,025$ (likvor); $r=-0,195$, $p=0,055$ (hemolizat)).



Grafikon 36. Korelacija vrednosti SH u plazmi i likvoru i dužine trajanja tegoba

Negativna korelacija dobijena je testiranjem povezanosti promene aktivnosti SOD i dužine trajanja tegoba (bolesti) (Grafikon 37), i u KIS ($r=-0,41$, $p=0,02$ (plazma); $r=-0,3$, $p=0,04$ (likvor); $r=-0,53$, $p=0,009$ (hemolizat)), i u RRMS pacijenata ($r=-0,4$, $p=0,025$ (plazma); $r=-0,33$, $p=0,03$ (likvor); $r=-0,41$, $p=0,009$ (hemolizat)).



Grafikon 37. Korelacija aktivnosti SOD u plazmi i likvoru i dužine trajanja tegoba

5.

DISKUSIJA

5.1. Značaj i mesto neuroinflamacije u bifazičnoj patogenezi MS

Dugo godina je neuroinflamacija smatrana jedinom patogenetskom osnovom MS. Bio je opšte prihvaćen stav da je demijelinizacija, uzrokovana neuroinflamacijom, odgovorna za ukupnu kliničku i parakliničku prezentaciju bolesti i njenu progresiju (Bjartmar i sar. 2000). Ipak, istraživanja novijeg datuma, unela su izvesne promene u ranije pretpostavljeni koncept o patofiziologiji ovog oboljenja, ukazujući da je dugoročna funkcionalna onesposobljenost uzrokovana oštećenjem neurona (aksona) tj. neurodegeneracijom, te da je neuroinflamacija, dominantan patogenetski mehanizam u ranoj fazi MS, iako je ona prisutna i u njenim kasnijim evolutivnim stadijumima (Compston i Coles, 2008; Frischer i sar. 2009).

Savremeni patofiziološki koncept MS podrazumeva postojanje dve faze u evoluciji bolesti: neuroinflamacije koja je vodeća karika u ranijim patogenetskim fazama bolesti; i neurodegeneracije, koja se smatra ključnim patogenetskim mehanizmom u odmaklim fazama MS. U obe patogenetske faze značajna, ali nedovoljno ispitana, uloga pripisana je oksidativnom i nitrozativnom stresu (Gonsete, 2008; Nessler i Bruck, 2010). Ipak, činjenica je da je ukupno razumevanje patofiziološkog koncepta MS više od proste podele njene patogeneze na fazu neuroinflamacije i fazu neurodegeneracije. Teško je uočiti tačku u patofiziologiji MS u kojoj se ove dve faze seku, i u kojoj neuroinflamacija prelazi u neurodegeneraciju i kada redoks oksidaciona oštećenja predstavljaju vodeći patogenetski mehanizam bolesti. Istina je najbliže pretpostavci da se ovi procesi u velikoj meri preklapaju, iako gotovo da i nema radova koji preciznije utvrđuju taj nivo preklapanja i određuju njegove kliničke i parakliničke korelate.

5.2. Patogenetski značaj modulacije nitrozativnog stresa za tok neuroinflamacije

Proces neuroinflamacije se karakteriše prekomernim stvaranjem RKV i RAV što može dovesti do oksidativnog i nitrozativnog stresa (Leung i sar. 2011). Pokazan je direktni efekat RKV i RAV na tok i ishod demijelinizacije i aksonskog oštećenja, kako u EAE tako i u MS (Henderson i sar. 2009). Ovaj efekat tumačen je direktnom regulacijom genske ekspresije nekih značajnih transkripcionih faktora, poput NF-kB, koji direktno stimuliše ekspresiju mnogih drugih molekula,

značajnih za dalju patogenezu bolesti, poput $\text{TNF-}\alpha$, iNOS i drugih (Glass i sar. 2010; Paintlia i sar. 2011).

S druge strane, neki klinički trajali osporavaju ovakav značaj RKV i RAV na pomenute procese (Bishop i sar. 2009). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na porast koncentracije metabolita NO_\bullet , kako u EAE (Grafikon 2), tako i u KIS i RRMS pacijenata (grafikoni 8-10), što bi indirektno moglo biti dovedeno u vezu sa napred iznetim činjenicama.

Dugo je razmatrano pitanje uticaja koji bi moglo imati povećanje koncentracije NO_\bullet , u odnosu na kliničke i parakliničke korelate neuroinflamacije (Guix i sar. 2005; Calabrese i sar. 2006, 2007; Knott i Bossy-Wetzel, 2011; Stojanovic i sar. 2012). Rezultati ovog istraživanja pokazuju pozitivnu korelaciju porasta koncentracije NO_\bullet u plazmi i likvoru i stepena neurološke onesposobljenosti pacijenata, kao i stepena morfoloških promena CNS koje su vizuelizovane neuroradiološkim pretragama (grafikoni 23 i 28). Ovi nalazi sugerišu značaj NO_\bullet ne samo u fazi neuroinflamacije (KIS pacijenti), već i u fazi manje ili više naglašene neurodegeneracije (RRMS pacijenti). Ipak, veći porast koncentracije NO_\bullet zabeležen u KIS u odnosu na RRMS grupu ukazuje na značajno veći patogenetski potencijal NO_\bullet u neuroinflamaciji (Grafikon 8). Azot monoksid u neuroinflamaciji indukuje proces lipidne peroksidacije, proces nitrozilacije tiola, nitrovanja tirozina, oksidacije i deaminacije nukleinskih kiselina (Calabrese i sar. 2002; Brown i Bal-Price, 2003; Butterfield i Sultana, 2008). Porast koncentracije NO_\bullet je posledica aktivacije iNOS (Saha i Pahan, 2006; Moncada i Bolanos, 2006), što potvrđuju i rezultati imunohistohemijske analize uzoraka prednjeg mozga EAE životinja u ovoj studiji, koje ukazuju na povećanu ekspresije iNOS (Slika 10, A-C). U prilog patogenetskom značaju iNOS u neuroinflamaciji idu i rezultati istraživanja koja ukazuju da se inhibicijom ovog enzima postiže kliničko poboljšanje EAE (Koch i sar. 2006), što je saglasno ne samo sa rezultatima eksperimentalnog dela ove studije (grafikoni 1 i 6), već i dobijenim korelacijama koncentracije NO_\bullet i neurološkog nalaza KIS i RRMS pacijenata (Grafikon 23). Takođe, životinje koje su imale nedostatak gena za iNOS u situaciji eksperimentalne indukcije demijelinizacije imale su manji stepen kliničke onesposobljenosti u odnosu na životinje sa punom ekspresijom gena za iNOS (Stevanovic i sar. 2013).

Neka istraživanja ukazuju da primena tzv. „čistača“ NO_\bullet , odnosno ONOO $^-$, smanjuje stepen neurološke onesposobljenosti u životinja sa EAE (Koch i sar. 2006). Slično prethodnom, ovde prikazani rezultati ukazuju da primena AG, inhibitora iNOS, dovodi do supresije aktivnosti ovog enzima (Grafikon 2), istovremenog pada koncentracije NO_\bullet i smanjenja kliničke prezentacije bolesti (grafikoni 1 i 6). Mehanizam kojim se može objasniti protektivni efekat AG posledica je visoke reaktivnosti i nukleofilnosti AG, usled čega AG reaguje sa brojnim biomolekulima (piridoksal

fosfatom, piruvatom, glukozom, MDA itd.) i na taj način inhibiše citokinima i endotoksinom indukovanu aktivnost iNOS, bez efekata na aktivnost konstitutivnih izoformi NOS (Arnett i sar. 2002). Nalaz manjeg broja iNOS pozitivnih ćelija u CNS u EAE životinja koje su tretirane AG u odnosu na EAE koje nisu tretirane podržava ovakvo objašnjenje (Slika 10, A-C). Ovakav efekat AG je naročito izražen u ranim fazama neuroinflamacije (Gonsette, 2008), što sasvim podržavaju i ovde prikazani rezultati sprovedeni na akutnom modelu EAE, koji predstavlja model najranije neuroinflamacije.

S druge strane, iNOS pozitivnost u perivaskularnim prostorima CNS u EAE životinja (Slika 10), ukazuje na značaj NO \cdot u procesu povećanja permeabilnosti KMB. Povećana permeabilnost KMB uočena je kod svih KIS i RRMS pacijenata (Tabela 2). Povećanjem permeabilnosti KMB omogućava se invazija cirkulišućih ćelija u tkivo CNS, a time dalja evolucija neuroinflamacije, koja podrazumeva dodatnu aktivaciju rezidentne ćelijske populacije, mikroglije, astrocita i monocita (Saha i Pahan, 2006; Spiro, 2007). Ovakav efekat potvrđen je rezultatima imunohistohemijske analize ovog istraživanja koji ukazuju na povećanu ekspresiju OX42, ED1 i GFAP ovih ćelija glije i prispelih fagocita, u encefalitičnom tkivu (Slika 10, D, G, J). Sa primenom AG, usled blokade stvaranja NO \cdot smanjuje se njegov efekat na tok neuroinflamacije, a time i aktivnost ćelijske populacije koji je njen patogenetski nosilac. Rezultati imunohistohemijske analize tkiva CNS tretiranih EAE životinja, ukazuju na značajno smanjenje ekspresije pomenutih parametara nakon izlaganja dejstvu AG (Slika 10, E, H, K).

Protektivni efekat AG može biti objašnjen i smanjivanjem direktnih citotoksičnih efekata koje NO \cdot ostvaruje u tkivu CNS, čime učestvuje u evoluciji neuroinflamacije, naročito u njenim ranim patogenetskim fazama (Gonsette, 2008; Martinez i Andriantsitohaina, 2009; Knott i Bossy-Wetzel, 2009). Neki radovi, slično ovde diskutovanim rezultatima, nalaze direktnu korelaciju između koncentracije ONOO \cdot , i težine kliničkog nalaza, istovremeno ukazujući na odsustvo ONOO \cdot u periodima kliničke remisije bolesti (Contestabile i Ciani, 2004). Postoje studije koje su pratile promene koncentracije NO \cdot u humanom materijalu obolelih od MS u toku evolucije bolesti, koje, takođe ukazuju na direktnu korelaciju porasta koncentracije NO \cdot i stepena kliničkog pogoršanja (Bitsch i sar. 2000; Liu i sar. 2001; Sellebjerg i sar. 2002; Petzold i sar. 2002; Rejđak i sar. 2004). Porast koncentracije NO \cdot može biti tumačen direktnim efektom proinflatonog stanja koje indukuje iNOS, posredstvom različitih citokina, pri čemu je najveći stepen takve povezanosti uočen za NO \cdot i proinflatorne citokine poput IL-1 i IFN- γ (Gonsette, 2010). Na osnovu vrednosti parametara biološko-biohemijškog sindroma inflamacije (Tabela 2) kod svih KIS i RRMS pacijenata uočeno je postojanje opšteg proinflatonog stanja paralelno sa porastom koncentracije NO \cdot . Ovo je još jedan dokaz o ključnoj ulozi koju NO \cdot ostvaruje u procesu inflamacije.

Objašnjenje toksičnih efekata u CNS, koje NO \cdot ima u uslovima ovako povišenih koncentracija, leži u činjenici da RAV, nastale njegovom interakcijom sa drugim biomolekulima, imaju direktni toksični efekat na oligodendrocite. Ove reaktivne vrste oštećuju oligodendrocite i mijelinsku ovojnicu i na taj način dovode do smetnji elektrofiziološkog integriteta nervne ćelije usled čega se javljaju smetnje provođenja (Guix, 2005; Artemiadis i Anagnostouli, 2010). Ovo može biti još jedno direktno objašnjenje za pozitivne korelacije koncentracija NO \cdot metabolita i težine kliničkog nalaza pacijenata ovog istraživanja (Grafikon 23).

Ipak, ima i drugačijih saopštenja koja ukazuju da modulacija stvaranja NO \cdot ne utiče bitnije na popravljajanje stepena neurološke onesposobljenosti u EAE životinja i da su oštećenja CNS, koja su posredovana sa NO \cdot minimalna ili čak beznačajna u neuroinflamaciji (Van der Veen i Roberts, 1999; Napoli i Neumann, 2010). Postoje dokazi da smanjenje iNOS aktivnosti povećava predisponiranost životinja ka obolevanju od EAE, kao i da specifična inhibicija iNOS dovodi do prolongiranja bolesti i pogoršanja njenog kliničkog ispoljavanja (Arnett i sar. 2002). Objašnjenja za ovakve nalaze treba tražiti u različitom dizajnu eksperimentalnih protokola, različitoj osetljivosti korišćenih životinjskih vrsta na primenjene imunoinduktore, u različitoj dozi primenjenih inhibitora iNOS, pretretmanu ovim inhibitorima, ali i u činjenici da se potpunom eliminacijom NO \cdot eliminišu i fiziološka svojstva koja NO \cdot ostvaruje u procesu imunosupresije i antiinflamacije (Calabrese i sar. 2007). Izgleda da bi cilj idealne kontrole stvaranja NO \cdot značio da se primenom modulatora nitroznog stresa u optimalnoj dozi, selektivnom inhibicijom iNOS, ostvaruje balans fizioloških i patofizioloških uloga koje NO \cdot ima.

Opet, značaj NO \cdot u neuroinflamaciji treba analizirati u sklopu poremećaja redoks oksidativnog potencijala s obzirom da NO \cdot značajne patološke efekte ostvaruje u interakciji sa RNV (Forman i sar. 2004). U prilog tome ide nalaz smanjenja koncentracije NO \cdot nakon primene NAC, koji je istovremeno bio praćen i poboljšanjem kliničkog nalaza u EAE (Grafikon 1). Neka istraživanja ukazuju da je protektivni efekat NAC, s jedne strane direktno vezan za povećanje intracelularnog tiol homeostatskog pula (Paget i Buttner, 2003), a s druge strane da je posledica direktnog povećanja specifičnog limfocitnog odgovora na primenjeni antigen, čime se intenzitet i efikasnost neuroinflatorne reakcije povećava (Waldner i sar. 2004; Koch i sar. 2006). Takođe je pokazano da NAC ostvaruje nezavisni protektivni efekat na kulturi oligodendrocita u odgovoru na proinflatorne citokine, kao što je TNF α (Stanislaus i sar. 2005). Ranije je pokazano smanjenje infiltracije tkiva CNS nosiocima specifičnog i nespecifičnog imuniteta i smanjenje aktivnosti rezidentne ćelijske populacije u odgovoru na kontrolisanu primenu antioksidanasa (Wolswijk, 2000; Malabendu i Kalipada, 2005; Ponomarev i sar. 2005; Jack i sar. 2005). Rezultati imunohistohemijske analize isečaka velikog mozga EAE životinja koje su tretirane NAC sasvim podržavaju prethodne

tvrdnje (Slika 10). Primena NAC je dovela do smanjenja aktivnosti iNOS u odnosu na EAE netretirane životinje (Slika 10, C), što nalaze i neka ranija istraživanja u kojima je pokazan pad aktivnosti ovog enzima u kulturi peritonealnih makrofaga, C6 glijalnih ćelija i primarnih astrocita (Pahan i sar. 1998; Malabendu i Kalipada, 2005; Marques i sar. 2008). Ovaj mehanizam vezuje se za supresiju aktivacije NF κ B (Pantano i sar. 2006) i direktno je, poput ovde prikazanih rezultata (Grafikon 1), vezan za poboljšanje kliničke prezentacije EAE.

Protektivni efekti NAC na biohumoralne, imunohistohemijske i kliničke markere EAE smatraju se posledicom: smanjenja infiltracije mononuklearnih ćelija u tkivo CNS i smanjenja aktivnosti rezidentnih glijalnih ćelija (Slika 10, F, I, L); blokade indukcije proinflamatornih citokina, smanjenja aktivnosti iNOS; smanjenja proinflatornog Th1 citokinog odgovora (IFN- γ) uz istovremeno povećanje antiinflamatornih citokinih produkata (IL-10) (Ferretti i sar. 2005). Nezavisno od neuroinflamacije, postoje dokazi da su i demijelinizacija i neurodegeneracija posredovane mitohondrijalnom disfunkcijom i glutamatergičkom eksitotoksičnošću (Lassmann i Horsen, 2011). Protektivni efekti i AG i NAC u odnosu na kliničku manifestaciju EAE posredovani su smanjenjem glutamatergičke ekscitotoksičnosti, u prilog čemu ide nalaz smanjenja gustine EAAT₁ transportera u analiziranim uzorcima tkiva CNS EAE životinja koje su tretirane AG i NAC u odnosu na EAE životinje koje nisu imale takav tretman (Slika 10, M-O). Značaj ovih receptora posebno je veliki u iniciranju programirane smrti ćelije (Zhou i sar. 2005; Qi i sar. 2006).

Kako NO \cdot nezavisno dovodi do smanjenja aktivnosti mnogih antioksidativnih enzima, poput SOD, katalaze, GSH-Px (Nozik-Grayck i sar. 2005), ne iznenađuje nalaz povećane aktivnosti SOD i koncentracije GSH nakon tretmana EAE životinja sa AG i NAC (grafikoni 4 i 5). Ovaj efekat očito je posredovan smanjenjem koncentracije NO \cdot , čime se otklanja njegov štetni efekat koji se vezuje za smanjenje ekspresije iRNK za SOD i proteine uključene u regulaciju homeostaze GSH (Laurila i sar. 2009; Kamboj i Sandhir, 2011). Pretpostavka je da je upravo ovo mesto u patogenezi neuroinflamacije u kome se susreću nitrozativni i oksidativni stres, odakle se nadalje potenciraju njihova zajednička štetna dejstva. Pad aktivnosti SOD, zabeležen u svih EAE životinja, dovodi do oštećenja tkiva CNS, koje je posredovano RKV i RAV, čime se doprinosi daljoj evoluciji neuroinflamacije (Zaffaroni, 2003; Reiter, 2006; Laurila i sar. 2009; Pautz i sar. 2010). Paraleleno sa padom vrednosti GSH, pad aktivnosti SOD otvara mogućnost prekomernog stvaranja ONOO \cdot i favorizovanja njegovih štetnih efekata (Alvarez i Radi, 2003).

