

ULOGA AZOTNOG OKSIDA U MULTIPLOJ SKLEROZI

Gordana Tončev
Centar za neurologiju, Klinički centar Kragujevac

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE MULTIPLE SCLEROSIS

Gordana Tonceev
Department of Neurology, Clinical Center Kragujevac

SAŽETAK

Azotni oksid (NO) je slobodni radikal otkriven u povišenim koncentracijama u inflamatornim lezijama, kakve se javljaju kod multiple skleroze (MS). Uključen u više aspekata MS: u oštećenje krvno moždane barijere (KMB), degeneraciju aksona, oštećenje oligodendrocita i demijelinizaciju, i nastanak neurološkog deficita. Međutim, svi efekti NO u MS nisu štetni. NO pokazuje i brojne korisne, imunomodulatorne efekte. Ovi dvojni efekti mogu objasniti zašto kontrola stvaranja NO nije dala očekivane rezultate u MS.

Cljučne reči: azotni oksid, multipla skleroza, demijelinizacija

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical found in raised concentrations within inflammatory lesions such as lesions in multiple sclerosis (MS). NO is involved in several aspects of MS: disruption of the blood-brain barrier, oligodendrocyte injury and demyelination, axonal degeneration, contributing in that way to the loss of function by the axonal conduction. However, the all effect of NO in MS are not deleterious. It also has a number of beneficial, immunomodulatory effects. These dual effects may explain why the control of NO production has not provided expected results in MS.

Key words: nitric oxide, multiple sclerosis, demyelination

UVOD

Multipla skleroza (MS) je hronični demijelinizacioni poremećaj centralnog nervnog sistema (CNS) koji zahvata mlade ljudi i često dovodi do invalidnosti. Bolest je nepoznate etiologije i nedovoljno jasne patogeneze. Poslednjih godina je dokazano da pored demijelinizacije u patologiji MS značajno mesto ima i oštećenje aksona. Iako su patofiziološki procesi nastanka plakova u MS dobro razrađeni, još uvek nije poznato šta pokreće patološki proces. Poslednjih godina je jako aktuelna hipoteza o oksidativnom i/ili nitrogenom stresu.

U uslovima inflamacija, kakvi se javljaju u multiploj sklerozi, dolazi do stvaranja reaktivnih oksigenih i nitrogenih vrsta u velikim koncentracijama i to uzrokuje stanje koje se naziva oksidativni i/ili nitrogeni "stres". Ovakav stres dovodi do promena u osobinama molekula koji sačinjavaju ćeliju, uzrokujući njenu smrt. Najvažniji akteri ovog stresa su u prvom redu azotni oksid, po međunarodnoj nomenklaturi označen kao NO (engleski nitric oxide) kao predstavnik nitrogenih vrsta, peroksidanjon kao predstavnik oksidativnih vrsta i peroksininitrit kao produkt njihove međusobne reakcije. Zatim, važnu ulogu igraju i vodonik peroksid, hidroksilni radikal, azot dioksid radikal, nitrozonium i nitronium joni, perhidroksilni radikal, hipohlorna kiselina i druge manje značajne vrste.

AZOTNI OKSID

Azotni oksid nastaje oksidacijom poluesencijalne aminokiseline L-arginin (2). Sintetiše se pomoću familije enzima nazvanih sintetaze azotnog oksida, a po međunarodnoj nomenklaturi (3) obeleženih kao NOS (engl. nitric oxide synthase). Do sad su poznate tri izoforme ovog enzima, dve su konstitutivne a treća se indukuje pomoću raznih stimulusa (4).

Konstitutivni izoenzim (c-NOS) koji je inicijalno otkriven u vaskularnom endotelu nazvan je endotelni (e-NOS), dok je onaj koji je inicijalno otkriven u mozgu, perifernom nervnom sistemu i kičmenoj moždini nazvan nervni (n-NOS). Izoenzim koji se indukuje inflamatornim i imunološkim stimulusima nazvan je inducibilni (i-NOS; 4).