Dobijeni rezultati ukazuju da je porast koncentracije NO \cdot evidentan u svim pojedinačnim kompartmanima CNS (Grafikon 2). Diseminovani porast koncentracije NO \cdot u CNS u neuroinflamaciji posledica je aktivacije iNOS glijalnih ćelija i imunih ćelija koje usled povećanja

permeabilnosti KMB invadiraju čitavo nervno tkivo (Thiel i Audus, 2001, Farias i sar. 2007). Poseban značaj u ovim uslovima imaju Th1 citokini poput IFN- γ , TNF- α , i IL-1b (Napoli i Neumann, 2010). Uočeno je da NO \cdot iako i sam nastaje usled indukcije aktivnosti iNOS od strane pobrojanih citokina, nezavisnim mehanizmima može vršiti aktivaciju genske ekspresije za TNF- α (Bishop i sar. 2009, Henderson i sar. 2009). Ako se uzme u obzir činjenica da je aktivnost konstitutivnih izoformi NOS u neuroinflamaciji nepromenjena ili neznatno smanjena (De Groot i sar. 1997), porast aktivnost iNOS mogao bi biti shvaćen kao kompenzatorna reakcija nervnog tkiva, koja za cilj ima pokretanje procesa programirane ćelijske smrti, sa ciljem eliminacije aktivisanih imunih ćelija iz CNS i preveniranja daljeg oštećenja, s obzirom da je proces programirane smrti ćelija velikim delom posredovan mehanizmima zavisnim od NO \cdot (Gaston i sar. 2003; Kahl i sar. 2003). Pozitivna korelacija koncentracije NO \cdot u svakoj pojedinačnoj strukturi CNS i težine kliničke prezentacije EAE (Grafikon 6) ipak ukazuje da NO \cdot ostvaruje pre negativni, nego prethodno pretpostavljeni protektivni efekat u patogenezi neuroinflamacije. Rezultati nekih istraživanja ukazuju da primena AG u istoj dozi u različitim fazama neuroinflamacije, iako sa istim efektom na krajnje koncentracije NO \cdot , ima sasvim suprotstavljene efekte u odnosu na tok i kliničku prezentaciju neuroinflamacije (Okuda i sar. 1998). Primena AG neposredno nakon imunoindukcije EAE, što je bio slučaj u ovom istraživanju, odlaže, usporava ili redukuje kliničku manifestaciju EAE, dok primena AG nakon pojave prvih simptoma EAE provocira pogoršanja i pojavu čestih relapsa u hroničnom EAE modelu (Okuda i sar. 1998).

Činjenica je da uloga NO \cdot nije ista u različitim patogenetskim fazama neuroinflamacije i da direktno zavisi od imunološke kompetencije organizma (Xu i sar. 2001; Muzhou i Tsirka, 2009). U prilog ovakvoj tvrdnji ide nalaz viših koncentracija NO \cdot u plazmi i likvoru KIS u odnosu na RRMS pacijente (Grafikon 8). Imajući u vidu veći imunološki i regenerativni potencijal na početku neuroinflamacije (KIS pacijenti), u odnosu na njene kasnije evolutivne faze (RRMS pacijenti), porast NO \cdot u KIS pacijenata mogao bi biti shvaćen kao kompenzatorna reakcija organizma u odgovoru na na proinflamatorne uslove sa ciljem da se protektivnim svojstvima NO \cdot ograniči štetni efekat makrofaga i aktivisanih limfocita (Brown i Bal-Price, 2003; Pautz i sar. 2010).

Izraziti porast aktivnosti NOS u tkivu kičmene moždine u toku razvoja EAE (Grafikon 2) pokazan je takođe u nekim ranije sprovedenim istraživanjima (Saito i sar. 1994; Kim i sar. 2006). S druge strane, ima radova koji sugerišu promene aktivnosti NOS u EAE, koje primarno zahvataju NO \cdot /NOS sistem u malom mozgu, što nije posledica povećane ekspresije NOS, već se dovodi u vezu sa promenama ćelijske distribucije ovog enzima u malom mozgu (Blanco i sar. 2010). U oba tkiva patogeni efekat NO \cdot bio je tesno povezan sa povećanjem koncentracije medijatora ove vrste oštećenja, u prvom redu ONOO \cdot (Kornek i sar. 2000, Brown i Bal-Price, 2003). Povećanje koncentracije nitrotirozina uočeno je na autopsijskom materijalu tkiva mozga obolelih od MS, na

kojem je uočena direktna povezanost koncentracije ovih produkata sa volumenom demijelinizacionih lezija (Henderson i sar. 2009). Ovakav nalaz podržavaju rezultati ovog istraživanja gde je uočeno postojanje pozitivnih veza između koncentracije NO[•] i volumena akutnih demijelinizacionih lezija koje su uočene neuroradiološkim pretragama, kako u KIS tako i u RRMS grupi pacijenata (Grafikon 28). Objašnjenja za direktnu povezanost porasta koncentracije NO[•] i dužine trajanja bolesti u RRMS grupi (Grafikon 33), treba tražiti u činjenici da NO[•] direktno, ili posredstvom ONOO⁻, modulira aktivnost respiratornog lanca u mitohondrijama čime dugoročno utiče na smanjenje energetske zaliha ćelija nervnog tkiva, usled čega uzrokuje i oštećenja aksona, što zahteva vreme, te je karakteristika odmaklih faza neuroinflamacije (Kornek i sar. 2000). Opet, NO[•]/ONOO⁻ koji se stvaraju i u stanju kliničke remisije (Oliveira i sar. 2012), učestvuju u stvaranju različitih neoepitopa koji nezavisnim putevima pokreću procese imunoreaktivnosti i dalju evoluciju neuroinflamacije i neurodegeneracije (Foster i sar. 2003). Ovaj process je daleko intenzivniji u pacijenta sa ponavljanim atacima neuroinflamacije, nego u pacijenata sa njenom inicijalnom prezentacijom (KIS pacijenti).

5.3. Patogenetski značaj modulacije oksidativnog stresa u neuroinflamaciji

5.3.1. Značaj modulisanja procesa lipidne peroksidacije

Jedan od vodećih patogenetskih mehanizama kojim i nitrozativni i oksidativni stres ostvaruju svoj patogeni efekat u neuroinflamaciji je proces lipidne peroksidacije (Besler i Comoglu, 2003). Rezultati eksperimentalnog dela ovog istraživanja ukazuju na pojačani intenzitet ovog procesa u svim pojedinačnim strukturama CNS EAE životinja (Grafikon 3). Postoje istraživanja koja nalaze slično (Besler i Comoglu 2003; Salemi i sar. 2010), ukazujući da bi intenzitet procesa lipidne peroksidacije mogao biti direktna posledica imunoindukcije prema sopstvenim antigenima mijelinske ovojnice koja je bogata lipidnim sadržajem (Ponomarev i sar. 2005). Tako je dokazana udruženost gubitka imunološke tolerancije prema vlastitim antigenima MBP i MOG, i porasta koncentracije produkata koji nastaju posredstvom MDA posredovane kovalente izmene proteina i interakcije MDA sa cisteinom, lizinom i histidinom (Wallberg i sar. 2007). Na ovaj način, lipidna peroksidacija učestvuje u daljoj evoluciji neuroinflamacije čime direktno doprinosi težini njene kliničke manifestacije. Ovde prikazani rezultati, u kojima postoji direktna povezanost porasta koncentracije MDA i težine neurološkog nalaza EAE (Grafikon 6), i porasta koncentracije MDA i kliničkog i radiološkog nalaza, kako u KIS, tako i u RRMS pacijenata (Grafikon 24), potvrđuje prethodne nalaze.

U nekim istraživanjima je pokazano da modifikacija albumina pod uticajem MDA, u toku neuroinflamacije, uzrokuje pokretanje imunog odgovora prema ovim proteinima, uz istovremenu aktivaciju specifičnog imuniteta, čime se pogoršava tok neuroinflamacije, i težina njene kliničke manifestacije (Bongarzone i sar. 1995; Wuttge i sar. 1999). Skorija istraživanja ukazuju da komplement faktor H, kao glavni MDA-vezujući protein, može vršiti blokadu pokretanja ovakve vrste imunostimulacije. Verovatni mehanizam koji je u osnovi ovog efekta predstavlja preuzimanje molekula modifikovanih dejstvom MDA, od strane fagocitnih ćelija čime se prevenira gubitak imunološke tolerancije a na taj način i štetna dejstva u nervnom tkivu koja bi mogla biti pokrenuta (Weismann i sar. 2011). Ovi rezultati ukazuju da se smanjivanjem intenziteta lipidne peroksidacije postiče protektivni efekat na težinu kliničke prezentacije bolesti, što je pokazano i rezultatima ekperimentalnog dela ovog istraživanja (Grafikon 6). Smanjenjem intenziteta oksidativnog i nitrozativnog stresa, primenom AG i NAC, smanjuje se intenzitet lipidne peroksidacije uz poboljšanje kliničke manifestacije neuroinflamacije (Grafikon 1). Ovakav efekat smanjenja intenziteta lipidne peroksidacije potvrđuju i druga istraživanja (Kalyvas i David, 2004; Marusic i sar. 2005), ukazujući da bi MDA mogao biti senzitivni marker intenziteta neuroinflamacije (Jana i Pahan, 2007).

Dobijeni rezultati pokazuju da je u oba klinička fenotipa neuroinflamacije, KIS i RRMS, zabeležen porast koncentracije MDA u plazmi i likvoru (Grafikon 11), što je u saglasnosti sa rezultatima nekih prethodnih istraživanja (Miller i sar. 2011; Tavazzi i sar. 2011). Postoje rezultati koji ukazuju na tesnu povezanost intenziteta procesa lipidne peroksidacije i koncentracije proinflamatornih citokina (Ferretti i Bacchetti, 2011), ukazujući na pad intenziteta ovog procesa sa smanjivanjem intenziteta inflamatorne reakcije (Keles i sar. 2001). Ovaj efekat naročito je zapažen nakon primene kortikosteroidne terapije, pri čemu je veći pad koncentracije MDA zabeležen u plazmi nego u likvoru (Mitosek-Szewczyk i sar. 2010). Porast koncentracije MDA u likvoru direktna je posledica povećanog intenziteta procesa lipidne peroksidacije u CNS u toku neuroinflamacije, koja očito postoji i u periodu kliničke remisije bolesti. U prilog ovakvoj tvrdnji ide nalaz povećane koncentracije MDA u likvoru i nakon stabilizacije KMB primenom kortikosteroidne terapije, što sugerise da porast koncentracije MDA u CNS nije posledica „prelivanja” ovog biomarkera sa periferije kroz oštećenju KMB, s obzirom da se visok nivo MDA održava i nakon terapijske stabilizacije KMB (Mitosek-Szewczyk i sar. 2010). Ovaj nalaz direktno podržavaju rezultati ovog istraživanja koji ukazuju na veći porast koncentracije MDA u likvoru nego u plazmi, i u KIS i u RRMS grupi (Grafikon 11). Iz ovog razloga, nivo MDA u likvoru se smatra markerom koji direktno reflektuje intenzitet neuroinflamacije, naročito zbog inverznih korelacija nivoa MDA i volumena neoštećenog nervnog tkiva koji je dokazan u neuroinflamaciji (Sbardella i sar. 2012).

Imajući u vidu da je lipidna peroksidacija zajednička karika dejstva nitrozativnog i oksidativnog stresa (Joseph i sar. 2005; Quintana i sar. 2012), ona se smatra ključnim patogenetskim mehanizmom u procesu neuroinflamacije i njome posredovanih oštećenja nervnog tkiva (Gilgun-Sherki i sar. 2004; Ferretti i sar. 2005; Koch i sar. 2006; Haider i sar. 2011). Čini se da odsustvo razlike u vrednostima za MDA u likvoru i plazmi između KIS i RRMS pacijenata (Grafikon 11), koji imaju različit neurološki i radiološki korelat neuroinflamacije, nije u saglasnosti sa prethodnom tvrdnjom. Najvećim delom stvoreni krajnji produkti lipidne peroksidacije iz plazme i likvora bivaju preuzeti od strane makrofaga ili se vezuju za proteine likvora ili plazme (Kocha i sar. 2007). Na ovaj način MDA može biti apsorbovan kroz arahnoidne viluse u krv, čime se njegova koncentracija u likvoru smanjuje na račun povećanja koncentracije u plazmi (Han i sar. 2008), što odgovara rezultatima dobijenim u ovom istraživanju (Grafikon 11) i objašnjava odsustvo razlike u vrednostima za MDA u likvoru i plazmi između KIS i RRMS pacijenata.

Takođe, dobijeni rezultati ukazuju na porast koncentracije MDA u hemolizatima obe grupe pacijenata (Grafikon 11). Pokazano je da eritrociti obolelih od različitih autoimunih bolesti (Shah i sar. 2010; Tsuda, 2012) i MS pokazuju veći rigiditet ćelijske membrane i sklonost ka spontanoj i indukovanoj lizi ćelija, što je bilo u direktnoj korelaciji sa intenzitetom inflamacije (Hon i sar. 2009) i njenom kliničkom prezentacijom (Koch i sar. 2006; de Freitas i sar. 2010). Dokazano je da je osnova ovih procesa povećan intenzitet lipidne peroksidacije, s obzirom da je eritrocitna membrana pogodan supstrat za pokretanje ovog procesa u uslovima intenzivnog nitrozativnog i oksidativnog stresa, kakav postoji u neuroinflamaciji (Besler i Comoglu, 2003; Koch i sar. 2007; Ferretti i Bacchetti, 2011). Slične rezultate nalaze i neke skoro sprovedene studije (Pasichna i sar. 2007; Miler i sar. 2013) koje takođe ukazuju na postojanje pozitivnih korelacija procesa lipidne peroksidacije i parakliničkih nalaza, slično ovde dobijenim rezultatima (grafikoni 24, 29, 34). Objašnjenje za dobijene korelacije autori nalaze u povećanoj koncentraciji produkata nastalih kovalentnom modifikacijom različitih biomolekula dejstvom intermedijarnih i krajnjih produkata procesa lipidne peroksidacije. U red ovih produkata, značajnih za dalje patogenetske mehanizme neuroinflamacije spadaju i uznapredovali produkti oksidacije proteina (eng. AOPP) (Erden Inal i sar. 2001; Vani i sar. 2002; Acar i sar. 2012).

5.3.2. Patogenetski aspekti uloge i značaja AOPP u neuroinflamaciji

Još od samog otkrića, AOPP su definisani kao stabilni marker oksidativne modifikacije proteina (Witko Sarsat i sar. 1996), što je takođe potvrđeno i u nekim istraživanjima novijeg datuma (Graber i Dhib-Jalbut, 2011). Povećana koncentracija AOPP u uslovima oksidativnog i nitrozativnog stresa nije iznenađujuća s obzirom da su proteini shodno svojoj koncentraciji, koja je veća u odnosu na druge biomolekule u organizmu, prvi na meti RKV i RAV (Gilgun-Sherki i sar. 2004).

Nalaz povišene koncentracije AOPP u obe ispitivane kohorte pacijenata (Grafikon 14) u potpunosti podržava prethodnu tvrdnju. Stvaranje AOPP objašnjava se hemijskom interakcijom hlorinatnih oksidanasa (hloramina i hipohlorida), koji u velikoj količini nastaju u inflamaciji, i proteina (Noseworthy i sar. 2000; Ghafourifar i sar. 2008). Ipak, dokazano je da AOPP nisu samo krajnji produkti takve hemijske interakcije već nakon stvaranja imaju ulogu aktivnih medijatora u daljoj evoluciji inflamatornog procesa. Svoj patogenetski značaj AOPP u neuroinflamaciji ostvaruju indukcijom stvaranja različitih citokina i adhezionih molekula koji su značajni za proces povećanja permeabilnosti KMB (Fernandez i Vermersch, 2011). S obzirom da nastaju dejstvom hlorinatnih oksidanasa stvorenih od strane nespecifičnih imunih ćelija, koje su prva linija odbrane u uslovima neuroinflamacije, AOPP bi se mogli smatrati indikatorima intenziteta najranije inflamatorne reakcije (Pentón-Rol i sar. 2009). U prilog ovoj tvrdnji ide nalaz pozitivne korelacije dobijenih vrednosti AOPP u likvoru i plazmi, u KIS i RRMS grupi, i parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije, u prvom redu ukupnog broja leukocita, koncentracije CRP i fibrinogena (Tabela 2).

Oksidativno izmenjeni proteini su hidrofobni, podložniji su denaturaciji, fragmentaciji i formiranju agregata sa drugim oksidativno izmenjenim biomolekulima (Park i sar. 2006). Shodno činjenici da nastaju od proteina, AOPP bi se mogli smatrati direktnim markerom sadržaja albumina i ukupnih proteina u datom tkivu. Ipak, potvrda za takvu pretpostavku nije dobijena u snazi korelacije u ovom istraživanju, jer je koncentracija AOPP u likvoru bila veća u KIS u odnosu na RRMS pacijente (Grafikon 14), iako je sadržaj proteina, obrnuto, bio viši u likvoru u RRMS, u poređenju sa KIS pacijentima (Tabela 2). Uzimajući u obzir prethodno izneto, i kako nije uočena značajnost razlike koncentracija albumina u likvoru KIS i RRMS pacijenata (Tabela 2), čini se da i drugi proteini, a ne samo albumini, iako su glavna proteinska frakcija plazme i likvora, učestvuju u formiranju AOPP. U pregledanoj literaturi nisu uočena slična istraživanja novijeg datuma koja bi bila od koristi za komparativnu analizu sa ovde prikazanim rezultatima. U radu Heinecke i saradnika (1993) vršena je analiza povezanosti koncentracije AOPP sa drugim markerima oštećenja proteina, pa je tako pokazana direktna veza sa serumskim koncentracijama ditirozina koji se smatra markerom intenziteta oksidativnog stresa uopšte, dok je postojanje daleko slabije veze uočeno između koncentracije AOPP i drugih produkata proteinske modifikacije (Davies, 1987). Slične rezultate nalaze i druga istraživanja u kojima je analiziran elektroforetski nalaz AOPP, pri čemu je uočeno postojanje dva različita pika, od 670 i 70 kDa (Witko Sarast i sar. 1996). Pokazano je da pik veće molekulske mase obrazuju agregati oksidativno izmenjenih albumina koji najvećim delom obrazuju disulfidne veze kao i agregati ditirozina, dok je pik manje molekulske mase sadržao albumine i druge proteine plazme u monomernoj ili strukturno izmenjenoj formi.

Iako su s jedne strane podložniji proteolitičkoj razgradnji s druge strane AOPP bivaju preuzeti u neznatnoj količini od strane fagocitnih ćelija, što vodi povećanju njihove ekstracelularne koncentracije (Pentón-Rol i sar. 2009; Mirshafiey i Mohsenzadegan, 2009; Sadowska-Bartosz i sar. 2013). Ovo bi moglo biti još jedno od objašnjenja za porast koncentracije AOPP u likvoru i plazmi u ovom istraživanju (Grafikon 14). Shodno gore iznetom, više vrednosti AOPP u KIS pacijenata, sugerišu postojanje intenzivnijih inflamatornih procesa, što parametri biološko-biohemijskog sindroma zapaljenja i potvrđuju (Tabela 2).

U toku neuroinflamacije AOPP mogu direktno vršiti povećanje ekspresije transkripcionih faktora i citokina, kao npr. NF- κ B, TNF- α , iNOS i nekih adhezionih molekula poput ICAM-1, VCAM-1, koji se smatraju ključnim u inflamatornim procesima CNS i indukciji imunog odgovora u celosti (Lucchinetti i sar. 2000; Lucas i sar. 2003). S druge strane, neophodna je očuvanost odbrambenih kapaciteta kako bi u odgovoru na ovaj stimulus nervno tkivo i organizam u celini mogli reagovati (Frohman i sar. 2006). Vremenom, tokom trajanja bolesti (RRMS pacijenti), dolazi do iscrpljivanja odbrambenih mehanizama, što je u određenoj meri prisutno čak i u periodima kliničke remisije (Oliveira i sar. 2012). Tako, povećane koncentracije AOPP koje označavaju intenzivniju neuroinflamatornu kaskadu, jedino u uslovima narušenih odbrambenih potencijala organizma uzrokuju veći stepen oštećenja nervnog tkiva, a time i težu kliničku sliku neuroinflamacije (Bramow i sar. 2010; Bisaga i sar. 2012). Ovo bi moglo biti korisno za objašnjenje rezultata ovog istraživanja u kojima je u RRMS grupi veći stepen neurološke onesposobljenosti bio praćen manjim koncentracijama AOPP, suprotno KIS pacijentima koji su, iako sa višim koncentracijama AOPP imali manji stepen neurološke onesposobljenosti (Grafikon 14). Iako su u obe grupe uočene pozitivne korelacije koncentracija AOPP i EDSS (Grafikon 25), i dužine trajanja bolesti (Grafikon 35), čini se da u tumačenju ovog nalaza nije presudna koncentracija AOPP, već narušenost odbrambenih mehanizama, jer se efekat koji AOPP pokazuju u odnosu na oštećenje mijelina i aksona, potencira upravo u uslovima imunološke ispljenosti organizma (Bjartmar i Trapp, 2001), što je i bio slučaj u RRMS grupi pacijenata, kao posledica dužeg trajanja bolesti.

Pretpostavka je da se u interakciji sa mijelinskom ovojnicom AOPP indirektno uključuju u procese stvaranja neoepitopa, čime se vrši imunoindukcija i dalje oštećenja nervnog tkiva (Fernandez i Vermersch, 2011). Produktima nepotpune proteolitičke razgradnje, AOPP mogu vršiti i direktan imunogeni efekat u CNS (Park i sar. 2006). Polazeći od ove tvrdnje, postojanje morfoloških promena u tkivu mozga, viđenih radiološkim pretragama (Tabela 5), moglo bi biti shvaćeno i kao posledica ovakvog efekta AOPP na nervno tkivo (De Stefano i sar. 2001).

Shodno kontinuiranoj izloženosti pacijenata RRMS grupe (i u periodu kliničke remisije) dejstvu RKV i RAV, više vrednosti koncentracije AOPP uočene su u eritrocitima ove grupe pacijenata (Grafikon 14) u odnosu na pacijente KIS grupe. Rezultati ranijih istraživanja takođe nalaze povećanu koncentraciju oksidativno izmenjenih proteina u eritrocitnim membranama u toku oksidativnog stresa (Pandey i Rizvi, 2009). Slično ovde prikazanim rezultatima (grafikoni 25 i 35), postoje dokazi o direktnoj povezanosti eritrocitnog sadržaja AOPP i MDA i težine kliničke ispoljenosti i dužine trajanja inflamatornog stanja (Rizvi i Maurya, 2007; Pandey i Rizvi, 2012; Fiorini i sar. 2013).

5.3.3. Oštećenje GSH homeostaze u neuroinflamaciji

S obzirom na veću koncentraciju, a time i veći značaj, u odnosu na ostale redoks regulišuće molekule u ćeliji, promena koncentracije GSH je proučavana u mnogim prooksidativnim stanjima (Shelton i Mielal, 2008; Heather i Teismann, 2009; Garcia i sar. 2010; Haider i sar. 2011). Rezultati svih istraživanja saglasni su u zaključku da je pad koncentracije GSH odgovoran za evoluciju oksidativnih oštećenja i pojavu njihovih kliničkih korelata.

Kako je pokazano u ovom istraživanju, pad koncentracije GSH i njegov porast nakon primene supstanci koje ostvaruju modulatorni efekat na intenzitet nitrozativnog i oksidativnog stresa (Grafikon 4), pokazali su negativnu korelaciju sa težinom kliničke manifestacije EAE (Grafikon 7). S obzirom da sinteza GSH u neuronima direktno zavisi od koncentracije postojećeg GSH i dostupnosti cisteina, nije iznenađujući pad GSH u EAE netretiranih životinja, kada se GSH troši usled puferovanja redoks oksidativnog disbalansa, ali ni njegov porast nakon primene NAC koji je direktni donor cisteina (Grafikon 4). Slični rezultati objavljeni su i u nekim drugim studijama (Lu, 2009). Preuzimanje cisteina je posredovano cistin/glutamatnim transporterom koji je eksprimiran na KMB i u drugim strukturama CNS (Castegna i sar. 2011). S obzirom da se ovim procesom cistin ubacuje u ćeliju u kontratransportu sa glutamatom, aktivnost ovog transportera je smanjena u uslovima kada je narušen gradijent ekstracelularne koncentracije glutamata koji je pokretač ovog procesa (Albrecht i sar. 2010). Narušenost ovog gradijenta postoji u neuroinflamaciji (Tao i sar. 2001). Ovde prikazani rezultati povećane ekspresije glutamatergičkog transportera EAAT1 u tkivu mozga dobijenom od EAE životinja (Slika 10, M-O), potvrđuje postojanje glutamatergičke ekscitotoksičnosti. Glutamatergička ekscitotoksičnost na ovaj način dovodi do narušavanja antioksidativnog kapaciteta CNS (Werner i sar. 2001; Albrecht i sar. 2010).

Posebna osetljivost oligodendrocita, ključnih ćelija u procesu demijelinizacije i remijelinizacije, na oksidativna oštećenja uzrokovana je fiziološki manjim sadržajem GSH (Calabrese i sar. 2002). Druge glijalne ćelije, aktivisane u neuroinflamaciji (Slika 10, D-L), zahvaljujući višim

koncentracijama GSH pokazuju veći stepen rezistentnosti na nitrozativna i oksidativna oštećenja (Moss i Bates, 2001). Postoje istraživanja koja ukazuju da se suplementacijom prekursora sinteze GSH, slično primeni NAC u ovom istraživanju, povećava rezistentnost i regenerativna sposobnost oligodendrocita (Calabrese i sar. 2002). Ovim se može direktno objasniti poboljšanje kliničke prezentacije EAE u grupi životinja tretiranih sa NAC u odnosu na one koje nisu imale takav tretman (Grafikon 1). Ovaj efekat je verovatno posredovan i preveniranjem glutamatergičke ekcitoloksičnosti, što je potvrđeno smanjenjem ekspresije EAAT1 transportera u mozgu EAE životinja koje su tretirane sa NAC (Slika 10, M-O).

Ima rezultata koji ukazuju da se primenom NAC direktno smanjuje ekspresija TNF- α , a time i njime posredovana ćelijska oštećenja (Kronke i Adam-Klages, 2002; Calabrese i sar. 2002). Ovaj mehanizam dejstva NAC leži u osnovi pada koncentracije NO \cdot u EAE životinja koje su bile tretirane NAC, s obzirom da se sa smanjenjem TNF- α umanjuje i njegov direktni stimulatorni efekat na aktivnost iNOS (Pautz i sar. 2010; Steinert i sar. 2010). Nalaz smanjene ekspresije iNOS u EAE grupi tretiranoj NAC (Slika 10, O) potvrđuje osnovanost ovakve pretpostavke. Neki radovi ukazuju da se tiol suplementacijom prevenira ćelijska smrt posredovana aktivacijom ASK1 kompleksa koji je još poznat i kao apoptozom, čime se smanjuje oštećenje ćelija u CNS (Ouyang i Shen, 2006), a kao posledica toga javlja se benignija klinička prezentacija bolesti.

Povećano stvaranje NO \cdot u toku neuroinflamacije je značajno za proces trošenja GSH u CNS (Whiteman i sar. 2006). U direktnoj interakciji NO \cdot i GSH i drugih niskomolekularnih antioksidanasa stvaraju se S-nitrozoglutation (GSNO) i S-nitrozotiole (RSNO) (Paige i sar. 2008; Castegna i sar. 2011). Na ovaj način se smanjuje tiolni sadržaj i direktno menja redoks oksidacioni puferski kapacitet CNS (Romero i Bizzozero, 2009; Marozkina i Gaston, 2011). Najvećim delom RSNO nastaju posredstvom GSNO, kada NO \cdot iz GSNO prelazi na tiolne grupe proteina (Mottlerlini i sar. 2000; Muller i sar. 2002). Na ovaj način GSNO povećava bioraspoloživost NO \cdot , učestvuje u regulaciji NO \cdot depoa u CNS i regulaciji intenziteta nitrozativnog stresa (Kim i sar. 2005; Knott i Bossy-Wetzel, 2009). Ovaj efekat GSNO ostvaruje u procesu razgradnje do NO \cdot i GSSG, u spontanoj, ili reakciji koja je posredovana niskomolekularnim tiolima (Liu i sar. 2004). Pad koncentracije GSH u uslovima prekomernog stvaranja NO \cdot između ostalog je uslovljen i prekomernim stvaranjem RSNO (Ljubisavljevic i sar. 2012). S jedne strane, na ovaj način se mogu prevenirati NO \cdot posredovana oštećenja (Foster i sar. 2003; Witherick i sar. 2006), ali, kako se NO \cdot može naknadno oslobađati iz RSNO, čime se njegova koncentracija može višestruko povećati, takođe se mogu i potencirati njegova štetna dejstva (Liu i sar. 2001; Knott i Bossy-Wetzel, 2009; Ljubisavljevic i sar. 2012). Postoje rezultati koji ukazuju da RSNO može ispoljavati i nezavisna imunogena svojstva čime doprinosi intenziviranju inflamatornih procesa u CNS (Sparaco i sar. 2006; Van i sar. 2011). Rezultati

nekih istraživanja ukazuju na prisustvo antitela na RSNO, ili produkte njihove interakcije sa drugim biomolekulima, u plazmi i likvoru obolelih od MS (Boullerne i sar. 2002; Romero i Bizzozero, 2009). Sve navedeno bi moglo biti objašnjenje za lošiju kliničku prezentaciju EAE (Grafikon 1) u životinja koje su imale manju koncentraciju GSH (Grafikon 4) koja je bila praćena istovremenim porastom koncentracije NO \cdot (Grafikon 2). Popravljanje kliničke slike sa povećanjem koncentracije GSH u ovom istraživanju (Grafikon 7), daje za pravo ovakvim pretpostavkama.

Poseban značaj tiol redoks sistema u CNS proističe iz uloge koju on ostvaruje u procesima ćelijske signalizacije u CNS, u procesu rasta i razvoja CNS i kontrolisanja ćelijske smrti (Lu, 2009). Kao deo signalnih puteva u CNS, stvoreni RSNO značajan je u balansu aktivnosti mnogih enzima, poput S-nitrozoglutation reduktaze, tioredoksin reduktaze, Cu/Zn SOD, karbonil reduktaze i protein disulfid izomeraze (Park i sar. 2009; Marozkina i Gaston, 2011). Takođe, posredstvom RSNO, može se vršiti i S-nitrozilacija p65 subjedinice NF-kB, čime se inhibiše translokacija ovog transkripcionog faktora u jedro, a time potencira antiinflamatorni efekat (Khan i sar. 2005). S druge strane, poznato je da proinflamatorni citokini, TNF α , IFN γ , IL-1b, dovode do denitrozilacije p65 subjedinice čime intenziviraju proces inflamacije (Hendriks i sar. 2005). Izgleda da je interakcija GSH i NO \cdot još jedno od značajnih mesta u patogenezi neuroinflamacije na kojem se susreću nitroizivni i oksidativni stres. Postoje rezultati koji pokazuju da na ovaj način stvoreni RSNO vrši kovalentnu modifikaciju svih izoenzimskih formi NOS čime smanjuje njihovu aktivnost i onemogućava stvaranje nove količine NO \cdot (Ischiropoulos i Beckman, 2003; Halestrap i sar. 2007). Na ovaj način se ostvaruje kontrola stvaranja NO \cdot , a količina RSNO iz tog razloga mogla bi biti direktni indikator aktivnosti NOS (Foster i sar. 2003; Foster i sar. 2009).

Smanjenje GSH koncentracije u neuronima obolelih od MS dovodi do aktinske polimerizacije i rearanžiranja ovih filamenata, što potvrđuje histološki nalaz analiziranih demijelinizacionih plakova (Sparaco i sar. 2006). U ovom procesu se smanjuje količina ATP, čime se dalje potenciraju prooksidativni procesi i oštećenja nastala njihovim dejstvom (Garcia i sar. 2010). Iako je više rezultata koji ukazuju da stepen pada koncentracije GSH usled njegovog trošenja u puferovanju redoks oksidativnih oštećenja i formiranja RSNO, ima štetni efekat i negativno korelira sa težinom kliničke slike, što potvrđuju rezultati ekperimentalnog (Grafikon 7) i kliničkog dela ovog istraživanja (Grafikon 26), ima i drugačijih saopštenja. U istraživanju Prasada i sar. (2007) nije pokazan protektivni efekat tretmana GSH u odnosu na intenzitet procesa neuroinflamacije i njegove kliničke korelate. Naprotiv, pad koncentracije GSH i porast koncentracije RSNO imali su značajan efekat u smanjivanju intenziteta inflamatornih procesa u CNS, utičući i na redukciju težine njenog kliničkog ispoljavanja (Prasad i sar. 2007). Sa aspekta rezultata ovog istraživanja, pretpostavljeni mehanizmi ovih efekata izgleda da su posledica precenjene uloge koju NO \cdot , oslobođen iz RSNO, ima

u procesu postranslacione modifikacije različitih signalnih molekula značajnih u procesu neuroinflamacije (Richter-Addo i sar. 2002; Jomova i sar. 2010). Činjenica je da analizom rezultata mnogih istraživanja o ulozi NO u neuroinflamaciji otkrivamo njegove različite i suprotstavljene efekte, za koje se sasvim sigurno može reći da nisu posredovani aktivacijom sistema solubilne guanil ciklaze, što je bio dugo vremena jedini pretpostavljeni mehanizam dejstva ovog molekula (Park i sar. 2009).

Pad koncentracije GSH u eritrocitima u toku akutnih ataka MS, slično rezultatima ovog istraživanja, pokazan je u nekim ranijim radovima (Kidd, 2001). Postoje rezultati koji ukazuju da se antioksidativnom suplementacijom baziranom na velikoj količini tiola potencira povećanje antioksidativnog kapaciteta eritrocita (Grinberg i sar. 2005). Pad koncentracije GSH u eritrocitima tumači se ubrzanom potrošnjom u cilju kompenzovanja prooksidativnog stanja koje postoji i u ovim ćelijama (Deneke, 2000). U prilog tome, postoje rezultati koji, slično rezultatima ovog istraživanja (Grafikon 36), ukazuju na negativnu korelaciju pada intracelularne koncentracije GSH, intenziteta oksidativnog i nitrozativnog stresa i dužine trajanja tog stanja (Hvaring i sar. 2013).

U *in vitro* uslovima je pokazano da se inhibicijom inflamacije koja je uzrokovana lipopolisaharidima, povećava intraćelijski sadržaj tiola (Lin i sar. 2011). Pretpostavljeni mehanizam ovakvog dejstva mogla bi biti S-nitrozilacija slobodnog GSH kojom se modulira aktivnost Th17 ćelija, čiji su efekti nezavisni od Th1 i Th2 ćelijskog odgovora (Nath i sar. 2010). Na ovaj način se ostvaruje protektivni efekat na pojavu, tok i kliničko ispoljavanje EAE, koji je zabeležen i u ovde diskutovanim rezultatima u uslovima prezerviranja ukupnog sadržaja GSH u CNS (Grafikon 1).