Izoenzimi NOS su slični u strukturi sa homologijom oko 50%. Terminalne aminokiseline su jedinstvene za svaki izoenzim. Tri različita izoenzima potiču sa tri različita gena otkrivena na humanim hromozomima 12, 7 i 17 i imaju različitu molekularnu težinu. Enzimi se razlikuju po ćelijskoj/organ lokalizaciji i senzitivnosti na stimulaciju jonima kalcijuma. n-NOS i i-NOS su citozolični enzimi dok je e-NOS uglavnom (>90%) na membrani. e-NOS i n-NOS su zavisne od intracelularnih koncentracija slobodnih jona kalcijuma i kalmodulina za razliku od i-NOS.

e-NOS i n-NOS su konstitutivno ispoljeni, normalni su sastojci zdravih ćelija i sintetišu NO u kratkim vremenskim periodima (od nekoliko minuta) posle aktivacije enzima pri povišenim intracelularnim koncentracijama kalcijumovih jona (4). Stvaraju male količine NO (u pikomolarnim koncentracijama) koji svoju funkciju u ćelijama ostvaruje aktiviranjem solubilne guanilil ciklaze (5). e-NOS je inicijalno otkrivena u endotelu humanih arterija, venama, arteriolama i trombocitima i deluje kao fiziološki regulator relaksacije glatkih mišića u krvnim sudovima. e-NOS je otkrivena i u neuronima, posebno u hipokampusu. n-NOS je inicijalno otkrivena u neuronima sa ubedljivo najvećom ekspresijom u cerebelumu. Deluje, uglavnom, kao neurotransmiter. U autonomnom i perifernom nervnom sistemu otkrivena je u NANC neuronima, u retini, plućima, kardiovaskularnom sistemu, genitourinarnom traktu gastrointestinalnom traktu, senzornom sistemu. n-NOS je u poprečno prugastim mišićima lokalizovana na membranama pa je izdvojena kao novi n-NOS izoenzim (n-NOS μ). Ovaj izoenzim ima katalitičku aktivnost sličnu onom u cerebelumu ali funkcioniše isključivo u skeletnim mišićima i srcu (6).

i-NOS nije normalni sastojak ćelija već se indukuje produktima infekcije, kao što su endotoksini bakterija, egzotoksinima i inflamatornim citokinima u imunskim ćelijama, makrofagama, neutrofilima i monocitima, ali i u ćelijama vaskularnog endotela, glatkih mišića, miokarda, pluća, retine. i-NOS stvara NO u visokim, mikromolarnim koncentracijama u periodu od više časova ili dana. Tako stvoren NO može imati citotoksično, ali i citoprotektivno dejstvo.

Povezanost tri izoenzima NOS sa endotelom, neuronima i inducibilnošću nije tako jednostavna. i-NOS se može javiti konstitutivno u nekim tkivima, a za vreme hroničnih vežbi ili u trudnoći a e-NOS i n-NOS se mogu indukovati u ćelijama koje ih normalno ne ispoljavaju. Različitost izoformi NOS je do sada jedino poznato biološko objašnjenje da stvaranje malih količina NO pomoću n-NOS i e-NOS ima fiziološke funkcije u zdravom domaćinu, dok je stvaranje velikih količina NO pomoću i-NOS prisutno za vreme inflamacije i infekcije.

Azotni oksid i multipla skleroza

Danas postoje brojni dokazi da je stvaranje NO značajno povećano unutar MS lezija.

CNS normalno sadrži oba konstitutivna enzima, e-NOS i n-NOS, koji stvaraju NO u malim količinama, što utiče na regulaciju krvnog protoka i učestvuje u nekim sinaptičkim transmisijama. Stvaranje NO je značajno povećano na mestima inflamacije zbog pojave i-NOS koja normalno nije prisutna unutar CNS-a.

U inflamatornim lezijama eksperimentalnog alergijskog encefalomijelitisa (EAE), animalnog modela MS, dokazano je prisustvo i-NOS mRNA i i-NOS proteina (7) i ono je izraženije što je klinička slika teža (8).

U MS, prisustvo i-NOS mRNA pokazano je u biopsijama iz lezija demijelinizacije rano u toku razvoja simptoma (9). Prisustvo i-NOS proteina je pokazano u akutnim lezijama sa tendencijom smanjenja nivoa kako lezije postaju manje inflamatorne, ali nije pokazano u hroničnim plakovima (10). Stvaranje i-NOS zapaženo je u ćelijama makrofago-mikroglialne linije, astrocitima i u endotelnim ćelijama. U istim ćelijama je dokazano i prisustvo peroksinitrita (10).