5.3.4. Poremećaj homeostaze SH grupa u patogenezi humane neuroinflamacije

Dok je sadržaj neproteinskih tiola značajan za ćelijski antioksidativni kapacitet, značajne komponentne antioksidativnog kapaciteta plazme i likvora su brojne proteinske SH grupe (Foster i sar. 2003). Ove SH grupe, kao i SH grupe ćelijske membrane predstavljaju pogodni supstrat za dejstvo RKV i RAV i različitih alkilšućih agenasa, usled čega dolazi do smanjenja njihove koncentracije i gubitka uloge koju u organizmu ostvaruju (Staron i sar. 2012). Rezultati ovog istraživanja pokazuju pad koncentracije ukupnih SH grupa u likvoru i plazmi, i u KIS i u RRMS grupi (Grafikon 17). Postoje rezultati drugih studija koji takođe ukazuju na pad koncentracije ukupnih SH grupa kod MS pacijenata za vreme relapsa bolesti, sa povećanjem koncentracije SH grupa nakon kortikosteroidne terapije i uspostavljanja kliničke remisije (Mitosek-Szewczy i sar. 2010). Calabrese i sar. (2003) ukazuju na veliki patogenetski značaj smanjenja koncentracije SH grupa u akutnoj inflamaciji nervnog tkiva. U istraživanju Scapagninija i sar. (2002) pokazano je da se primenom različitih antioksidanasa prevenira gubitak ukupne količine SH grupa. Pretpostavka je da se ovaj efekat ostvaruje

moduliranjem intracelularne signalizacije stimulacijom HSP 32 i hem oksigenaze-1, koji su ključni faktori u najranijim fazama neuroinflamacije. Ovo bi moglo biti jedno od objašnjenja za više koncentracije SH grupa, koje su zabeležene u KIS u odnosu na RRMS pacijente (Grafikon 17), s obzirom da su pomenuti faktori značajni u najranijim fazama neuroinflamacije, čiji je korelat KIS (Inglese, 2006). Smanjenje intenziteta neuroinflamacije, oksidativnog i nitroaktivnog stresa, nakon primene interferonske terapije, dovodi do povećanja koncentracije SH grupa uz istovremeno poboljšanje kliničkog nalaza (Lucas i sar. 2003; Graber i sar. 2011; Stojanovic i sar. 2013). Ove rezultate podržavaju i rezultati kliničkog dela ovog istraživanja koji ukazuju da je pad koncentracije SH grupa u plazmi i likvoru udružen sa težom kliničkom prezentacijom i u KIS i u RRMS grupi (Grafikon 26). Ipak, postoje studije sa većim brojem uključenih pacijenata koje ne nalaze ovakvu korelaciju promena koncentracije SH grupa i kliničkog nalaza (Oliveira i sar. 2012).

Iako je uočen manji pad koncentracije SH grupa u obe grupe pacijenata sa manjim brojem radioloških promena mozga u odnosu na pacijente sa većim brojem pomenutih promena (Grafikon 18), u pregledanoj literaturi nisu uočena slična istraživanja koja bi mogla biti od koristi za kompariranje sa ovde dobijenim rezultatima. Dominantiji porast koncentracije AOPP (Grafikon 14) praćen istovremenim padom koncentracije SH grupa (Grafikon 17) u KIS u poređenju sa RRMS pacijentima, indirektno ukazuje na veći intenzitet neuroinflamacije u KIS u odnosu na RRMS pacijente, ali istovremeno i na veći antioksidativni potencijal ovih pacijenata. Ovaj rezultat ne iznenađuje, s obzirom da su RRMS pacijenti hronično eksponirani oksidativnom i nitroaktivnom stresu, čak i u periodu kliničke remisije (Stoop i sar. 2010; Oliveira i sar. 2012; Fiorini i sar. 2013), što utiče na ispljenost i umanjenje antiinflamatornih i antioksidativnih kapaciteta ovih pacijenata.

5.3.5. Patogenetski aspekti promene aktivnosti SOD u neuroinflamaciji

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da promene redoks ćelijske signalizacije u CNS u toku neuroinflamacije dovode do pada aktivnosti SOD (Grafikon 5), i likvoru u KIS i RRMS pacijenata, dok aktivnost ovog enzima u plazmi raste (Grafikon 20). Promene aktivnosti ovog enzima su očekivane s obzirom da SOD predstavlja prvu liniju antioksidativne zaštite organizma (Miller, 2004; Johnson i Giulivi, 2005; Mirshafiey i Mohsenzadegan, 2009).

U CNS, Cu/ZnSOD (SOD₁) je visoko ekprimirana u astrocitima, MnSOD (SOD₂) je ekprimirana u neuronima, dok ekstracelularnu Cu/ZnSOD (SOD₃), karakteriše manja ekspresija u odnosu na prethodne dve izoforme SOD (Miller, 2004). Činjenica da SOD₃, čija je aktivnost određivana u ovom istraživanju, ima fiziološki manju aktivnost u CNS, mogla bi biti objašnjenje za dobijene rezultate koji ukazuju na manju aktivnost SOD u likvoru u odnosu na porast aktivnosti ovog enzima u plazmi, i to u obe grupe pacijenata (Grafikon 20).

Rezultati istraživanja koja su testirala promene aktivnosti SOD₁ u neuroinflamaciji, ukazuju na porast genske ekspresije za SOD₁ u aktivnim MS plakovima (Tajouri i sar. 2003). Druge studije ukazuju na pad aktivnosti ovog enzima uz porast aktivnosti SOD₂ u EAE (Qi i sar. 1997; Qi i sar. 2007). U istraživanju van Horssena i sar. (2008) pokazano je povećanje ukupne aktivnosti SOD u akutnim atacima MS, što podržavaju rezultati ovog istraživanja za aktivnost SOD u plazmi (Grafikon 20).

Uzimajući u obzir činjenicu o postojanju intenzivnog nitrozativnog i oksidativnog stresa u CNS u obe grupe ispitivanih pacijenata (grafikoni 8, 11 i 14), jednostavno objašnjenje za manje vrednosti SOD u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnoj grupi pacijenata, moglo bi biti smanjenje ukupne antioksidativne zaštite, što sugerišu i rezultati sličnih istraživanja (Schreibelt i sar. 2007; Namaki i sar. 2009; Tavazzi i sar. 2011). Smanjenje aktivnosti SOD otvara mogućnost dalje evolucije oksidativnih oštećenja unutar CNS ranije opisanim mehanizmima (Gilgun-Sherki i sar. 2004; Han i sar. 2008; Haider i sar. 2011). Ovo je istovremeno objašnjenje za visoko značajne negativne korelacije aktivnosti ovog enzima i težine kliničke slike i radiološkog nalaza (grafikoni 27 i 32).

S druge strane, moguće objašnjenje za pad aktivnosti SOD u likvoru, u odnosu na porast u plazmi, i u KIS i u RRMS grupi, u odnosu na kontrolnu grupu, moglo bi biti i odsustvo većeg stepena narušenosti KMB u ovom istraživanju (Tabela 2). Ovim se objašnjava odsustvo upliva koncentracije SOD iz plazme na koncentraciju SOD u likvoru i paralelni porast njihovih aktivnosti koje nalaze neke ranije sprovedene studije (Yoshida i sar. 1994). Slični rezultati o padu aktivnosti SOD u CNS u neuroinflamaciji potvrđeni su i rezultatima eksperimentalnog dela ovog istraživanja (Grafikon 5). U oba slučaja moguće je da RKV i RAV, direktno ili posredstvom inflamatornih medijatora ostvaruju efekat na smanjenje genske ekspresije ovog enzima (Afonso i sar. 2007), što dodatno ide u prilog dobijenim negativnim korelacijama aktivnosti SOD i dužine trajanja bolesti (Grafikon 37), s obzirom da se supresorni efekat RKV i RAV na SOD ekspresiju potencira tokom vremena (Namaki i sar. 2009).

Neke ranije studije, slično rezultatima ovog istraživanja, ukazuju na porast aktivnosti SOD u eritrocitima u toku inflamatornih procesa (Gallan i sar. 2003; Acar i sar. 2012). Objašnjenje za izrazitiji porast SOD u KIS u odnosu na RRMS pacijente (Grafikon 20) mogao bi biti intenzivniji nitrozativni i oksidativni stres koji postoji u ovih pacijenata (grafikoni 8, 11, 14). Veći porast SOD javlja se kao posledica očuvanosti adaptivno kompenzatorne reakcije na prooksidativne procese (van Horssen i sar. 2008), dok bi manji porast aktivnosti u RRMS grupi, mogao biti posledica inaktivacije

ovog enzima prolongiranim oksidativnim stresom koji ove pacijente karakteriše čak i u odsustvu akutnih ataka bolesti (Oliverira i sar. 2012).

Postoje studije (Miler i sar. 2013) koje nalaze korelacije između aktivnosti SOD u eritrocitima i težine kliničke slike. S druge strane, ima rezultata koji ovakvu vrstu korelacije osporavaju (Zagórski i sar. 1991), premda i ovi rezultati sugerišu da je pad aktivnosti SOD u negativnoj korelaciji sa dužinom trajanja bolesti, što je saglasno sa rezultatima ovog istraživanja (Grafikon 37). Takođe, rezultati nekih studija sugerišu jaku direktnu povezanost pada ukupnog i ćelijskog antioksidativnog potencijala i vremena tokom kojeg je organizam izložen prooksidativnom delovanju (Vani i sar. 2002). Ovaj efekat se potencira sa povećanjem godina života pacijenata (Erden Inal i sar. 2001). Rezultati ovog istraživanja o stepenu povezanosti promene aktivnosti SOD, i promene koncentracije drugih testiranih parametara, i dužine trajanja tegoba podržavaju napred iznete zaključke (grafikoni 33-37).

Pokazano je da antioksidativni tretman u doznom i vremenskim zavisnom obrascu povećava antioksidativni kapacitet eritrocita, povećavajući upravo aktivnost SOD, čime se istovremeno prevenira pojava različitih degenerativnih oboljenja (Rowinski i sar. 2013). Ovo podržavaju rezultati eksperimentalnog dela ovog istraživanja kojim je pokazano da se nakon tretmana AG i NAC povećava aktivnosti SOD i istovremeno ublažava klinička prezentacija EAE (grafikoni 1, 5, 7). Kao cirkulišuće ćelije, eritrociti su stalno izloženi štetnom dejstvu RKV i RAV, čak i u odsustvu kliničkih relapsa bolesti (Tasset i sar. 2012; Xiang i sar. 2013), što čini da promena antioksidativnog kapaciteta ovih ćelija predstavlja jednu od značajnijih karika u patogenezi neuroinflamacije (Koch i sar. 2006; de Freitas i sar. 2010).

5.4. Modulacija oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji – terapijske perspektive

Rezultati ovog istraživanja, diskutovani u svetlu ranije dobijenih rezultata, ukazuju na veliku ulogu i značaj oksidativnog i nitrozativnog stresa u procesu neuroinflamacije i demijelinizacije, i sugerišu mogućnost uvođenja antioksidativne i antinitrozativne terapije u pomenutim stanjima.

Ranije je potvrđen efekat različitih antioksidativnih pristupa, poput suplementacije antioksidativnih enzima u kulturi oligodendrocita, čime je ostvarivan protektivni efekat u odnosu na

oštećenje uzrokovano RKV (Calabrese i sar. 2002). Takođe, suplementacija cistina i cisteina pokazala je povoljan efekat na ovu ćelijsku liniju, povećavajući intracelularni nivo GSH (Ouyang i Shen, 2006). Kao što je pokazano u ovom istraživanju NAC, sličnim mehanizmom, pokazuje protektivna svojstva u odnosu na kliničko ispoljavanje EAE (Grafikon 1). Najranija suplementacija antioksidansima, pokazala je neposredni, ali i odloženi povoljni efekat u odnosu na kliničku prezentaciju EAE, čak i nakon kratkotrajne primene na početku bolesti i dalje obustave primene ovih enzima (Rowinski i sar. 2013), što podržavaju rezultati ovog istraživanja. Takođe, ukazano je na postojanje protektivnih dejstava primene antioksidativnih enzima pre indukovanja EAE, jer je pojava bolesti nakon premedikacije ovim enzimima bila odložena i usporena, čak se u jednom procentu slučajeva nije ni javila (Singh i sar. 2004).

Slično rezultatima ovog istraživanja, najveći broj radova ukazuje da primena antioksidanasa utiče na promenu toka bolesti u ekperimentalnim uslovima, koji se ogleda u smanjenju težine kliničke prezentacije bolesti i potpunoj reverzibilnosti nastalih promena, bržem postizanju stepena remisije, i odloženom i usporenom toku EAE (Liu i sar. 2006).

Takođe, primenom inhibitora iNOS, dolazi do usporenja patogeneze i smanjenja težine kliničke prezentacije EAE, kao što je pokazano i rezultatima ovog istraživanja. Postoje saopštenja koja ukazuju da odsustvo iNOS u miševa dovodi do razvoja EAE sporijeg toka i umerene kliničke manifestacije u poređenju sa životinjama sa normalnom ekspresijom iNOS (Stevanovic i sar. 2013). Obustava primene inhibitora iNOS, „čistača” stvorenog NO[•] ili „čistača” stvorenog ONOO⁻, u nekim istraživanjima dovođila je do brzih relapsa EAE (Marques i sar. 2008). Iako je jasno da se primenom antioksidantne terapije ostvaruje nedvosmileno povoljni efekat na sve karakteristike EAE, primena inhibitora NO, suprotno ovde dobijenim rezultatima, može imati i negativni efekat. Primena NG-L-monometil arginina, neselektivnog inhibitora NOS u poređenju sa primenom AG, u ekperimentalnim uslovima, ukazala je na delimičnu ili sasvim odsutnu efektivnost u inhibiciji praćenih karakteristika EAE i to u obe testirane grupe (Glass i sar. 2010). Dobijeni rezultati, prilično konfliktni, ukazuju da je uloga NO[•] daleko kompleksnija od one koja je ranije pretpostavljena. Dok većina radova nalazi da inhibicija stvaranja NO[•] može imati povoljan efekat na pojavu, tok i kliničku manifestaciju ekperimentalne neuroinflamacije, drugi su saglasni u zaključku da primena inhibitora iNOS i NOS generalno, dovođi do pogoršanja ovog stanja (Khan, 2011). Ovi zaključci objašnjeni su imunosupresivnom ulogom koju NO[•] ima na T limfocitnu populaciju, pri čemu se sa umanjnjem T limfocitne proliferacije, usled primene inhibitora NOS, omogućava veći intenzitet neuroinflamacije u različitim neurološkim stanjima (Jia i sar. 2010). Rezultati ovog istraživanja, kako u ekperimentalnom tako i u kliničkom delu, daju za pravo tvrdnji da je pripisivanje protektivne uloge NO[•] mimo ukupnih

promena redoks oksidativnih procesa koji postoje u neuroinflamaciji, i bez praćenja patogenetskih, kliničkih i parakliničkih korelata neuroinflamacije, jednostrana i precenjena uloga ovog medijatora.

Nedostaju veći klinički trajali posvećeni ispitivanju značaja i uloge modulatora oksidativnog i nitrozativnog stresa u humanoj neuroinflamaciji. U nekim kliničkim istraživanjima pokazan je efekat dimetilfumarata na smanjenje stvaranja NO \cdot od strane astrocita koji su izloženi dejstvu IL-1 β i INF- γ (Wilms i sar. 2010; Sattler i Bahr, 2010). Danas se koristi INF- β u tretmanu MS u cilju ostvarivanja imunomodulatorne uloge. Rezultati nedavnih kliničkih istraživanja ukazuju na pad koncentracije NO \cdot metabolita u plazmi pacijenata sa RRMS, nakon tretmana sa INF- β , koji je nakon 30 meseci bio daleko značajniji u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon 18 meseci tretmana ovim imunomodulatorom, paraleleno sa popravljajem EDSS nalaza (Stojanovic i sar. 2012). Različitost ostvarenih efekata primene NOS inhibitora može biti pripisana različitoj specifičnosti primenjenih NOS inhibitora, ali i različitom vremenu primene ovih modulatora u odnosu na tok bolesti, jer je jasno da NO \cdot ima i regulatorna i citotoksična svojstva. Činjenica je da bi primena NOS inhibitora imala puno opravdanja u ranijim fazama neuroinflamacije, i da bi idealan izbor mogao biti specifični iNOS inhibitor jer bi se njegovom primenom sačuvala fiziološka svojstva NO \cdot stvorenog dejstvom konstitutivnih NOS. Neki radovi ukazuju da protektivna dejstva nekih neurotrofičkih faktora, poput BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) vremenom postaju ograničena, jer oni stimulišu iNOS aktivnost, čime povećavaju NO \cdot i time favorizuju njegova fiziološka svojstva na početku, a potom, vremenom dolazi do pojave njegovih štetnih dejstava (Stadelmann i sar. 2002; Lameu i sar. 2012).

U eksperimentalnim uslovima je pokazan stimulatívni efekat hiperbaričnog kiseonika na povećanje antioksidativnog kapaciteta u toku inflamacije (Kang i sar. 2012). Pacijenti sa MS nakon izlaganja hiperbaričnom kiseoniku pokazivali su veću aktivnost SOD u eritrocitima čime se njihov ukupni antioksidativni potencijal povećavao. Objašnjenje za ovo stanje autori nalaze u činjenici da se u uslovima izloženosti hiperbaričnom kiseoniku u velikoj meri intenzivira stvaranje O $_2^{\cdot-}$ čime se stimuliše ekspresija SOD, a time i njen antioksidativni potencijal (Bennett i Heard, 2010; Petratos i sar. 2010).

Ključnu ulogu u povezivanju oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji ostvaruje ONOO \cdot . Stoga bi se primena protektivne terapije mogla bazirati na umanjenju nitrozativnog i oksidativnog stresa pojedinačno, ali i primeni tzv. „čistača” ONOO \cdot . Primena ovih jedinjenja uz antioksidativni tretman i primenu visoko selektivnih inhibitora iNOS predstavljala bi najefikasniji pristup s obzirom da bi se ovakvom terapijom sačuvala fiziološka svojstva NO \cdot stvorenog aktivnošću konstitutivnih NOS.

Ovakav terapijski pristup, potvrđen rezultatima ovog istraživanja, i rezultatima drugih istraživanja u kojima je ispitivan protektivni efekat antioksidanasa na ekperimentalnom modelu neuroinflamacije, opravdano otvara mogućnost testiranja ovih modulatora i u humanoj neuroinflamaciji. Vrednosti koncentracija parametara nitrozativnog i oksidativnog stresa u KIS i RRMS pacijenata i značajne korelacije sa testiranim kliničkim i parakliničkim karakteristikama neuroinflamacije, koji su dobijeni u ovom istraživanju u potpunosti daju za pravo ovakvoj tvrdnji.

6.
ZAKLJUČCI

Analizom dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Na osnovu koncentracija ispitivanih parametara, MDA, GSH, SOD, u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije postoji povećani intenzitet oksidativnog stresa u svim ispitivanim strukturama CNS, koji se nakon kontrolisane primene antioksidansa, NAC, i selektivnog inhibitora iNOS, AG, značajno smanjuje.
- Intenzitet nitrozativnog stresa, procenjen na osnovu koncentracija NO₂ i NO₃, je povećan u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije, u svim ispitivanim strukturama CNS, i značajno se smanjuje nakon kontrolisanog tretmana selektivnim inhibitorom iNOS, AG, i antioksidansom, NAC.
- Na osnovu ekspresije ispitivanih parametara u tkivu velikog mozga, iNOS, OX42, ET1, GFAP, EAAT1, u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije postoji povećana ekspresija iNOS, povećana aktivnost rezidentnih glijalnih ćelija CNS i monocita koji invadiraju tkivo CNS, kao i glutamatergička ekscitotoksičnost, što se sa primenom modulatora oksidativnog i nitrozativnog stresa, NAC i AG, smanjuje.
- Klinička prezentacija akutne faze eksperimentalne neuroinflamacije korelira sa intenzitetom oksidativnog i nitrozativnog stresa, pri čemu se u uslovima kontrolisane primene modulatora oksidativnog i nitrozativnog stresa, NAC i AG, ona značajno ublažava.
- Poređenjem protektivnih efekata AG i NAC, na oksidativni i nitrozativni profil u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije, uočen je veći efekat NAC, bez statističke značajnosti za sve ispitivane parametre.
- Poređenjem protektivnih efekata NAC i AG na imunohistohemijski i klinički nalaz u akutnoj fazi eksperimentalne neuroinflamacije nisu uočene statistički značajne razlike.
- Na osnovu opštih parametara biološko-biohemijskog sindroma inflamacije, analiziranih u plazmi i likvoru, uočeno je postojanje sistemske i inflamacije CNS, u akutnim atacima KIS i RRMS, koja je bila većeg intenziteta u KIS u odnosu na RRMS pacijente.
- Na osnovu koncentracija ispitivanih parametara, AOPP, MDA, SH grupa, SOD, u plazmi, eritrocitima i likvoru u obe grupe pacijenata, i KIS i RRMS, uočeno je postojanje sistemskog i oksidativnog stresa u CNS, pri čemu je viši stepen antioksidativne zaštite (SH grupe, u svim ispitivanim uzorcima, i SOD u eritrocitima i likvoru) uz intenzivnije oksidativno oštećenje (AOPP, MDA u plazmi i likvoru) uočen u grupi KIS pacijenata.
- Na osnovu koncentracija NO₂ i NO₃ u plazmi i likvoru uočeno je postojanje nitrozativnog stresa u CNS, u obe grupe pacijenata, i KIS i RRMS, pri čemu je intenzitet nitrozativnog stresa bio veći u KIS u odnosu na RRMS pacijente.

- Poređenjem dobijenih vrednosti za ispitivane parametre nitrozativnog i oksidativnog stresa, u svim ispitivanim vrstama uzoraka, u odnosu na starost i pol uočene su selektivne značajnosti dobijenih razlika i u KIS i RRMS grupi pacijenata, bez značajnosti razlika u odnosu na učestalost relapsa u RRMS.
- Na osnovu vrednosti testiranih parametara, veći intenzitet oksidativnog stresa je zabeležen u grupi KIS pacijenata sa nalazom oligoklonalnih traka u poređenju sa KIS pacijentima koji nisu imali ovakav nalaz.
- U obe ispitivane grupe, pacijenti sa nižim EDSS imali su manji intenzitet nitrozativnog i oksidativnog stresa i veći antioksidativni potencijal, u svim ispitivanim vrstama uzoraka, u odnosu na pacijente sa višim vrednostima EDSS.
- Dobijena je pozitivna korelacija različite statističke značajnosti između vrednosti parametara nitrozativnog stresa i oksidativnog oštećenja, u svim analiziranim vrstama uzoraka, i EDSS, uz negativnu korelaciju, takođe različite statističke značajnosti, između parametara antioksidativne zaštite i EDSS.
- U obe ispitivane grupe, pacijenti sa manjim brojem hiperintenzivnih signala u mozgu, viđenih na T₂ sekvenci na MR imali su manji intenzitet nitrozativnog i oksidativnog stresa i veći antioksidativni potencijal u svim ispitivanim uzorcima kliničkog materijala, u odnosu na pacijente sa većim brojem T₂ hiperintenzivnih signala.
- Dobijena je pozitivna korelacija različite statističke značajnosti između vrednosti parametara nitrozativnog stresa i oksidativnog oštećenja, u svim analiziranim vrstama uzoraka, i volumena Gd-vezujućih lezija viđenih na T₁ sekvenci na MR, uz negativnu korelaciju, takođe različite statističke značajnosti, između parametara antioksidativne zaštite, u svim ispitivanim medijumima, i volumena Gd-vezujućih lezija viđenih na T₁ sekvenci na MR.
- U obe ispitivane grupe, pacijenti sa kraćim trajanjem aktuelnih tegoba (KIS) i kraćom dužinom bolesti (RRMS) imali su manji intenzitet nitrozativnog i oksidativnog stresa i veći antioksidativni potencijal u svim ispitivanim vrstama uzoraka, u odnosu na pacijente sa dužim trajanjem tegoba.
- Dobijena je pozitivna korelacija različite statističke značajnosti između vrednosti parametara nitrozativnog stresa i oksidativnog oštećenja, u svim vrstama ispitivanih uzoraka, i dužine trajanja tegoba (KIS) odnosno dužine trajanja bolesti (RRMS), uz negativnu korelaciju, takođe različite statističke značajnosti, između parametara antioksidativne zaštite i dužine trajanja tegoba.
- Na osnovu rezultata sprovedene eksperimentalne i kliničke studije zaključuje se da bi modulacija neuroinflamacije posredstvom modulacije oksidativnog i nitrozativnog stresa u CNS, mogla biti potencijalno target mesto za razvoj novih terapijskih intervencija, koje bi bile usmerene na

postizanje efikasnijeg antioksidativnog i antinitrozativnog potencijala CNS, odnosno organizma u celosti.

- Ovakvim pristupom, neuroinflamacijom uzrokovane bolesti mogle bi se kontrolisati u fazi reverzibilnih neuroloških oštećenja, čime bi se prevenirale ireverzibilne promene nervnog tkiva, a time i trajni invaliditet pacijenta.
- Istovremeno, u odsustvu idealnih biomarkera neuroinflamacije, istraživani biomolekuli mogli bi biti doprinos razvoju surogat biomarkera za najraniju dijagnostiku, praćenje i procenu potencijalnog ishoda neuroinflamacije i njome posredovanih neuroloških poremećaja.

7.

LITERATURA

1. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 41–53.
2. Abo-Krysha N, Rashed L. The role of iron dysregulation in the pathogenesis of multiple sclerosis: an Egyptian study. *Mult. Scler. J.* 2008; 14(5): 602-8.
3. Abraham M, Gola J, Cometto-Muniz E, Cain W. The solvation properties of nitric oxide. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans* 2000; 2: 2067–70.
4. Acar A, Ugur Cevik M, Evliyaoglu O, Uzar E, Tamam Y, Arkanoglu A, Yucel Y, Varol S, Onder H, Taşdemir N. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg.* 2012; 112(3): 275-80.
5. Acar G. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2003; 250: 588–92.
6. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint disease. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 324-29.
7. Agace WW. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 682–92.
8. Agashivala N, Wu N, Abouzaid S, Wu Y, Kim E, Boulanger L, Brandes DW. Compliance to fingolimod and other disease modifying treatments in multiple sclerosis patients, a retrospective cohort study. *BMC Neurol.* 2013; 13: 138.
9. Agrawal SM, Williamson J, Sharma R, Kebir H, Patel K, Prat A, Yong VW. Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. *Brain* 2013; 136 (6): 1760-77.
10. Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A. Mechanisms of Oxidative Glutamate Toxicity: The Glutamate/Cystine antiporter system x_c^- as a neuroprotective Drug Target. 2010; 9 (3): 373-82.
11. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 295–311.
12. Ames AI. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* 2000; 34: 42–68.
13. Andreeva LI, Kozhemiakin LA, Kishkun AA. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo* 1988; 11: 41-3.
14. Androdias G, Reynolds R, Chanal M, Ritleng C, Confavreux C, Nataf S. Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann. Neurol.* 2010; 68: 465 –76.
15. Arend C, Brandmann M, Dringen R. The antiretroviral protease inhibitor ritonavir accelerates glutathione export from cultured primary astrocytes. *Neurochem. Res.* 2013; 38(4): 732-41.
16. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew MV, John GR. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(7): 2454-68.
17. Arnett HA, Hellendall RP, Matsushima GK, Suzuki K, Laubach VE, Sherman P, Ting JP. The protective role of nitric oxide in a neurotoxicant-induced demyelinating model. *J. Immunol.* 2002; 168: 427–33.
18. Artemiadis AK, Anagnostouli MC. Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis. *Eur. Neurol.* 2010; 63: 65–72.
19. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin. Neurol.* 2008; 28: 17–28.
20. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann. Neurol.* 2007; 61: 504–13.
21. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol.* 2007; 61: 288 –99.
22. Bachmann MF, Kopf M, Marsland BJ. Chemokines: more than just road signs. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 159–64.

23. Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit. Rev. Immunol.* 2006; 26: 149–88.
24. Bakshi R, Thompson AJ, Rocca MA, Pelletier D, Dousset V, Barkhof F, Inglesse M, Guttman CR, Horsfield MA, Filippi M. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 615–25.
25. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing-remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 458–68.
26. Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW. The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult. Scler. J.* 2006; 12: 121–32.
27. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 2004; 24: 1531–40.
28. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 904–12.
29. Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003; 991: 120–31.
30. Beck RW, Chandler DL, Cole SR, Simon JH, Jacobs LD, Kinkel RP, Selhorst JB, Rose JW, Cooper JA, Rice G, Murray TJ, Sandrock AW. Interferon beta-1a for early multiple sclerosis: CHAMPS trial subgroup analyses. *Ann. Neurol.* 2002; 51(4): 481–90.
31. Bennett M, Heard R. Hyperbaric Oxygen Therapy for Multiple Sclerosis. *CNS Neurosci. Ther.* 2010; 16 (2): 115–24.
32. Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (2): 158–70.
33. Besler HT, Comoglu S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr. Neurosci.* 2003; 6: 189–96.
34. Bisaga GN, Odinak MM, Boiko AN, Melnik YB, Popova NF. Treatment of Exacerbations of Multiple Sclerosis without the Use of Corticosteroids: The Role of Metabolic and Antioxidant Therapy. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 2012; 42 (2): 123–7.
35. Bishop A, Hobbs K, Eguchi A, Jeffrey S, Smallwood L, Pennie C, Anderson J, Estevez A. Differential sensitivity of oligodendrocytes and motor neurons to reactive nitrogen species: implications for multiple sclerosis. *J. Neurochem.* 2009; 109 (1): 93–104.
36. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123: 1174 –83.
37. Bizzozero OA, Ziegler JL, De Jesus G, Bolognani F. Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83(4): 656–67.
38. Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 2000; 48: 893–901.
39. Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14: 271–8.
40. Blanco S, Molina FJ, Castro L, Del Moral ML, Hernandez R, Jimenez A, Alma Rus A, Martinez-Lara E, Siles E, Peinado MA. Study of the nitric oxide system in the rat cerebellum during aging. *BMC Neurosci.* 2010; 11: 78.
41. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 2005; 76(2): 77–98.
42. Bo L, Esiri M, Evangelou N, Kuhlmann T. Demyelination and Remyelination in Multiple Sclerosis. *Myelin Repair and Neuroprotection in Multiple Sclerosis* 2013; 23–45.

43. Boersma BJ, D'Alessandro T, Benton MR, Kirk M, Wilson LS, Prasain J, Botting NP, Barnes S, Darley-Usmar VM, Patel RP. Neutrophil myeloperoxidase chlorinates and nitrates soy isoflavones and enhances their antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35(11): 1417-30.
44. Bongarzone ER, Pasquini JM, Soto EF. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *J. Neurosci. Res.* 1995; 41; 213–21.
45. Boullerne AI, Rodriguez JJ, Touil T, Brochet B, Schmidt S, Abrous NR, Le Moal M, Pua JR, Jensen MA, Mayo W, Arnason BGW, Petry KG. Anti-S-Nitrosocysteine antibodies are a predictive marker for demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 2002; 22 (1): 123–32.
46. Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 2983–98.
47. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Inflammatory and neuroimmunomodulatory changes in acute cerebral ischemia. *Cerebrovasc. Dis.* 2009; 27 (Suppl 1): 48–64.
48. Brex PA, Miszkil KA, O'Riordan JI, Plant GT, Moseley IF, Thompson AJ, Miller DH. Assessing the risk of early multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes: the role of a follow up MRI. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001; 70: 390–3.
49. Broniowska KA, Diers AR, Corbett JA, Hogg N. Effect of nitric oxide on naphthoquinone toxicity in endothelial cells: role of bioenergetic dysfunction and poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Biochemistry* 2013; 52(25): 4364–72.
50. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol. Neurobiol.* 2003; 27: 325–55.
51. Butterfield DA, Sultana R. Identification of 3-nitrotyrosine-modified brain proteins by redox proteomics. *Methods Enzymol.* 2008; 440: 295–308.
52. Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, Giuffrida Stella AM, Pennisi G. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J. Neurosci. Res.* 2002; 70: 580–7.
53. Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Butterfield DA, Calvani M, Pennisi G, Giuffrida Stella AM. Disruption of Thiol Homeostasis and Nitrosative Stress in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Active Multiple Sclerosis: Evidence for a Protective Role of Acetylcarnitine. *Neurochem. Res.* 2003; 28 (9): 1321–8.
54. Calabrese V, Colombrita C, Guagliano E, Sapienza M, Ravagna A, Tomaselli G, Cardile V, Scapagnini G, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM, Rizzarelli E. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem. Res.* 2005; 30: 797–807.
55. Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 1975–86.
56. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8: 766–75.
57. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Barone E, Calafato S, Bates T, Rizzarelli E, Dinkova-Kostova AT. Vitagenes, dietary antioxidants and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Front. Biosci.* 2009; 14: 376–97.
58. Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm. Res.* 2013; 30(11): 2718-28.

59. Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292: 1569–80.
60. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* 2006; 213: 48–65.
61. Castegna A, Palmieri L, Spera I, Porcelli V, Palmieri F, Fabis-Pedrini MJ, Kean RB, Barkhouse DA, Curtis MT, Hooper DC. Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroscience* 2011; 185: 97-105.
62. Chaitanya GV, Omura S, Sato F, Martinez NE, Minagar A, Ramanathan M, Guttman BW, Zivadinov R, Tsunoda I, Alexander JS. Inflammation induces neuro-lymphatic protein expression in multiple sclerosis brain neurovasculature. *J. Neuroinflamm.* 2013; 10(1): 125.
63. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* 2007; 53: 344–54.
64. Charil A, Filippi M. Inflammatory demyelination and neurodegeneration in early multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2007; 259: 7–15.
65. Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cy-clooxygenase-1 and 2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol. Sci.* 2009; 30: 174–81.
66. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Interaction between nitric oxide, reactive oxygen intermediates, and peroxy-nitrite in the regulation of 5-lipoxygenase metabo-lism. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1584: 81–90.
67. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502–17.
68. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1430–8.
69. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 2006; 129: 606 –16.
70. Contestabile A, Ciani E. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem. Int.* 2004; 45: 903–14.
71. Contestabile A, Monti B, Polazzi E. Neuronal-glia Interactions Define the Role of Nitric Oxide in Neural Functional Processes. *Curr. Neuropharmacol.* 2012; 10(4): 303-10.
72. Coote S, Hogan N, Franklin S. Falls in People With Multiple Sclerosis Who Use a Walking Aid: Prevalence, Factors, and Effect of Strength and Balance Interventions. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 2013; 94 (4): 616-21.
73. Corthals AP. Multiple sclerosis is not a disease of the immune system. *Q. Rev. Biol.* 2011; 86(4): 287-321.
74. Costello K. Multiple sclerosis research: diagnostics, disease-modifying treatments, and emerging therapies. *J. Neurosci. Nurs.* 2013; 45(6 Suppl 1): S14-23.
75. Cox GM, Kithcart AP, Pitt D, Guan Z, Alexander J, Williams JL, Shawler T, Dagia NM, Popovich PG, Satoskar AR, Whitacre CC. Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation. *J. Immunol.* 2013; 191(3): 1043-54.
76. Craner MJ, Newcombe J, Black JA, Hartle C, Cuzner ML, Waxman SG. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 8168–73.
77. Crutcher KA, Gendelman HE, Kipnis J, Perez-Polo JR, Perry VH, Pop-ovich PG, Weaver LC. Debate: "is increasing neuroinflammation beneficial for neural repair?" *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 2006; 1(3): 195-211.
78. Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 2003; 458(2): 144-57.