Analize cerebrospinalnog likvora bolesnika sa MS pokazale su, sa nekoliko izuzetaka (10, 11), značajno povećanje koncentracija nitrita i/ili nitrata, markera stvaranja NO, (12-20) ali nije potvrđena korelacija sa aktivnošću bolesti. Studije su uključivale bolesnike sa aktivnom ali i one sa stabilnom fazom bolesti što može delom objasniti odsustvo ove korelacije. Međutim, kao što se moglo očekivati, nitriti i/ili nitrati bili su znatno redukovani kada su mereni mesec do dva nakon pulsne terapije kortikosteroidima. U likvoru bolesnika sa MS nađene su supstance (možda citokini) koje podstiču ćelije gliste da stvaraju NO. Nalazi u serumu MS bolesnika su različiti i to se može objasniti postojanjem perifernih izvora nitrita i nitrata, bilo zbog sistemske inflamacije ili povećanog unosa hranom. Studije su pokazale da su koncentracije nitrita i/ili nitata u serumu snižene (21), nepromenjene u grupi primarno progresivnih bolesnika (17) ili povišene (15, 22). Međutim, koncentracije nitrotirozina, markera prisustva peroksinitrita, značajno su povišene u serumu obolelih od MS (23). Urin je malo proučavan kod bolesnika sa MS. Pokazano je da su koncentracije nitrita i/ili nitrata u urinu značajno povišene, da su više kod bolesnika sa remitentnom formom bolesti nego kod onih sa progresivnom formom, ali nije pokazana korelacija sa kliničkim egzacerbacijama ili aktivnim lezijama na magnetnoj rezonanci (24).

Uloga azotnog oksida u inflamaciji i demijelinizaciji

Azotni oksid je uključen u nekoliko aspekata MS patologije. On ima:

1. direktne efekti na krvne sudove mozga i permeabilitet krvno moždane barijere (KMB)
2. direktne efekti na oštećenje oligodendrocita i mijelina
3. ulogu u nastanku neurološkog deficita
4. ulogu u direktnom oštetećenju neurona unutar sive mase
5. i korisne imunomodulatorne efekte

Direktni efekti azotnog oksida na krvne sudove mozga i krvno moždanu barijeru

Azotni oksid ima dva glavna efekta na moždane krvne sudove. To su vazodilatacija i poremećaj integriteta KMB i oba mogu igrati ulogu u patogenezi MS lezija. Vazodilatacija sama za sebe može olakšati inflamaciju smanjenjem brzine krvnog protoka što omogućava vezivanje leukocita za endotel i njihovu migraciju. U patološkim slučajevima uz vazodilataciju se javlja i poremećaj propustljivosti KMB što pomaže prolaz inflamatornih ćelija i medijatora u parenhim mozga. Integritet KMB kompromitovan je u MS na mestu inflamatornih lezija, a prolazak kontrastnog sredstva na MRI pregledu je označen kao marker inflamacije. Koncentracije nitrata i nitrita u likvoru bolesnika sa MS koreliraju sa oštećenjem KMB merenim preko albuminskog koeficijenta (5). Precizni molekularni mehanizmi koji posreduju NO indukovano oštećenje KMB su kompleksni i nedovoljno poznati ali se oštećenje KMB značajno uvećava simultanim stvaranjem reaktivnih oksigenih vrsta, uglavnom formiranjem peroksinitrita (25).

U uslovima inflamacije i-NOS je glavi izvor NO, mada i e-NOS ima brojne regulatorne efekte uglavnom inhibicijom faktora tumorske nekroze alfa (26). Tako, NO produkcija u inflamatornim uslovima može imati proinflamatorno ali i antiinflamatorno dejstvo na nivou KMB.

Oštećenje oligodendrocita

Proces demijelinizacije je obično udružen sa oštećenjem oligodendrocita, mada je stepen ovog oštećenja jako različit među obolelima (30). Mehanizmi koji leže u osnovi oštećenja oligodendrocita nisu sasvim jasni i mogu biti različiti kod različitih bolesnika (31). Na moguću ulogu NO u oštećenju oligodendrocita je ukazala opservacija in vitro, da su oligodendrociti senzitivniji na NO posredovanu toksičnost od astrocita i mikroglije pri sličnom stepenu oštećenja njihovih mitohondrija i DNA (32). NO može indukovati smrt ćelije nekrozom ili apoptozom, u zavisnosti od koncentracija NO, dužine izlaganja i stepena njihove diferencijacije (33). Neki od efekata NO na ćelije mogu biti posredovani oštećenjem DNA (34), ali NO i druge vrste mogu oštetiti oligodendrocite i aktivacijom matriksne metaloproteinaze iz proenzimskih oblika (35). Ovi enzimi mogu razgraditi komponente mijelina.

Drugi način na koji reaktivne nitrogene vrste, posebno peroksinitrit, mogu oštetiti oligodendrocite i mijelin je peroksidacija lipida (36), koja može oštetiti ne samo permeabilitet membrane već i njene proteine.