79. Davies U. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 9895—901.
80. de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cássia Mascarenhas Netto R, Felon SB, Penha-Silva N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J. Membr. Biol.* 2010; 233(1-3): 127-34.
81. De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD, Van Der Valk P. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997; 56: 10-20.
82. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001; 58: 65–70.
83. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423: 12–22.
84. Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr. Top. Cell Regul.* 2000; 36: 151–80.
85. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 1189–97.
86. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74(Suppl 1): S17–S24.
87. Dincić E, Zivković M, Stanković A, Obradović D, Alavantić D, Kostić V, Raicević R. Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1beta genes with multiple sclerosis in Serbian population. *J. Neuroimmunol.* 2006; 177(1-2): 146-50.
88. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective pro-teins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; 52: 128–138.
89. Drabkin DL. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* 1946; 164: 703–23.
90. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Axonal Degeneration in Multiple Sclerosis Patients. *Ann. Neurol.* 2006; 59: 478 – 89.
91. Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jacobsson P-J, Ericsson-Dahlstrand A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature* 2001; 410: 430-1.
92. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 38079–86.
93. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70–7.
94. Erden Inal M, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta* 2001; 305: 75–80.
95. Fabrick BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van DV, Dijkstra CD. CD163 positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 2005; 51: 297–305.
96. Fancy SP, Kotter MR, Harrington EP, Huang JK, Zhao C, Rowitch DH, Franklin RJ. Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. *Exp. Neurol.* 2010; 225: 18 –23.
97. Farias AS, de la Hoz C, Castro FR, Oliveira EC, Ribeiro dos Reis JR, Silva JS, Langone F, Santos LM. Nitric oxide and TNF α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. *Neuroimmunomodulat.* 2007; 14: 32–8.
98. Feligioni M, Nisticò R. SUMO: a (Oxidative) Stressed Protein. *Neuromolecular. Med.* 2013; 15(4): 707-19.

99. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393–9.
100. Fernandez O, Vermersch P. From the fundamentals of multiple sclerosis to clinical management. *J. Neurol. Sci.* 2011; 311: S1–2.
101. Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolaños JP. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 2012; 443(1): 3-11.
102. Ferraro D, Simone AM, Bedin R, Galli V, Vitetta F, Federzoni L, D'Amico R, Merelli E, Nichelli PF, Sola P. Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome. *J. Neuroimmunol.* 2013; 257(1-2): 76-81.
103. Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, Di Ludovico F, Viti B, Angeleri VA, Danni M, Provinciali L. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: A relationship with paraoxonase activity. *Mult. Scler. J.* 2005; 11: 677–82.
104. Ferretti G, Bacchetti T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2011; 311(1-2): 92-7.
105. Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 2005; 309: 392–3.
106. Fiorini A, Koudriavtseva T, Bucaj E, Coccia R, Foppoli C, Giorgi A, Schininà ME, Di Domenico F, De Marco F, Perluigi M. Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: the spectrum of oxidatively modified serum proteins detected by proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS One.* 2013; 8(6): e65184.
107. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 162 (1): 1-11.
108. Flynn RW, MacWalter RS, Doney AS. The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* 2008; 55: 250–6.
109. Forman HJ, Fukuto JM, and Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287: 246–56.
110. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol. Med.* 2003; 9: 160–8.
111. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol. Med.* 2009; 15: 391–404.
112. Freedman MS. Treatment options for patients with multiple sclerosis who have a suboptimal response to interferon- β therapy. *Eur. J. Neurol.* 2013; doi: 10.1111/ene.12299.
113. Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat. Med.* 2007; 13: 1483 –9.
114. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009; 132 (5): 1175-89.
115. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 942–55.
116. Frohman TC, Davis SL, Beh S, Greenberg BM, Remington G, Frohman EM. Uthoff's phenomena in MS clinical features and pathophysiology. *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 9: 535-40.
117. Fukuda M, Kanou F, Shimada N, Sawabe M, Saito Y, Murayama S, Hashimoto M, Maruyama N, Ishigami A. Elevated levels of 4-hydroxynonenal– histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed. Res.* 2009; 30: 227–33.
118. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28: 12–8.

119. Gallan PM, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complication. *Free Radical. Bio. Med.* 2003; 34: 1563–74.
120. Garcia J, Han D, Sancheti H, Yap LP, Kaplowitz N, Cadenas E. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 39646–54.
121. Garden GA, Moller T. Microglia biology in health and disease. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 2006; 1: 127–37.
122. Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer LA. S-Nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.* 2003; 3: 253–63.
123. Ge S, Song L, Pachter JS. Where is the blood-brain barrier... really? *J. Neurosci. Res* 2005; 79: 421–7.
124. Ghafourifar P, Mousavizadeh K, Parihar MS, Nazarewicz RR, Parihar A, Zenebe WJ. Mitochondria in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 2008; 13: 3116–26.
125. Gholipour T, Healy B, Baruch NF, Weiner HL, Chitnis T. Demographic and clinical characteristics of malignant multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 76(23): 1996-2001.
126. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol.* 2004; 251(3): 261-8.
127. Gilgun-Sherki Y, Barhum Y, Atlas D, Melamed E, Offen D. Analysis of gene expression in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with a novel brain-penetrating antioxidant. *J. Mol. Neurosci.* 2005; 27(1): 125-35.
128. Glass C, Saijo K, Winner B, Marchetto M, Gage F. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140 (6): 918-34.
129. Go YM, Jones DP. Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.* 2013; 48(2): 173-81.
130. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol. Scand.* 2011; 124: 75–84.
131. Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol. Med. Today* 2000; 6, 88–91.
132. 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 –71.
133. Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *J. Neurol. Sci.* 2008; 274: 48–53.
134. Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult. Scler. J.* 2008; 14: 22–34.
135. Gonsette RE. Endogenous neuroprotection in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg.* 2010; 110: 26–35.
136. Gosselin RD, Gibney S, O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience* 2009; 159(2): 915-25.
137. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2011; 305: 1–10.
138. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(2): 470S-4S.
139. Grinberg L, Fibach E, Amer J, Atlas D. N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radical. Bio. Med.* 2005; 38: 1136-45.
140. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 2005; 76: 126–52.
141. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 788–94.

142. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; 134: 1914-24.
143. Halldorsdottir SM, Kristinsson HG, Sveinsdottir H, Thorkelsson G, Hamaguchi PY. The effect of natural antioxidants on haemoglobin-mediated lipid oxidation during enzymatic hydrolysis of cod protein. *Food Chem.* 2013; 141(2): 914-9.
144. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, Fernald GH, Gerlitz B, Robinson WH, Baranzini SE, Grinnell BW, Raine CS, Sobel RA, HanDK, Steinman L. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 2008; 451 (7182): 1076-81.
145. Hauser SL. Multiple lessons for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 1838 –41.
146. Heather LM, Teismann P. Glutathione - a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2009; 23 (10): 3263-72.
147. Heinecke JW, Li W, Daehnke HD, Goldstein JA. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 4069–77.
148. Henderson A, Barnett M, Parratt J, Princeas J. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann. Neurol.* 2009; 66 (6): 739–53.
149. Hendrickx DA, Koning N, Schuurman KG, van Strien ME, van Eden CG, Hamann J, Huitinga I. Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2013; 72(2): 106-18.
150. Hendriks JJ, Teunissen CE, De Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 2005; 48: 185–95.
151. Herold MJ, Reichardt H. Glucocorticoid-induced apoptosis in animal models of multiple sclerosis. *Crit. Rev. Immunol.* 2013; 33(3): 183-202.
152. Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P. Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J. Alzheimers. Dis.* 2010; 20: S453–73.
153. Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14, 299 –304.
154. Hohlfeld R.ECTRIMS lecture: future challenges in MS. *Mult. Scler. J.* 2009; 15(Suppl 2): S8 – 9.
155. Hon GM, Hassan MS, van Rensburg SJ, Abel S, Marais DW, van Jaarsveld P, Smuts CM, Henning F, Erasmus RT, Matsha T. Erythrocyte membrane fatty acids in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 2009; 15(6): 759-62.
156. Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010; 69: 1017 –33.
157. Hua KF, Wang SH, Dong WC, Lin CY, Ho CL, Wu TH. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF- κ B. *Inflamm. Res.* 2012; 61(10): 1107-16.
158. Hvaring C, Vujicic S, Aasly JO, Feinstein DL, White LR, Boullerne AI. IgM to S-nitrosylated protein is found intrathecally in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2013; 256 (1-2): 77-83.
159. Ilhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37: 386–94.
160. Inglese M. Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2006; 27: 954–7.
161. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 163–9.

162. Izikson I, Klein RS, Luster AD, Weiner HL. Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin. Immunol.* 2002; 103: 125–31.
163. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP. Microglia and multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 2005; 81: 363–73.
164. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell. Biol.* 2001; 3: 193–7.
165. Jain SK, Levine NS, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 39(9): 971-75.
166. Jana A, Pahan K. Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 2007; 2: 184-93.
167. Jana A, Hogan EL, Pahan K. Ceramide and neurodegeneration: Susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *J. Neurol. Sci.* 2009; 278 (1): 5-15.
168. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, and van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45: 1–17.
169. Jia W, Jackson-Cook C, Graf MR. Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma + vaccination model. *J. Neuroimmunol.* 2010; 223 (1-2): 20-30.
170. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.* 2005; 26 (4-5): 340-52.
171. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; 345 (1-2); 91-104.
172. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G, Fisher D. Oxidative Stress and Inflammation in Brain Aging: Nutritional Considerations. *Neurochem. Res.* 2005; 30 (6-7): 927–935.
173. Jung WK, Ahn YW, Lee SH, Choi YH, Kim SK, Yea SS, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Choi IW. *Ecklonia cava* ethanolic extracts inhibit lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in BV2 microglia via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47(2): 410-7.
174. Kahl KG, Zielasek J, Utenthal LO, Rodrigo J, Toyka KV, Schmidt HH. Protective role of the cytokine-inducible isoform of nitric oxide synthase induction and nitrosative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis of the DA rat. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73: 198–205.
175. Kalyvas A, David S. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron* 2004; 41: 323–335.
176. Kamboj SS, Sandhir R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion* 2011; 11(1): 214-22.
177. Kancheva VD, Kasaikina OT. Bioantioxidants - a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. *Curr. Med. Chem.* 2013; 20(37): 4784-805.
178. Kang BH, Chen TC, Huang KL, Wan FJ. Effects of Hyperbaric Oxygen in a Murine Model of Allergic Lung Inflammation. *J. Med. Sci.* 2012; 32(2): 81-7.
179. Kaushansky N, Eisenstein M, Zilkha-Falb R, Ben-Nun A. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP) as a relevant primary target autoantigen in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2010; 9 (4): 233-6.
180. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akçay F. Effect of Corticosteroid Therapy on Serum and CSF Malondialdehyde and Antioxidant Proteins in Multiple Sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 2001; 28 (2): 141-3.
181. Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 2376–91.

182. Khan HA. N-nitro-l-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, aggravates iminodipropionitrile-induced neurobehavioral and vestibular toxicities in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2012; 64 (7-8): 791-6.
183. Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh AK, Singh I. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2005; 25(2):177-92.
184. Kidd PM. Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: prospects for its integrative management. *Altern. Med. Rev.* 2001; 6: 54066
185. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, Griffin JW, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 2002; 125: 823–34.
186. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, Snitrosylates and activates cyclooxygenase-2. *Science* 2005; 310: 1966–70.
187. Kim JH, Budde MD, Liang HF, Klein RS, Russell JH, Cross AH, Song SK. Detecting axon damage in spinal cord from a mouse model of multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2006; 21: 626 – 32.
188. Kim JY, Lee EY, Sohn HJ, Kim SW, Kim CH, Ahn HY, Kim DW, Cho SS, Seo JH. Differential expression of α B-crystallin causes maturation-dependent susceptibility of oligodendrocytes to oxidative stress. *BMB Rep.* 2013; 46(10): 501-6.
189. Kim SU, Park YH, Min JS, Sun HN, Han YH, Hua JM, Lee TH, Lee SR, Chang KT, Kang SW, Kim JM, Yu DY, Lee SH, Lee DS. Peroxiredoxin I is a ROS/p38 MAPK-dependent inducible antioxidant that regulates NF- κ B-mediated iNOS induction and microglial activation. *J. Neuroimmunol.* 2013; 259(1-2): 26-36.
190. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol.* 2013, 13: 128.
191. Kisić Tepavčević D, Pekmezović T, Stojsavljević N, Kostić J, Dujmović Basuroski I, Mesáros S, Drulović J. Predictive value of health-related quality of life in progression of disability and depression in persons with multiple sclerosis: a 3-year study. *Acta Neurol. Belg.* 2013; doi 10.1007/s13760-013-0191-9
192. Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 2009; 65: 457–69.
193. Knoferle J, Koch JC, Ostendorf T, Michel U, Planchamp V, Vutova P, Tönges L, Stadelmann C, Brück W, Bähr M, Lingor P. Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 6064–9.
194. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid. Redox Signal.* 2009; 11: 541–53.
195. Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M., Teelken A, Heersema DJ, De Keyser J. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2006; 253: 483–7.
196. Koch M, Ramsaransing GS, Fokkema MR, Heersema DJ, De Keyser J. Erythrocyte membrane fatty acids in benign and progressive forms of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2006; 244(1-2): 123-6.
197. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema D, De Keyser J. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2007; 14 (5): 529-33.

198. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein in-teractions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003; 285: 178–90.
199. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J. Physiol. Pharmacol.* 2013; 64(4): 409-21.
200. Koritschoner RS, Schweinburg F. Induktion van Paralyse und Ruckenmarksentzündung durch Immunisierung van Kaninchen met meschlichem Ruckenmarksgewebe. *Z. Immunitatsf. Exp. Therapie* 1925; 42: 217–83.
201. Kornek B, Storch M, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive and remyelinated lesions. *Amer. J. Pathol.* 2000; 157: 267 –76.
202. Krishnan AV, Kiernan MC. Sustained-release fampridine and the role of ion channel dysfunction in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 2013; 19 (4): 385-91.
203. Kronke M, Adam-Klages S. Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA2. *FEBS Lett.* 2002; 531: 18–22.
204. Kruger R, Hardt C, Tschentscher F, Jackel S, Kuhn W, Muller T, Werner J, Woitalla D, Berg D, Kuhn N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 2000; 107(5): 553-62.
205. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33; 1983: 1444–52.
206. Kurtzke JF. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys. Med. Rehabil. Clin. North Am.* 2005; 16: 327 –49.
207. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res. Rev.* 2005; 48: 196–206.
208. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 181–9.
209. Lameu C, Trujillo CA, Schwindt TT, Negraes PD, Pillat MM, Morais KLP, Lebrun I, Ulrich H. Interactions between the NO-Citrulline Cycle and Brain-derived Neurotrophic Factor in Differentiation of Neural Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 2012, 287: 29690-701.
210. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17: 210–8.
211. Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011; 585(23): 3715– 23.
212. Laurila JP, Laatikainen LE, Castellone MD, Laukkanen MO. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. *PLoS One* 2009; 4(6): e5786.
213. Leiper J, Nandi M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10(4): 277-91.
214. Leung G, Sun W, Zheng L, Brookes S, Tully M, Shi R. Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience* 2011; 173: 150-5.
215. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 678–89.
216. Lin SX, Lisi L, Dello Russo C, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, Kalinin S, Feinstein DL. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro* 2011; 3 (2) doi: 10.1042/AN20100033.
217. Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA. Cysteine regulation of protein function: as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 474–80.

218. Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 2057–66.
219. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 2004; 116: 617–28.
220. Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K. Suppression of Microglial Inflammatory Activity by Myelin Phagocytosis: Role of p47-PHOX-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* 2006; 26(50): 12904-13.
221. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic R, Stojnev S, Stevanovic I, Sokolovic D, Pavlovic D. The reduced glutathione and S-nitrosothiols levels in acute phase of experimental demyelination - pathophysiological approach and possible clinical relevancy. *Neuroscience* 2012; 219: 175-182.
222. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-75.
223. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects. Med.* 2009; 30: 42–59.
224. Lublin FD, Reingold SC. 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: 907–11.
225. Lucas M, Rodríguez MC, Gata JM, Zayas MD, Solano F, Izquierdo G. Regulation by interferon beta-1a of reactive oxygen metabolites production by lymphocytes and monocytes and serum sulfhydryls in relapsing multiple sclerosis patients. *Neurochem. Int.* 2003; 42: 67–71.
226. Lucchinetti C, Bruck 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.
227. Macco R, Pelizzoni I, Consonni A, Vitali I, Giacalone G, Martinelli Boneschi F, Codazzi F, Grohovaz F, Zacchetti D. Astrocytes acquire resistance to iron-dependent oxidative stress upon proinflammatory activation. *J. Neuroinflamm.* 2013; 10(1): 130.
228. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130: 1089–104.
229. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132, 1161–74.
230. Mahurkar S, Suppiah V, O'Doherty C. Pharmacogenomics of interferon beta and glatiramer acetate response: A review of the literature. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(2): 178-86.
231. Malabendu J, Kalipada P. Redox regulation of cytokine-mediated inhibition of myelin gene expression in human primary oligodendrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39: 823–31.
232. Mancuso C, Scapagini G, Curro` D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress re-sponse in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 2007; 12: 1107– 23.
233. Mandolesi G, Musella A, Gentile A, Grasselli G, Haji N, Sepman H, Fresegna D, Bullitta S, De Vito F, Musumeci G, Di Sanza C, Strata P, Centonze D. Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 2013; 33(29): 12105-21.
234. Marik C, Felts P, Bauer J, Lassmann H, Smith KJ. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain* 2007; 130: 2800–15.