Lipidi mogu, pomoću NO i peroksinitrita, biti promenjeni u oblik koji prepoznaje makrofagni čistač receptor.

NO, svakako, ima značajnu ulogu u demijelinizaciji, ali to, verovatno, nije jedini mehanizam koji vodi do destrukcije mijelina u inflamatornim lezijama mozga.

Uloga NO u nastanku neurološkog deficita

Neurološki deficit u MS dugo je pripisivan demijelinizaciji jer je poznato da demijelinizacija oštećuje kondukciju aksona (37) i to je izgledalo kao dovoljno objašnjenje. Nekoliko studija je ukazalo da inflamacija ima značajnu ulogu i da čak sama za sebe može biti dovoljna da uzrokuje značajan klinički deficit. U inflamatornim lezijama pokazano je prisustvo i-NOS u velikoj količini (38). Postojala je sumnja da citokini mogu biti odgovorni za oštećenje kondukcije aksona. To nije eksperimentalno potvrđeno (39) ali je pokazano da citokini mogu da indukuju i-NOS unutar lezija što rezultira stvaranjem NO oko oštećenih aksona. Takva produkcija može uzrokovati kliničku egzacerbaciju jer NO može promptno i reverzibilno blokirati aksonalnu kondukciju (39,40), a demijelinizovani aksoni su posebno osetljivi na ovaj efekat (39). Pri niskim koncentracijama NO demijelinisani aksoni su zahvaćeni selektivno i to daje prihvatljivo objašnjenje za prolazne egzacerbacije ranih simptoma.

Mehanizmi kojima NO uzrokuje kondukcioni blok nisu sasvim jasni, delom zato što NO ima nekoliko efekata na aksone. Najjednostavnije objašnjenje je da NO može direktno oštetiti funkciju natrijumovih kanala i blokirati ih (41,42) i ovi efekti su pokazani (42). Pored toga, pokazani su i nitrizacija tiola jonskih kanala (41) i dejstvo cGMP (43). Međutim, NO ili nitrozotoli oštećuju i funkciju drugih kanala aksona, kalijumovih i kalcijumovih (44), i ovi efekti oštećuju sprovođenje. Iako kalcijumovi kanali nisu značajno ispoljeni duž normalno mijelinisanog dela aksona, oni se mogu javiti na mestima demijelinizacije (45) i ako se funkcionalno ispolje na membrani očekuje se da oštete sprovođenje. NO blokira kondukciju aksona indukovanjem depolarizacije aksona (46) zbog cGMP posredovanih efekata (46) ili možda direktnim efektima na pumpu (47). Depolarizacija može biti rezultat sposobnosti NO da ošteti metabolizam mitohondrija, što izaziva neadekvatnu produkciju ATP.

Azotni oksid i sinaptička transmisija

Pored moćnih efekata NO na osnovna svojstva neurona, kakva su funkcija jonskih kanala i polarizacija membrane, NO ima efekte na sinaptičku transmisiju koja ne samo da kompromituje transmisiju u motornim i u senzitivnim putevima, već pomaže da se objasni i gubitak kognitivnih funkcija kod MS bolesnika (48). Neki sinaptički efekti NO javljaju se pri relativno

niskim koncentracijama kao deo normalne fiziološke funkcije. U MS, visoke koncentracije NO se nalaze blizu sinapse zato što su inflamatorne lezije prisutne i unutar sive mase (49). Visoke koncentracije NO mogu poremetiti delikatno balansirane procese sinaptičke funkcije, ali mogu takođe direktno oštetiti NMDA i AMPA receptore (50). Nedavno je pokazano da antagonisti NMDA receptora daju zaštitu u animalnom modelu EAE (51,52).

Azotni oksid i degeneracija aksona

Degeneracija aksona je svakako značajni strukturni korelat kliničkog deficita u MS. Kako je to ireverzibilni proces, zaštita aksona je primarni terapijski cilj, što ukazuje na značaj razumevanja mehanizama koji su uključeni.

Unutar MS lezija oštećenje aksona se pojavljuje u dva stadijuma. Ekstenzivno oštećenje aksona je prisutno u akutnoj inflamatornoj demijelinizaciji (53,54) ali takođe postoji i manje intenzivna degeneracija aksona u hroničnim inaktivnim plakovima demijelinizacije (55). Mehanizmi koji leže u osnovi degeneracije nisu sasvim jasni u svakom tipu lezije. Stepenn destrukcije aksona u MS lezijama delom korelira sa brojem citotoksičnih T ćelija ali posebno sa brojem aktivisanih makrofaga (54) koje se nalaze u blizini oštećenog aksona. Inflamatorni medijatori, kakav je NO, mogu biti glavni pokretač oštećenja aksona. Ovo oštećenje je najizraženije u inflamatornim lezijama demijelinizacije, ali faktori povezani sa inflamacijom mogu takođe doprineti degeneraciji koja je zapažena i u hroničnim lezijama, gde se na terenu rezidualne inflamacije pojavljuje degeneracija aksona koja je povezana sa znacima aktivacije mikroglije. Kada stepenn akutnog oštećenja aksona u MS lezijama korelira sa stepenom inflamacije, značajna korelacija se nalazi u uzorcima svih MS plakova u raznim stadijumima razvoja, čak i u inaktivnim lezijama (48), što ukazuje da je inflamacija udružena sa oštećenjem aksona ne samo u aktivnim nego i u inaktivnim lezijama.

Izgleda da je inicijalno oštećenje aksona praćeno influksom jona kalcijuma u aksoplazmu. To rezultira aktivacijom aksonalnih proteaza i oštećenjem citoskeleta aksona (45) na način sličan koji je opisan u degeneraciji aksona kod ishemije ili traume mozga (57). Nije jasno šta uzrokuje inicijalni influks jona kalcijuma, ali nedavni nalazi ukazuju da to može nastati kao rezultat električne aktivnosti u aksonu koja nastaje kada je akson izložen koncentracijama NO koje se očekuju na mestu inflamacije. Mehanizmi nisu proučeni do detalja, ali izgleda da kalcijum ulazi u akson zbog reverzne aktivnosti natrijum-kalcijum izmenjivača, prateći porast intraaksonalnog natrijuma

(57) zbog NO posredovane inhibicije mitohondrija (58). Nedavno je pokazano da je blokatorima ili natrijumovih kanala ili natrijum-kalcijum izmenjivača moguće zaštititi akson (59).

NO može biti uključen i na drugi način, uglavnom oslobađanjem aktivnih oblika matriksnih metaloproteinaza. Takve proteaze mogu igrati ulogu u oštećenju aksona, posebno demijelinisanih (60).

NO i patologija sive mase

MS je, uglavnom, oboljanje bele mase, mada oštećenje zahvata i sivu masu i korteks (49). Iako su infiltracija makrofaga i aktivnost mikroglije manje izraženi u kortikalnim lezijama, demijelinizacija i oštećenje aksona i neurona prisutni su i u ovim ćelijama. Demijelinizacija kortikalnih aksona je pojava koja definiše kortikalne plakove, ali je prisutno i oštećenje aksona povezano sa apoptozom tela neurona (61). Stimulus za apoptozu još uvek nije poznat ali in vitro, apoptoza neurona može biti indukovana niskim koncentracijama NO (62). Neuroni su senzitivniji na NO od astrocita. Apoptoza može biti indukovana izlaganjem peroksinitritu. Međutim, interesantno je da glavni trofički faktori mogu pružiti zaštitu (63), jer neuroni mogu postati zaštićeni trofičkim faktorima dobijenim iz glijalnih ćelija ako njihovi aksoni pretrpe demijelinizaciju. Suprotno tome, izlaganje neurona visokim koncentracijama NO uzrokuje nekrozu (63).

Korisni imunomodulatorni efekti azotnog oksida

NO je dugo smatran glavnim faktorom koji povećava inflamaciju u CNS. Međutim, pokušaji terapije EAE inhibitorima NOS dali su konfuzne rezultate. Oni ukazuju da NO može s jedne strane imati proinflamatorno dejstvo oštećenjem KMB i svojim citotoksičnim svojstvima, ali da s druge strane može pomoći u kontroli imunskog odgovora preko brojnih imunoregulatornih procesa.

T ćelijski posredovana inflamacija mozga je indukovana i kontrolisana na nekoliko nivoa. Autoreaktivni T limfociti se aktiviraju na periferiji, što uključuje antigen zavisnu T ćelijsku proliferaciju i aktivaciju u perifernim limfnim tkivima. Aktivirane T ćelije mogu proći do mozga, a u procesu imunske reakcije i prisustvu lokalnog specifičnog antigena one započinju proinflamatornu kaskadu, pomoću lokalne produkcije proinflamatornih citokina. Ova kaskada započinje produkcijom hemokina u CNS-u i pojavom adhezivnih molekula na površini KMB. Ovi molekuli su tada sredstvo u regrutaciji dodatnih antigen specifičnih ćelija u mozgu, ali i u sekundarnoj infiltraciji tkiva drugim T ćelijama i efektornim ćelijama kakve su makrofage. Proinflamatorna kaskada je dobro regulisana destruk-

cijom T ćelija unutar CNS-a apoptozom (27), koja ne uključuje samo autoreaktivne T ćelije, već i one koje su nespecifično prisutne u lezijama (28). Ova destrukcija T ćelija apoptozom je efektivna bar u akutnoj monofaznoj moždanoj inflamaciji onoliko dugo koliko je potrebno novim T ćelijama da stignu do lezija iz perifernog imunskog sistema (27). NO učestvuje u inflamatornoj kaskadi na nekoliko nivoa i to je važan mehanizam kojim NO pokreće antiinflamatorna dejstva. NO može inhibirati prezentaciju antigena i proliferaciju T ćelija i tako ograničiti regrutovanje i aktivaciju za bolest specifičnih T limfocita. Dalje, kroz smanjeno ispoljavanja adhezivnih molekula NO inhibira regrutaciju ne samo T ćelija, već i makrofaga u lezije. U EAE modelu, infiltracija makrofaga u lezije određuje težinu kliničke bolesti i oštećenja tkiva (29).

NO ima ulogu i u završetku procesa inflamacije u CNS. Indukcija T ćelijske apoptoze zavisi bar delom od prisustva NO. Na taj način bi neke od imunomodulatornih aktivnosti NO i sličnih vrsta mogle biti povezane sa njihovim toksičnim dejstvom u ovom slučaju usmerenim protiv patogenih autoreaktivnih T ćelija. Imajući u vidu sve ove imunomodulatorne efekte, manje je iznenađujuće da je inhibicije sinteze NOS u EAE često štetna.

Terapija multiple skleroza zasnovana na azotnom oksidu

Izgleda da bi efektivna terapija za MS mogla biti rezultat inhibicije produkcije NO, posebno inhibicije i-NOS. Tokom poslednjih 10 godina publikacije koje su ispitivale ulogu NO u EAE nisu dale jasnu sliku. Neke studije su pokazale da selektivni inhibitori i-NOS (aminogvanidin) inhibiraju pojavu bolesti na doza zavistan način (64). Druge studije su našle da NOS inhibicija može dovesti do pogoršanja bolesti (65). Efekti inhibicije su zavisili i od vremena primene inhibitora i faze bolesti.

Može se zaključiti da je smanjenje NO u ciljnim tkivima često loše, dok je povećanje NO za vreme imunizacije delom dobro u kontroli i limitiranju imunskog odgovora. Studije su pokazale da inhibitori fosfodiesteraze (tip 4) mogu da suprimiraju EAE (67) i da mehanizam njihovog dejstva uključuje NO (68). I linoimid je pokazan kao efikasan u zaštiti životinje od EAE inhibiranjem produkcije NO u glijalnim ćelijama (69). Davanje mokraćne kiseline je takođe pokazano kao efektivna terapija za EAE (70). Ova terapija je zasnovana na čišćenju peroksinitrita i drugih reaktivnih vrsta. Istovremeno, istraživanja su pokazala da MS bolesnici imaju značajno niže vrednosti mokraćne kiseline što je dalo mogućnost da hiperuricemija može zaštititi od MS (70, 71, 72).

Međutim, pokušaj blokiranja produkcije NO nije jedini pristup limitiranju oštećenja koje uzrokuje. Mnogi od štetnih efekata pripisanih NO posredovani su u stvari peroksinitritom koji nastaje kombinacijom superoksida i NO. Zato, nije neophodno limitirati produkciju NO da bi se limitiralo stvaranje peroksinitrita. Pristup zasnovan na limitiranju stvaranja superoksida mogao bi imati dodatnu korist, jer bi ostavio netaknutim korisne efekte produkcije NO i redukovao stvaranje hidrogenperoksida koji je i sam za sebe toksičan za oligodendrocite.

Takođe je pokazano da degeneracija uzrokovana efektima NO može biti prevenirana ili inhibitorima natrijumovih kanala ili natrijum-kalcijum imenjivača. Niske doze flekainida, blokatora natrijumovih kanala, štatile su akson od degeneracije u prisustvu NO (59).