235. Marozkina NV, Gaston B. S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; doi:10.1016/j.bbagen.2011.06.017
236. Marques C, Cheeran M, Palmquist J, Hu S, Lokensgard J. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *J. Neurovirol.* 2008; 14 (3): 229-38.
237. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.* 2004; 3: 709–18.
238. Marshall HE, Stamler JS. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 34223–8.
239. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013; 5: CD002127.
240. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2009; 11: 669–702.
241. Marusic S, Leach MW, Pelker JW, Azoitei ML, Uozumi N, Cui J, Shen MW, DeClercq CM, Miyashiro JS, Carito BA, Thakker P, Simmons DL, Leonard JP, Shimizu T, Clark JD. Cytosolic phospholipase A2 α -deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 841–51.
242. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 913-9.
243. Melzer N, Meuth SG. Disease-modifying therapy in Multiple Sclerosis and Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy: common and divergent current and future strategies. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; doi: 10.1111/cei.12195.
244. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8 (2): 162-8.
245. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol.* 2005; 4: 281–88.
246. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The Level of Isoprostanes as a Non-invasive Marker for in vivo Lipid Peroxidation in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurochem. Res.* 2011; 36 (6): 1012-6.
247. Miler E, Walczak A, Majsterek I, Kędziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J. Neuroimmunol.* 2013; doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.012
248. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun. Rev.* 2010; 9: 387-94.
249. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin. Chim. Acta* 1979; 92: 337-42.
250. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2009; 31(1): 13–29.
251. Misra HP, Fridovich J. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 3170–5.
252. Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walenzik P, Stelmasiak Z. Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. *Folia Neuropathol.* 2010; 48 (2): 116-22.
253. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis - Potentials and limitations. *Progr. Neurobiol.* 2010; 92 (3): 386-404.
254. Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 2006; 97: 1676–89.

255. Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol.* 2013; 23 (12): 644-51.
256. Moss DW, Bates TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- γ causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 13: 529-38.
257. Motoyoshi-Yamashiro A, Tamura M, Moriyama M, Takano K, Kawabe K, Nakajima H, Katoh-Semba R, Furuichi T, Nakamura Y. Activation of cultured astrocytes by amphotericin B: stimulation of NO and cytokines production and changes in neurotrophic factors production. *Neurochem. Int.* 2013; 63(2): 93-100.
258. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 13613-20.
259. Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 2005; 26(3): 349-54.
260. Muller B, Kleschyov AL, Alencar JL, Vanin A, Stoclet J-C. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002; 962: 131-9.
261. Muzhou WU, Tsirka SE. Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 2009; 57: 1204-15.
262. Nam TG. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicol. Res.* 2011; 27(1): 1-6.
263. Namaki S, Mohsenzadegan M, Mirshafiey A. Superoxide dismutase: A light horizon in treatment of multiple sclerosis. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2009; 4 (10): 585-91.
264. Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2010; 225 (1): 24-8.
265. Nath N, Morinaga O, Singh I. S-nitrosoglutathione a physiologic nitric oxide carrier attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmune. Pharm.* 2010; 2: 240-51.
266. Naughton P, Hoque M, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Interaction of heme with nitroxyl or nitric oxide amplifies heme oxygenase-1 induction: involvement of the transcription factor Nrf2. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2002; 48: 885-94.
267. Navaro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 1998; 44: 679-81.
268. Nessler S, Bruck W. Advances in multiple sclerosis research in 2009. *J. Neurol.* 2010; 257: 1590-3.
269. Nicot A, Ratnakar PV, Ron Y, Chen CC, Elkabes S. Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction. *Brain* 2003; 126: 398-412.
270. Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK. Na⁺ dependent sources of intraaxonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J. Neurosci.* 2005; 25: 9960-7.
271. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 938-52.
272. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005; 37(12): 2466-71.
273. Oksenberg JR, Baranzini SE. Multiple sclerosis genetics: is the glass half full, or half empty? *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: 429- 37.
274. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase. *J. Neuroimmunol.* 1998; 81: 201-10.

275. Oliveira SR, Kallaur AP, Simao ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, da Silva E, Cecchini R, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. *J. Neurol. Sci.* 2012; 321 (1-2): 49-53.
276. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, Macias-Islas MA, Torres-Sánchez ED. Immunology and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Clinical and Basic Approach. *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013: 708659.
277. Ouyang M, Shen X. Critical role of ASK1 in the 6- hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 2006; 97: 234–44.
278. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67: 1113–21.
279. Ozyazgan S, Andican G, Erman H, Tuzcu A, Uzun H, Onal B, Ozyazgan Y. Relation of protein oxidation parameters and disease activity in patients with Behçet's disease. *Clin. Lab.* 2013; 59(7-8): 819-25.
280. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 302–10.
281. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 315–424.
282. Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 2011; 24: 291–9.
283. Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg H, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 9566–71.
284. Paget MS, Buttner MJ. Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.* 2003; 37: 91–121.
285. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24(1): 39-48.
286. Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. *J. Neuroimmune. Pharm.* 2010; 5: 165-7.
287. Pahan K, Mondal S. Crosstalk between Nitric Oxide and T helper cells. *J. Clin. Cell Immunol.* 2012; 3: e109.
288. Paige JS, Xu G, Stancevic B, Jaffrey SR. Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chem. Biol.* 2008; 15: 1307–16.
289. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J. Neurochem.* 2011; 116: 508–21.
290. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. S-nitrosoglutathione induces ciliary neurotrophic factor expression in astrocytes, which has implications to protect the central nervous system under pathological conditions. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(6): 3831-43.
291. Pandey KB, Rizvi SI. Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009; 34: 1093-7.
292. Pandey KB, Rizvi SI. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytother. Res.* 2010; 24 (S1): S11–S14.
293. Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012; 3 (1): 2-12.
294. Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 1791–806.
295. Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R. Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp. Neurol.* 2006; 197: 373– 85.

296. Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell SR, Cho S, Ahn K. Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* 2006; 127: 369–82.
297. Park HA, Khanna S, Rink C, Gnyawali S, Roy S, Sen CK. Glutathione disulfide induces neural cell death via a 12-lipoxygenase pathway. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 1167–79.
298. Parratt JD, Prineas JW. Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult. Scler. J.* 2010; 16: 1156–72.
299. Pasichna EP, Morozova RP, Donchenko HV, Vynychuk SM, Kopchak OO. Lipid peroxidation and antioxidant defence enzyme activity in multiple sclerosis. *Ukr Biokhim Zh.* 2007; 79(5): 165-74.
300. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010; 23 (2): 75-93.
301. Pekmezovic T, Jarebinski M, Drulovic J, Stojsavljevic N, Levic Z. Survival of multiple sclerosis patients in the Belgrade population. *Neuroepidemiology* 2002; 21(5): 235-40.
302. Penga F, Yang Y, Liua J, Jianga Y, Zhua C, Denga X, Hua X, Chena X, Zhongb X. Low antioxidant status of serum uric acid, bilirubin and albumin in patients with neuromyelitis optica. *Eur. J. Neurol.* 2012; 19: 277–83.
303. Pentón-Rol G, Cervantes-Llanos M, Martínez-Sánchez G, Cabrera-Gómez JA, Valenzuela-Silva CM, Ramírez-Nuñez O, Casanova-Orta M, Robinson-Agramonte MA, Lopategui-Cabezas I, López-Saura PA. TNF- α and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. *J. Inflamm.* 2009; 6: 18.
304. Perez Gutierrez RM, Flores Cotera LB, Gonzalez AM. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules* 2012; 17(10): 11897-919.
305. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 49–62.
306. Petratos S, Azari MF, Ozturk E, Papadopoulos R, Bernard CC. Novel therapeutic targets for axonal degeneration in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010; 69: 323 –34.
307. Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RH, Cuzner ML, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 2002; 125: 1462–73.
308. Piloni NE, Fernandez V, Videla LA, Puntarulo S. Acute iron overload and oxidative stress in brain. *Toxicology* 2013; 314(1): 174-82.
309. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Med.* 2000; 6: 67 –70.
310. Pittock SJ, McClelland RL, Mayr WT, Jorgensen NW, Weinshenker BG, Noseworthy J, Rodriguez M. Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Ann. Neurol.* 2004; 56(2): 303-6.
311. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 2011; 69 (2): 292-302.
312. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J. Neurosci. Res.* 2005; 81: 374–89.
313. Popescu V, Agosta F, Hulst HE, Sluimer IC, Knol DL, Sormani MP, Enzinger C, Ropele S, Alonso J, Sastre-Garriga J, Rovira A, Montalban X, Bodini B, Ciccarelli O, Khaleeli Z, Chard DT, Matthews L, Palace J, Giorgio A, De Stefano N, Eisele P, Gass A, Polman CH, Uitdehaag BM, Messina MJ, Comi G, Filippi M, Barkhof F, Vrenken H; MAGNIMS

- Study Group. Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2013; 84(10): 1082-91.
314. Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat. Rev. Neurosci*. 2008; 9(6): 481-93.
315. Prasad R, Giri S, Nath N, Singh I, Singh AK. GSNO attenuates EAE disease by S-nitrosylation-mediated modulation of endothelial-monocyte interactions. *Glia* 2007; 55: 65–77.
316. Prineas JW, Parratt JD. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann. Neurol*. 2012; 72(1): 18-31.
317. Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal*. 2005; 7: 685–93.
318. Puca AA, Carrizzo A, Ferrario A, Villa F, Vecchione C. Endothelial nitric oxide synthase, vascular integrity and human exceptional longevity. *Immun. Ageing* 2012; 9(1): 26.
319. Puerta C, Martínez I, Baranda P, Blasco MR, Castejón R, Vargas JA, García-Merino A. Aminoguanidine reduces apoptosis of circulating V Beta 8.2 T lymphocytes in Lewis rats with actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Association with persistent inflammation of the central nervous system and lack of recovery. *J. Neuroimmunol*. 2000; 110(1-2): 140-50.
320. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur. J. Neurol*. 2006; 13: 700 –22.
321. Qi X, Lewin AS, Sun L, Hauswirth WW, Guy J. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem*. 2006; 281: 31950–62.
322. Qi X, Hauswirth WW, Guy J. Dual gene therapy with extracellular superoxide dismutase and catalase attenuates experimental optic neuritis. *Mol. Vis*. 2007; 13: 1–11.
323. Quintana FJ, Yeste A, Weiner HL, Covacu R. Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2012; 248 (1): 53-7.
324. Ramming T, Appenzeller-Herzog C. Destroy and Exploit: Catalyzed Removal of Hydroperoxides from the Endoplasmic Reticulum. *Int. J. Cell Biol*. 2013; 2013: 180906.
325. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol*. 2003; 3: 569–81.
326. Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol. Biol*. 2012; 900: 363-80.
327. Reiter T. NO chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep*. 2006; 11: 194–206.
328. Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazeron RHC, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Giovannoni G. CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63: 1439–45.
329. Remarque EJ, Bollen EL, Weverling-Rijnsburger AW, Laterveer JC, Blauw GJ, Westendorp RG. Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. *Exp. Gerontol*. 2001; 36(1): 171-6.
330. Ren R, Hashimoto T, Mizuno M, Takigawa H, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K. A lipid peroxidation product 9-oxononanoic acid induces phospholipase A2 activity and thromboxane A2 production in human blood. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2013; 52(3): 228-33.
331. Richter-Addo GB, Legzdins P, Burstyn J. Introduction: Nitric Oxide Chemistry. *Chem. Rev*. 2002; 102 (4): 857–60.
332. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med*. 1933; 58: 39–53.
333. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol*. 2009; 9(6): 429-39.

334. Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol. Biotechnol.* 2007; 37: 58-61.
335. Romero JM, Bizzozero OA. Intracellular glutathione mediates the denitrosylation of protein nitrosothiols in the rat spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 2009; 87: 701-9.
336. Rosado E, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Monclús M, Bosch J, García-Pagán JC. Interaction between NO and COX pathways modulating hepatic endothelial cells from control and cirrhotic rats. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(10): 2461-70.
337. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol. Sci.* 2001; 22: 117 – 39.
338. Rowiński R, Kozakiewicz M, Kędziora-Kornatowska K, Hübner-Woźniak E, Kędziora J. Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. *Exp. Gerontol.* 2013; 48: 1141-6.
339. Ruck T, Bittner S, Gross CC, Breuer J, Albrecht S, Korr S, Göbel K, Pankratz S, Henschel CM, Schwab N, Staszewski O, Prinz M, Kuhlmann T, Meuth SG, Wiendl H. CD4(+)NKG2D(+) T Cells Exhibit Enhanced Migratory and Encephalitogenic Properties in Neuroinflammation. *PLoS One* 2013; 8(11): e81455.
340. Rumzan R, Wang JJ, Zeng C, Chen X, Li Y, Luo T, Lv F, Wang ZP, Hou H, Huang F. Iron deposition in the precentral grey matter in patients with multiple sclerosis: a quantitative study using susceptibility-weighted imaging. *Eur. J. Radiol.* 2013; 82(2): 95-9.
341. Sadowska-Bartosz I, Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochem. Int.* 2013; 63(5): 507-16.
342. Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 929-47.
343. Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1994; 59 (2): 447-56.
344. Sajad M, Zargan J, Chawla R, Umar S, Sadaqat M, Khan H. Hippocampal neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): potential role of inflammation activated myeloperoxidase. *Mol. Cell Biochem.* 2009; 328: 183-8.
345. Sakuma H, Kohyama K, Park IK, Miyakoshi A, Tanuma N, Matsumoto Y. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats. *Brain* 2004; 127: 2201-13.
346. Salemi G, Gueli MC, Vitale F, Battaglieri F, Guglielmini E, Ragonese P, Trentacosti A, Massenti MF, Savettieri G, Bono A. Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 19-21.
347. Sarsour EH, Louise Kalen A, Goswami P. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. *Antioxid. Redox Sign.* 2013; doi:10.1089/ars.2013.5303.
348. Satoh T, Lipton SA. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci.* 2007; 1: 37-45.
349. Sattler MB, Bahr M. Future neuroprotective strategies. *Exp. Neurol.* 2010; 225: 40 -7.
350. Sbardella E, Greco A, Stromillo ML, Prosperini L, Puopolo M, Cefaro LA, Pantano P, De Stefano N, Minghetti L, Pozzilli C. Isoprostanes in clinically isolated syndrome and early multiple sclerosis as biomarkers of tissue damage and predictors of clinical course. *Mult. Scler. J.* 2012; doi: 10.1177/1352458512457721
351. Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: A novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 554-61.

352. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 3648–58.
353. Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res. Rev.* 2007; 56 (2): 322–30.
354. Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total protein bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
355. Sellebjerg F, Giovannoni G, Hand A, Madsen HO, Jensen CV, Garred P. Cerebrospinal fluid levels of nitric oxide metabolites predict response to methylprednisolone treatment in multiple sclerosis and optic neuritis. *J. Neuroimmunol.* 2002; 125: 198–203.
356. Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: Relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol. Lett.* 2010; 129: 7–12.
357. Shelton MD, Mieyal JJ. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol. Cell* 2008; 25: 332–46.
358. Sheng Y, Chattopadhyay M, Whitelegge J, Valentine JS. SOD1 aggregation and ALS: role of metallation states and disulfide status. *Curr. Top Med. Chem.* 2012; 12(22): 2560-72.
359. Shin T, Kim S, Moon C, Wie M, Kim H. Aminoguanidine-induced amelioration of autoimmune encephalomyelitis is mediated by reduced expression of inducible nitric oxide synthase in the spinal cord. *Immunol. Invest.* 2000; 29(3): 233-41.
360. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1802: 80–91.
361. Sims-Robinson C, Hur J, Hayes JM, Dauch JR, Keller PJ, Brooks SV, Feldman EL. The role of oxidative stress in nervous system aging. *PLoS One* 2013; 8(7): e68011
362. Singh I, Paintlia AS, Khan M, Stanislaus R, Paintlia MK, Haq E, Singh AK, Contreras MA. Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res.* 2004; 1022 (1-2): 1-11.
363. Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin. Lab.* 2013; 59(9-10): 945-52.
364. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002; 1: 232–41.
365. Soellner IA, Rabe J, Mauri V, Kaufmann J, Addicks K, Kuerten S. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Immunol.* 2013; 149(3PB): 519-29.
366. Sparaco M, Gaeta LM, Tozzi G, Bertini E, Pastore A, Simonati A, Santorelli FM, Piemonte F. Protein glutathionylation in human central nervous system: Potential role in redox regulation of neuronal defense against free radicals. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83: 256–63.
367. Spiro S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31: 193–211.
368. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, Lassmann H. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interaction between immune and neuronal cells? *Brain* 2002; 125: 75 – 85.
369. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, Lassmann H, Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid. Redox Sign.* 2003; 5: 577–82.
370. Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. N-acetyl-L-cysteine ameliorates the inflammatory disease process in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Autoimmune Dis.* 2005; 2(1): 4.