ZAKLJUČAK

Uloga NO u MS je, izgleda, mnogo komplikovanija nego što se originalno mislilo sa kompleksnom interakcijom velikog broja štetnih efekata na neurološka tkiva i korisnih regulatornih efekata na imunološki sistem. Izgleda da je uloga NO u MS fundamentalna, gde i štetni i korisni efekti imaju veliki raspon. U bolesti kakva je MS, gde različite lezije u različitim stadijumima razvoja odslikavaju različite faze imunske regulacije, jednostavna inhibicija i-NOS nije adekvatna terapija i posledice često mogu biti neočekivane. Inhibicija i-NOS može činiti pacijenta osetljivijim za invazivne mikroorganizme i tumore. Da bi se ovo izbeglo, izgleda da bi redukcija superoksida mogla biti jedan pristup, a inhibicija i-NOS uz imunomodulatornu terapiju druga mogućnost, jer bi se nadoknadio nedostatak imunomodulatornih efekata NO. Ova kombinacija već postoji u do sada najefektivnijoj postojećoj terapiji za MS, interferonu beta. Ovaj citokin nije samo imuni modulator, već inhibira ispoljavanje i-NOS u humanim astrocitima. Postoji mogućnost da bi efikasnost interferona beta mogla biti prevaziđena efektivnijim inhibitorom i-NOS zajedno sa efektivnijom imunomodulatornom komponentom.

LITERATURA

1. Smith JK, Kapoor R, Felts A. Demyelination: The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Brain Pathology 1999; 9: 69-92
2. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43:109-42
3. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric

- Oxide Research Pharmacol Rev 1997; 49 (2): 137-142
4. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-143
 5. Kiechle F, Malinski T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Pathol* 1993; 100:567-75
 6. Silvagno F, Xia H, Bredt DS. Neuronal nitric-oxide synthase, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996; 19:11204-208
 7. Koprowski H, Zheng YM, Heber Katz E et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3024-7.
 8. Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H et al. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995; 62:103-12.
 9. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:12041-5.
 10. Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998;88:45-56.
 11. Ikeda M, Sato I, Matsunaga T, Takahashi M, Yuasa T, Murota S. Cyclic guanosine monophosphate (cGMP), nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid in meningitis, multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome. *Intern Med* 1995; 34:734-7.
 12. De Bustos F, Navarro JA, de Andres C et al. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur. Neurol* 1999; 41:44-7.
 13. Brundin L, Morcos E, Olsson T, Wiklund NP, Andersson M. Increased intrathecal nitric oxide formation in multiple sclerosis; Cerebrospinal fluid nitrite as activity marker. *Eur J Neurol* 1999; 6:585-90.
 14. Giovannoni G. Cerebrospinal fluid and serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 1998; 4:27-30.
 15. Johnson AW, Land JM, Thompson EJ, Bolanos JP, Clark JB, Heales SJ. Evidence for increased nitric oxide production in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1995; 58:107.
 16. Peltola J, Ukkonen M, Moilanen E, Elovaara I. Increased nitric oxide products in CSF in primary progressive MS may reflect brain atrophy *Neurol* 2001; 57:895-6.
 17. Yamashita T, Ando Y, Obayashi K, Uchino M, Ando M. Changes in nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1997;153:32-4.
 18. Svenningsson A, Petersson A-S, Andersen O, Hansson GK. Nitric oxide metabolites in CSF of patients with MS are related to clinical disease course. *Neurology* 1999; 53:1880-2.
 19. Xiao BG, Zhang GX, Ma CG, Link H. The cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis promotes neuronal and oligodendrocyte damage by delayed production of nitric oxide in vitro. *J Neurol Sci* 1996;142:114-20.
 20. Drulović J, Dujmović I, Mesaroš Š et al. Raised cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in patients with multiple sclerosis: no correlation with disease activity. *Multiple Sclerosis* 2001;7(1):19-22
 21. Zabaleta ME, Bianco NE, De Sanctis JB. Serum nitric oxide products in patients with multiple sclerosis: Relationship with clinical activity. *Med Sci Res* 1998; 26:373-4.
 22. Giovannoni G, Heales SJ, Silver NC et al. Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1997;145:77-81.
 23. Zabaleta ME, Bianco NE, De Sanctis JB. Serum nitrotyrosine levels in patients with multiple sclerosis: Relationship with clinical activity. *Med Sci Res* 1998; 26:407-8.
 24. Giovannoni G, Silver NC, O'Riordan J et al. Increased urinary nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis correlates with early and relapsing disease. *Multiple Sclerosis* 1999; 5:335-41.
 25. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, Mork S. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 1994; 36:778-86.
 26. Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 2057-66.
 27. Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* 1993; 143:446-52.

28. Bauer J, Bradl M, Hickey WF et al. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: Destruction of T cells doesn't depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 1998;153:715-24.
29. Berger T, Weerth S, Kojima K, Linington C, Wokerle H, Lassmann H. Experimental autoimmune encephalomyelitis: The antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest* 1997;76:355-64.
30. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* (1999); 122:2279-95.
31. 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.
32. Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestrucque S, Smoll A, Merrill JE. Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. *Neuroscience* 1994; 61:575-85.
33. Boullerne AI, Nedelkoska L, Benjamins JA. Synergism of nitric oxide and iron in killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J Neurochem* 1999; 72:1050-60.
34. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263:687-9.
35. Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloprotease activation by bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biological Chemistry* 1998; 379:193-200.
36. 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.
37. Smith KJ, McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Phil Trans R Soc Lond B* 1999; 354:1649-73.
38. Coles AJ, Wing MG, Molyneux P et al. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999;46:296-304.
39. Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 1997;120:2149-57.
40. Shrager P, Custer AW, Kazarinova K, Rasband MN, Mattson D. Nerve conduction block by nitric oxide that is mediated by the axonal environment. *J Neurophysiol* 1998; 79:529-36.
41. Ahern GP, Hsu SF, Klyachko VA, Jackson MB. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; 275:28810-5.
42. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Nitric Oxide blocks fast, slow and persistent sodium currents in C-type DRG neurons by a cGMP-independent mechanism. *J. Neurophysiol* 2002; 87:761-75.
43. Sawada M, Ichinose M, Hara N. Nitric oxide induces an increased Na⁺ conductance in identified neurons of *Aplysia*. *Brain Res* 1995; 670:248-56.
44. Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey KA, Barnes S. Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* 1994; 13:315-24.
45. Kornek B, Storch MK, Bauer J et al. Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2001; 124:1114-24.
46. Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide depolarizes type II paraventricular nucleus neurons in vitro. *Neuroscience* 1997; 79:149-59.
47. Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC. Autocrine inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95:2083-8.
48. Jeffrey DR, Absher J, Pfeiffer FE, Jackson H. Cortical deficits in multiple sclerosis on the basis of subcortical lesions. *Multiple Sclerosis* 2000; 6:50-5.
49. Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122:17-26.
50. Choi Y, Lipton S. Redox modulation of NMDA receptor. *Cellular & Molecular Life Sciences* 2000; 57: 1535-41.
51. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med* 2000; 6:62-6.
52. Werner P, Pitt D, Raine CS. Glutamate excitotoxicity - A mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? *J Neural Transmission* 2000; Supp60:375-85
53. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of

- multiple sclerosis. *New Eng J Med* 1998; 338:278-85.
54. Ferguson B, Matyszak K, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120:393-9.
55. Kornek B, Storch MK, Weissert R et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: A comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 2000; 157:267-76.
56. 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.
57. Waxman SG, Black JA, Ransom BR, Stys PK. Anoxic injury of rat optic nerve: ultrastructural evidence for coupling between Na⁺ influx and Ca⁽²⁺⁾-mediated injury in myelinated CNS axons. *Brain Res* 1994;644:197-204.
58. Brorson JR, Schumacker PT, Zhang H. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. *J Neurosci* 1999; 19:147-58.
59. Kapoor R, Davies M, Blaker PA, Hall SM, Smith KJ. Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. *Ann Neurol* 2003; 53(2):174-80.
60. Anthony DC, Miller KM, Fearn S, Townsend MJ, Opendakker G, Wells G. Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat. *JNeuroimmunol* 1998; 87:62-72.
61. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neuritis, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 50:389-400
62. Lipton SA. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death & Differentiation* 1999; 6:943-51.
63. Estevez AG, Spear N, Manuel SM et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *JNeurosci* 1998;18:923-31.
64. Zhao W, Tilton RG, Corbett JA et al. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol* 1996; 64:123
65. Cowden WB, Cullen FA, Staykova MA, Willenborg DO. Nitric oxide is a potential down-regulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE. *J Neuroimmunol* 1998;88:1-8.
66. 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. *JNeuroimmunol* 1998;81:201-10.
67. Sommer N, Loschmann PA, Northoff GH et al. The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis *Nat Med* 1995;1:244-8.
68. Martinez I, Puerta C, Redondo C. Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: Sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase. *J Neurol Sci* 1999; 164:13-23.
69. Xiao G, Bail XF, Zhang X, Hedlund G, Link H. Linomide-mediated protection of oligodendrocytes is associated with inhibition of nitric oxide production and IL-1b expression in Lewis rat glial cells. *Neurosci Lett* 1998; 249:17-20.
70. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:675-80.
71. Drulovic J, Dujmovic I, Stojsavljevic N et al. Uric acid levels in sera from patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 2001; 248 (2):121-126. .
72. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol* 2002; 9(3):221-6.