371. Staron A, Makosa G, Koter-Michalak M. Oxidative stress in erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012; 32: 331–4.
372. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 2010; 16: 435–52.
373. Stevanovic I, Ninkovic M, Stojanovic I, Ljubisavljevic S, Stojnev S, Bokonjic D. Beneficial effect of agmatine in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in iNOS^{-/-}-knockout mice. *Chem-Biol. Interact.* 2013; 206 (2): 309-18.
374. Stirling DP, Stys PK. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol. Med.* 2010; 16: 160 –70.
375. Stojanovic I, Ljubisavljevic S, Stevanovic I, Pavlovic R, Cvetkovic T, Djordjevic V, Pavlovic D, Vojinovic S, Basic J. Nitric oxide-mediated signalization and nitrosative stress in neuropathology. *J. Med. Biochem.* 2012; 31(4): 295-300.
376. Stys PK. White matter injury mechanisms. *Curr. Mol. Med.* 2004; 4: 113–30.
377. Stys PK. General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 3– 13.
378. Suarez AI, Lyaskovskyy V, Reek JN, van der Vlugt JI, de Bruin B. Complexes with nitrogen-centered radical ligands: classification, spectroscopic features, reactivity, and catalytic applications. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2013; 52(48): 12510-29.
379. Sullivan GM, Mierzwa AJ, Kijpaisalratana N, Tang H, Wang Y, Song SK, Selwyn R, Armstrong RC. Oligodendrocyte lineage and subventricular zone response to traumatic axonal injury in the corpus callosum. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2013; 72(12): 1106-25.
380. Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 2001; 54: 329-459.
381. Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AEG, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Mol. Brain Res.* 2003; 119 (2): 170-183.
382. Tansey MG, Wyss-Coray T. Cytokines in CNS Inflammation and Disease. In: *Central Nervous System Diseases and Inflammation*, T.E.C Edited by: Lane M, Bergmann C, Wyss-Coray T. Springer: New York; 2008: 59-106.
383. Tao F, Lu SD, Zhang LM, Huang YL, Sun FY. Role of excitatory amino acid transporter 1 in neonatal rat neuronal damage induced by hypoxia-ischemia. *Neuroscience* 2001; 102(3): 503-13.
384. Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, Gascón F, Túnez I. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin. Biochem.* 2012; 45(6): 440-4.
385. Tavazzi B, Batocchi AP, Amorini AM, Nociti V, D'Urso S, Longo S, Gullotta S, Picardi M, Lazzarin G. Serum Metabolic Profile in Multiple Sclerosis Patients. *Multiple Sclerosis International* 2011; doi:10.1155/2011/167156.
386. Thamilarasan M, Hecker M, Goertsches RH, Paap BK, Schröder I, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. Glatiramer acetate treatment effects on gene expression in monocytes of multiple sclerosis patients. *J. Neuroinflamm.* 2013; 10(1): 126.
387. Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid. Redox Sign.* 2001; 3: 273–78.
388. Tian DH, Perera CJ, Apostolopoulos V, Moalem-Taylor G. Effects of vaccination with altered Peptide ligand on chronic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Front. Neurol.* 2013; 4: 168.
389. Tiberio M, Chard DT, Altmann GR, Davies G, Griffin CM, McLean MA, Rashid W, Sastre-Garriga J, Thompson AJ, Miller DH. Metabolite changes in early relapsing-remitting multiple sclerosis. A two year follow-up study. *J. Neurol.* 2006; 253 (2): 224–30.
390. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-9.

391. Trapp BD. Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 455–57.
392. Trapp BD, Nave KA. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Ann. Rev. Neurosci.* 2008; 31: 247–69.
393. Tsuda K. Associations of oxidative stress and inflammation and their role in the regulation of membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: An electron spin resonance investigation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2012; 3; 1020-7.
394. Uccelli A, Pedemonte E, Narciso E, Mancardi G. Biological markers of the inflammatory phase of multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 2003; 24 (Suppl 5): S271-4.
395. Ullevig S, Kim HS, Asmis R. S-glutathionylation in monocyte and macrophage (dys)function. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(8): 15212-32.
396. Van der Veen RC, Roberts LJ. Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *J. Neuroimmunol.* 1999; 95: 1–7.
397. van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, de Vries HE. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45(12): 1729-37.
398. van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *BBA – Mol. Basis Dis.* 2011; 1812 (2): 141-50.
399. Vani R, Shiva CS, Devi SA. Oxidative stress in erythrocytes: a study on the effect of antioxidant mixtures during intermittent exposures to high altitude. *Int. J. Biometeorol.* 2002; 54(5): 553–62.
400. Vartanian TK. MS as a neurodegenerative disease (a thought experiment): the clinical evidence. *Adv. Stud. Med.* 2008; 8: 305 – 8.
401. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 990-7.
402. Wallberg M, Bergquist J, Achour A, Breij E, Harris RA. Malondialdehyde modification of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to increased immunogenicity and encephalitogenicity. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1986–95.
403. Waxman SG. Multiple sclerosis as a neuronal disease. Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
404. Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HPN, Issa PC, Cano M, Brandstätter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa JT, Zipfel PF, Witztum JL, Christoph J. Binder Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 2011; 478: 76–81.
405. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* 2001; 50 (2): 169-80.
406. Whiteman M, Chua YL, Zhang D, Duan W, Liou YC, Armstrong JS. Nitric oxide protects against mitochondrial permeabilization induced by glutathione depletion: role of S-nitrosylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 339: 255–62.
407. Willard SS, Koochekpour S. Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications. *Int. J. Biol. Sci.* 2013; 9(7): 728-42.
408. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J. Neuroinflamm.* 2010; 7: 30.
409. Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Diseases* 2011; doi:10.4061/2011/164608

410. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49: 1304–13.
411. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000; 80: 617–53.
412. Witte ME, Geurts JG, de Vries HE, van der Valk P, van Horssen J. Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 2010; 10: 411–8.
413. Witte ME, Bo L, Rodenburg RJ, Belien JA, Musters R, Hazes T, Wintjes LT, Smeitink JA, Geurts JJ, De Vries H., Van DV, van Horssen J. Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *J. Pathol.* 2009; 219: 193–204.
414. Wolswijk G. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 2000; 123: 105–15.
415. Woolley JF, Stanicka J, Cotter TG. Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 2013; 38(11): 556–65.
416. Wuttge DM, Bruzelius M, Stemme S. T-cell recognition of lipid peroxidation products breaks tolerance to self proteins. *Immunology* 1999; 98: 273–9.
417. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease - a double edged sword. *Neuron* 2002; 35(3): 419–32.
418. Xiang W, Weisbach V, Sticht H, Seebahn A, Bussmann J, Zimmermann R, Becker CM. Oxidative stress-induced posttranslational modifications of human hemoglobin in erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013; 529: 34–44.
419. Xu LY, Yang JS, Link H, Xiao BG. SIN-1, a Nitric Oxide Donor, Ameliorates the Time Window Rats in the Incipient Phase: The Importance of Experimental Allergic Encephalomyelitis in Lewis. *J. Immunol.* 2001; 166: 5810–6.
420. Yeagle PL. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; doi: 10.1016/j.bbamem.2013.11.009
421. Yin W, Signore AP, Iwai M, Cao G, Gao Y, Chen J. Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic–ischemic brain injury. *Stroke* 2008; 39: 3057–63.
422. Yokoyama H, Yano R, Aoki E, Kato H, Araki T. Comparative pharmacological study of free radical scavenger, nitric oxide synthase inhibitor, nitric oxide synthase activator and cyclooxygenase inhibitor against MPTP neurotoxicity in mice. *Metab. Brain Dis.* 2008; 23: 335–49.
423. Yoshida E, Mokunoa K, Aoki S, Takahashi A, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Kato K. Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *J. Neurol. Sci.* 1994; 124: 25–31.
424. Zaffaroni M. Biological indicators of the neurodegenerative phase of multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 2003; 24: 279–82.
425. Zagórski T, Dudek I, Berkan L, Mazurek M, Kedziora J, Chmielewski H. Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1991; 25 (6): 725–30.
426. Zang L, He H, Ye Y, Liu W, Fan S, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Nitric oxide augments oridonin-induced efferocytosis by human histocytic lymphoma U937 cells via autophagy and the NF- κ B-COX-2-IL-1 β pathway. *Free Radic. Res.* 2012; 46(10): 1207–19.
427. Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 2008; 131: 288 –303.
428. Zhang F, Yao SY, Whetsell WO Jr, Sriram S. Astroglipathy and oligodendroglipathy are early events in CNS demyelination. *Glia* 2013; 61(8): 1261–73.

429. Zheng H, Zhang H, Liu F, Qi Y, Jiang H. T cell-depleted splenocytes from mice pre-immunized with neuroantigen in incomplete Freund's adjuvant involved in protection from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Lett.* 2013 doi: 10.1016/j.imlet.2013.11.001.
430. Zhou P, Qian L, Iadecola C. Nitric oxide inhibits cas-pase activation and apoptotic morphology but does not rescue neuronal death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25: 348–57.
431. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64: 2202–10.
432. Zorzella-Pezavento SF, Chiuso-Minicucci F, França TG, Ishikawa LL, da Rosa LC, Marques C, Ikoma MR, Sartori A. Persistent inflammation in the CNS during chronic EAE despite local absence of IL-17 production. *Mediat. Inflamm.* 2013; 2013: 519627.

BIOGRAFIJA AUTORA

Srđan Ljubisavljević je rođen u Nišu, 1981. godine, gde je završio Osnovnu školu i Gimnaziju kao nosilac diplome *Vuk Karadžić* i priznanja *Dak generacije*. Studije medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu završio je u roku, 2007. godine, sa prosečnom ocenom 10, kao najbolji diplomirani student Univerziteta u Nišu. Tim povodom je nagrađen *Srebrnim znakom* Univerziteta i najvišim priznanjem grada Niša, nagradom *11. Januar*. U toku studija bio je stipendista republičke Fondacije za razvoj naučnog podmlatka Srbije. Akademske doktorske studije iz oblasti molekularne medicine, upisao je na Medicinskom fakultetu u Nišu, a nakon svih položenih ispita, školske 2009. godine je nastavio doktorske studije iz Kliničke medicine, oblast Neurologija. Bio je stipendista Ministarstva za nauku Srbije. Specijalističke studije iz neurologije je upisao na Medicinskom fakultetu u Nišu 2009. godine, a specijalistički ispit je položio 2013. sa odličnim uspehom. Dr Ljubisavljević govori engleski jezik.

U toku studija Dr Ljubisavljević je radio kao demonstrator na Katedri za patofiziologiju. Obavljao je funkciju studenta prodekana. Kao predstavnik Univerziteta u Nišu, u okviru Tempus projekta, učestvovao je na jednomesečnom Internacionalnom kursu iz bioetike u savremenoj medicini (2006), na Karlovom univerzitetu u Pragu. Stručni ispit za doktora medicine položio je u Beogradu 2007. godine. Kao saradnik u nastavi na Katedri za patofiziologiju primljen je 2008. godine, a 2013. je ponovo izabran u zvanje asistenta. Od 2010. Dr Ljubisavljević je stalno zaposlen na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Niš, gde aktuelno obavlja poslove specijaliste na Odeljenju za vaskularna oboljenja mozga i specijalističkoj ambulanti za glavobolje.

Dr Ljubisavljević je istraživač na podprojektu za neuronauke, projekta Ministarstva za prosvetu i nauku Srbije, *Preventivni, terapijski i etički pristup pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije*, i projektu *Učestalost MDR1 (ABCB1) C3435T, G2677T/A i C1236T genskih polimorfizama kod refraktornih oblika epilepsije*. Glavni je istraživač na projektu *Genetski i biobemijski markeri inflamatornog odgovora CNS-a kod pacijenata sa glavoboljom i bolom lica – patofiziološki pristup i mogući klinički značaj*. U periodu od 2008. do 2011. bio je istraživač na projektu Ministarstva za nauku, *Modulatori target mesta genomiksa i proteomiksa reoks ćelijske signalizacije, proliferacije i inflamacije, nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti*.

Autor je i koautor u preko 70 naučnih radova, od čega je preko 20, od kojih 13 autorskih, štampano u celosti, u časopisima citiranim u CC i SCI.

Dr Ljubisavljević je pohađao veći broj međunarodnih i domaćih kurseva, kongresa, škola i kontinuiranih edukacija. Kao stipendista Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) u toku 2012. deo specijalističkog staža iz neurologije obavio je na Neurološkoj klinici *La Sapienza* Univerziteta i Rimu (mentor prof. dr Gian Luigi Lenzi). Deo specijalističke edukacije obavio je u

Centru za glavobolje Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije (mentor doc. dr Jasna Zidverc Trajković). Kao stipendista Evropske federacije za glavobolje uspešno je završio Evropsku školu glavobolja, 2012. godine. Studijski je boravio na Institutu za biomedicinska istraživanja VMA. Bio je polaznik Evropske akademije za mlade neurologe, u Pragu (2011). Kao dobitnik više grantova od strane svetskih i evropskih federacija aktivno je učestvovao na Kongresima neurologa u Nici, Lisabonu, Budimpešti, Pragu i Barseloni.

Od strane Evropskog borda za istraživanja u oblasti neuroinflamacije i demijelinizacije (pri EFNS), Dr Ljubisavljeć je 2011. u Budimpešti nagrađen Godišnjom nagradom za najbolje istraživanje. Dobitnik je nagrade SLD za najbolju naučnu publikaciju u 2012. godini. Uspešno je završio kurs Dobre kliničke prakse. Pohađao je više od 40 seminara kontinuirane medicinske edukacije, na nekim od njih je bio predavač.

Dr Srđan Ljubisavljević je bio član Organizacionog odbora 15. Kongresa neurologa Srbije i 5. Kongresa Srpskog društva sa neuronauke (2011) i predsednik Organizacionog odbora 48. Kongresa studenata biomedicinskih nauka sa internacionalnim učešćem (2006).

Član je Sekretarijata uređivačkog odbora časopisa Acta Medica Medianae. Recenzirao je radove u više časopisa iz oblasti neuronauka (ASN Neuro, Journal of Alzheimer` Disease, Neurological Research, i dr.).

Aktivni je član Društva mladih neurologa Srbije gde obavlja funkciju koordinatora mladih neurologa za svoj region, od 2011. obavlja funkciju sekretara Neurološke sekcije Srpskog lekarskog društva. Član je Srpskog društva fiziologa i patofiziologa i Internacionalne unije fizioloških nauka, EFNS i Nacionalnog udruženja za glavobolje. Član je Lekarske komore Srbije. Član je Komisije za praćenje i unapređenje kvaliteta naučnoistraživačkog rada na Medicinskom fakultetu u Nišu.

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

IZABRANI RADOVI KOJI SE ODOSE NA TEMU DOKTORSKE DISERTACIJE

(publikovani *in extenso* u međunarodnim časopisima citiranim u CC i SCI)

1. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Stefanovic N, Pavlovic D. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. *Journal of the Neurological Sciences* 2014; 337 (1-2): 8-13.
2. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Bojanic V, Stokanovic D, Pavlovic D. The glutathione homeostasis disruption of erythrocytes, but not glutathione peroxidase activity changes, is closely accompanied with neurological and radiological scoring of acute CNS inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2014; 21: 13-20.
3. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Kocic G, Savic D, Cvetkovic T, Pavlovic D. Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. Conceptual accession: from fundamental to clinic. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2013; 33(6): 767-77.
4. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Milojkovic M, Dunjic O, Stojanov D, Pavlovic D. Association of serum bilirubin and uric acid levels changes during neuroinflammation in patients with initial and relapsed demyelization attacks. *Metabolic Brain Disease* 2013; 28: 629-38.
5. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T, Savic D, Pavlovic D. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced oxidation protein products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochemistry International* 2013; 62(7): 988-97.
6. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Milojkovic M, Sokolovic D, Stevanovic I, Petrovic A. Suppression of the lipid peroxidation process in the CNS reduces neurological expression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathologica* 2013; 51 (1): 51-7.
7. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Pavlovic R, Stojnev S, Stevanovic I, Sokolovic D, Pavlovic D. The reduced glutathione and S-nitrosothiols levels in acute phase of experimental demyelination - pathophysiological approach and possible clinical relevancy. *Neuroscience* 2012; 219: 175-82.
8. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Pavlovic R, Sokolovic D, Pavlovic D, Cvetkovic T, Stevanovic I. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 318(1-2): 106-11.
9. **Ljubisavljevic S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Milojkovic M, Vojinovic S, Sokolovic D, Stevanovic I. Correlation of nitric oxide levels in the cerebellum and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis rats with clinical symptoms. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2012; 72 (1): 33-9.

10. **Ljubisavljević S**, Stojanovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Stevanovic I. Aminoguanidine and N-acetylcysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. *Redox Report* 2011; 16 (4): 166-72.
11. Stevanovic I, Ninkovic M, Stojanovic I, **Ljubisavljević S**, Stojnev S, Bokonjic D. Beneficial effect of agmatine in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in iNOS-/- knockout mice. *Chemico-Biological Interactions* 2013; 206 (2): 309-18.
12. Stojanovic I, Djordjevic G, Pavlovic R, Djordjevic V, Pavlovic D, Cvetkovic T, **Ljubisavljević S**, Basic J, Žabar K. The importance of L-arginine metabolism modulation in diabetic patients with distal symmetric polyneuropathy. *Journal of the Neurological Science* 2013; 324 (1-2): 40-4.
13. Stojanovic I, Vojinovic S, **Ljubisavljević S**, Pavlovic R, Basic J, Pavlovic D, Ilic A, Cvetkovic T, Stukalov M. INF -β1b therapy modulates arginine and nitric oxide metabolism in patients with relapse remittent multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 323(1-2):187-92.
14. Stojanovic I, **Ljubisavljević S**, Stevanovic I, Pavlovic R, Cvetkovic T, Djordjevic V, Pavlovic D, Vojinovic S, Basic J. Nitric oxide-mediated signalization and nitrosative stress in neuropathology. *Journal of Medical Biochemistry* 2012; 31(4): 295-300.
15. Živković M, **Ljubisavljević S**. Rani serumski biomarkeri ishemijskog moždanog udara. *Vojnosanitetski Pregled* 2011; 68(1): 68-72.

PRILOG 1.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ПРОТЕКТИВНО ДЕЈСТВО МОДУЛАТОРА ОКСИДАТИВНОГ И НИТРОЗАТИВНОГ
СТРЕСА У НЕУРОИНФЛАМАЦИЈИ – ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА И КЛИНИЧКА СТАЊА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 25.02.2017.

Аутор дисертације: Срђан Јоубисављевић

Потпис докторанда:

PRILOG 2.



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: Срђан Љубицавић

Студијски програм: Клиничка медицина - неурологија

Наслов рада: Протективно дејство модулатора оксидативног и нисковолтажног
стреса у неуроинфламацији - експериментална и клиничка студија

Ментор: Проф др Ивана Стојановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 25.02.2017.

Аутор дисертације: Срђан Љубицавић

Потпис докторанда:

PRILOG 3.



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ПРОТЕКТИВНО ДЕЈСТВО МОДУЛАТОРА ОКСМАТИКНОГ И НИТРОСАТИКНОГ
СТРЕСА У НЕТРОИФЛАНАЦИЈИ – ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА И КЛИНИЧКА СТУДИЈА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 25.02.2017.

Аутор дисертације: Срђан Јовчица Ђекић

Потпис докторанда: