

Mechanizmy neurodegeneracji i jej markery w stwardnieniu rozsianym

Mechanisms of neurodegeneration and its markers in multiple sclerosis

¹ Klinika Neurologii i Epileptologii z Oddziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej z Pododdziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Głąbiński, Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej z Pododdziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź, e-mail: aglabiniski@poczta.onet.pl

Praca finansowana z grantu promotorskiego MNiSW nr N N401 1275 33

Streszczenie

Zjawisko neurodegeneracji (utrata neuronów) jest bardzo ważnym procesem w patologii stwardnienia rozsianego (*sclerosis multiplex*, SM). Mechanizmy prowadzące do uszkodzenia neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w chorobach demielinizacyjnych i neurodegeneracyjnych nie zostały jak dotąd ostatecznie wyjaśnione. Jednym z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów prowadzących do uszkodzenia komórek nerwowych jest proces apoptozy wywołany przez enzymy zależne od jonów Ca^{2+} . W niniejszej pracy opisano prawdopodobny mechanizm prowadzący do akumulacji w komórce nerwowej jonów wapnia, a także drogę bezpośredniej i pośredniej neurodegeneracji. Droga bezpośrednia polega na uszkodzeniu neuronów przez kontaktujące się z nimi limfocyty T oraz monocyty infiltrujące ośrodkowy układ nerwowy (OUN). W procesie tym zaangażowanych jest wiele specyficznych molekuł zlokalizowanych na komórkach zapalnych (TRAIL, CD95, TNF- α , TNF- β), a także na komórkach OUN, w tym na neuronach (CD95/Fas/Apo-1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wd1-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK/Killer oraz DR6). Neurodegeneracja bezpośrednia może też być wywołana przez reaktywne formy tlenu i tlenek azotu wydzielane przez makrofagi i mikroglej w ogniskach zapalnych. Do procesu neurodegeneracji może dochodzić również na drodze pośredniej, wtórnej względem demielinizacji, która jest konsekwencją procesu zapalnego. Oprócz tego szczegółowo przedstawiono aktualną wiedzę na temat takich markerów neurodegeneracji w SM, jak neurofilamenty, przeciwciała przeciwko neurofilamentom, tubulina, aktyna i przeciwciała anti-tubulina i anti-aktyna, białko tau i fosfo-tau, 24S-hydroksycholesterol (24S-CHOH), apolipoproteina E (ApoE), białko prekursorowe amyloidu (APP), kwas N-acetyloasparaginowy (NAA), białko 14-3-3, specyficzna enolaza neuronalna (NSE) oraz białko S100B.

SŁOWA KLUCZOWE: neurodegeneracja, utrata neuronów, atrofia mózgu, stwardnienie rozsiane, markery neurodegeneracji

Summary

Neurodegeneration is a very important process in the pathology of multiple sclerosis (MS). However, mechanisms leading to neurodegeneration in MS are still poorly understood. One of the most probable mechanisms triggering damage of the neuron is apoptosis induced by calcium-dependent enzymes. This review presents the mechanism of calcium overload of neuronal cell and also describes the direct and indirect mechanisms of neurodegeneration. Direct mechanism of neurodegeneration is induced by infiltration of the central nervous system (CNS) by immune cells like T-cells and macrophages and their direct damaging interactions with neurons. Many particular molecules like TRAIL, CD95, TNF- α , TNF- β on immune cells, and CD95/Fas/Apo-1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wd1-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK/Killer and DR6 on the CNS cells are involved in this process. The direct mechanism of neurodegeneration may be also induced by ROS (reactive oxygen species) and NO (nitric oxide) produced by macrophages and microglia in inflammatory foci. Indirect, secondary mechanism of neurodegeneration is mainly induced by primary demyelination. Furthermore, this paper describes in details the current knowledge about the possible markers of neurodegeneration in MS like neurofilaments; anti-neurofilaments antibodies; tubulin, actin and anti-tubulin,

anti-actin antibodies; tau i fosfo-tau proteins; 24S-hydroxycholesterol (24S-ChOH); apolipoprotein E (ApoE); amyloid precursor protein (APP); N-acetylaspartate (NAA); 14-3-3 protein; neuron-specific enolase (NSE); and S100B (S100 calcium binding protein B).

KEY WORDS: neurodegeneration, neuronal loss, brain atrophy, multiple sclerosis, neurodegeneration markers

WPROWADZENIE

Zjawisko utraty neuronów (neurodegeneracji) nie tylko występuje w przebiegu chorób powszechnie uważanych za neurodegeneracyjne, takich jak np. choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona, ale także jest widoczne podczas rozwoju chorób zapalno-demielinizacyjnych mózgu i rdzenia kręgowego, takich jak np. stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiplex*, SM), czy niektórych chorób mózgu o podłożu wirusowym, takich jak np. demencja występująca u osób zakażonych wirusem HIV⁽¹⁻⁴⁾. Obecność zjawiska neurodegeneracji u osób chorych na SM odnotowana została po raz pierwszy już pod koniec XIX w. przez Jeana-Martina Charcota⁽⁵⁾. Przez ponad sto lat ten aspekt patologii SM był jednak pomijany przez badaczy tej choroby, którzy zajmowali się głównie rozwojem zapalenia i demielinizacji w OUN. Postęp nauki, a przede wszystkim dostępność nowych, bardziej czułych technik badawczych ponownie skierowały w ostatnich latach zainteresowanie naukowców na to zagadnienie.

MECHANIZMY ROZWOJU NEURODEGENERACJI

Mechanizmy prowadzące do uszkodzenia neuronów w OUN w chorobach neurodegeneracyjnych i demielinizacyjnych nie zostały jak dotąd ostatecznie wyjaśnione. Wydaje się, że jest to proces niejednorodny i wieloczynnikowy, gdzie poszczególne etapy mogą się na siebie nakładać, wzmagając tym samym poziom uszkodzenia tkanki nerwowej. Chociaż zjawisko obumierania neuronów obecne jest w chorobach o odmiennej patogenezie i przebiegu, takich jak np. SM⁽⁶⁾, niedokrwienny udar mózgu⁽⁷⁾ czy demencja związana z zakażeniem wirusem HIV⁽⁸⁾, przynajmniej część mechanizmów neurodegeneracji może być dla nich wspólna.

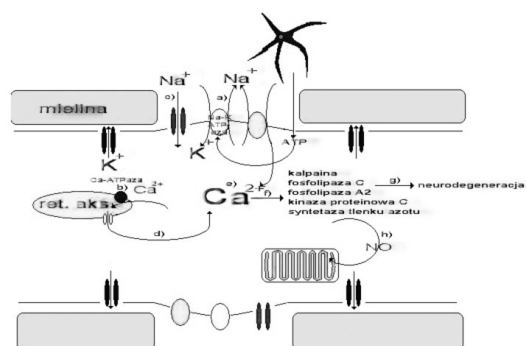
Wydaje się, iż jednym z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za proces apoptozy komórek nerwowych jest znaczny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} ⁽⁹⁾ w cytoplazmie neuronów, tzw. przeładowanie jonami wapnia (rys. 1). Podstawową funkcją neuronu jest przekazywanie impulsów wzdłuż włókien nerwowych. Proces ten zachodzi dzięki powstawaniu różnicy potencjałów między jonami Na^+ znajdującymi się na zewnątrz neuronu i jonami K^+ zlokalizowanymi w jego cytoplazmie. Do przeładowania komórki nerwowej jo-

nam Ca^{2+} może dojść w sytuacji, gdy pojawiają się zaburzenia w działaniu różnorodnych kanałów jonowych w błonie komórkowej neuronu, szczególnie tych, które zużywając energię, aktywnie uczestniczą w regulacji prawidłowej różnicy potencjałów. Do zablokowania części kanałów zużywających ATP może dojść w sytuacji niedotlenienia komórki nerwowej, np. w czasie udaru niedokrwiennego mózgu, lub gdy zostanie zablokowane jej odżywianie przez zniszczone w wyniku zapalenia oligodendrocyty, jak to ma miejsce w SM⁽¹⁰⁾. W SM także może dochodzić to sytuacji niedotlenienia komórek nerwowych w ogniskach zapalnych – dzieje się tak, dlatego że w wyniku zapalenia komórki zapalne produkują duże ilości tlenku azotu (NO)⁽¹¹⁾, który – jak udowodniono *in vitro* – hamuje transport elektronów w mitochondriach i blokuje tym samym fosforylację oksydacyjną⁽¹²⁾. Zablokowana produkcja ATP najszybciej odbija się na funkcjonowaniu Na^+K^+ -zależnej ATPazy zlokalizowanej na błonie komórkowej. Zablokowanie Na^+K^+ -zależnej ATPazy hamuje usuwanie napływających do komórki jonów Na^+ i aby je usunąć, konieczna jest ich wymiana na zasadzie antyportu z jonami Ca^{2+} , co jest pierwszym z czynników powodujących przeładowanie komórki jonami wapnia. Ponadto w komórce znajduje się jeszcze jeden enzym, którego funkcjonowanie jest zablokowane przez niedostateczną ilość energii – jest to Ca^{2+} -zależna ATPaza, SERCA (*sarcoplasmic-endoplasmic Ca^{2+} -ATPase*), zlokalizowana na retikulum aksoplazmatycznym. Jej funkcja polega na wychwytywaniu z cytoplazmy jonów Ca^{2+} , co wpływa na zwiększenie ich stężenia w aksoplazmie. Kolejnym czynnikiem powodującym przeładowanie komórki jonami Ca^{2+} jest uwolnienie ich z magazynów wewnątrzkomórkowych, czyli z retikulum aksoplazmatycznego, a dzieje się to przez zdepolaryzowane kanały Ca^{2+} typu L. Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w aksoplazmie powoduje aktywację szeregu enzymów proteolitycznych (kalpaina), lipolitycznych (fosfolipaza C, fosfolipaza A2) i kinaz białkowych (kinaza proteinowa C). Aktywacji ulega też syntetaza tlenku azotu, co wraz z aktywacją ww. enzymów może prowadzić do uszkodzenia neuronu i jego śmierci^(9,13,14) (rys. 1). Rozmieszczenie poszczególnych kanałów jonowych na neurolemmie nie jest jednakowe. W przewężeniach Ranviera znajdują się głównie kanały Na^+K^+ -zależne ATPazy, kanały usuwające z komórki jony Na^+ na zasadzie antyportu z jonami Ca^{2+} oraz kanały dla Na^+ , natomiast w przestrzeni między przewężeniami występują

kanały dla jonów K^+ . Rozmieszczenie tych kanałów pod mieliną gwarantuje, że nie zachodzi tu swobodna wymiana jonów między środowiskiem zewnętrznym a cytoplazmą, co jest konieczne dla utrzymania gradientu potencjałów⁽¹⁵⁾. W sytuacji gdy włókno nerwowe jest pozbawione mieliny, wszystkie kanały K^+ zostają odkryte i bardzo szybko dochodzi do wypływu jonów K^+ z komórki do środowiska zewnątrzkomórkowego. Przewodzenie impulsu nerwowego w zdmielinizowanym aksonie jest o wiele bardziej energochłonnym procesem niż w neuronie nieuszkodzonym. Dodatkowo zaburzony gradient jonów Na^+ i K^+ powoduje, że komórka zużywa znacznie większe ilości ATP niż normalnie, szczególnie przez Na^+ - K^+ -zależną ATPazę. Razem z upośledzoną funkcją mitochondriów wywołaną przez NO wprowadza to neuron w stan tzw. „wirtualnej hipoksji” prowadzącej do zaburzenia gospodarki jonów Ca^{2+} i w konsekwencji do uszkodzenia struktury neuronu i przerwania jego ciągłości^(9,16) (rys. 2).

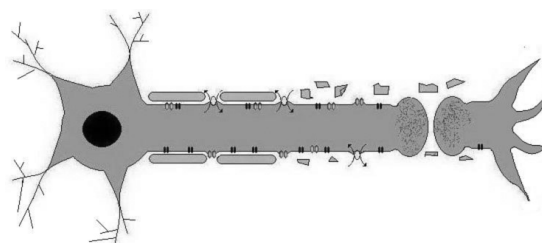
NEURODEGENERACJA NA DRODZE BEZPOŚREDNIEJ I POŚREDNIEJ

Proces neurodegeneracji w SM, a także w jego modelu zwierzęcym, czyli eksperymentalnym autoimmunizacyjnym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE), może zachodzić na drodze bezpośredniej lub pośredniej. Droga bezpośrednia polega na bezpośrednim uszkodzeniu neuro-



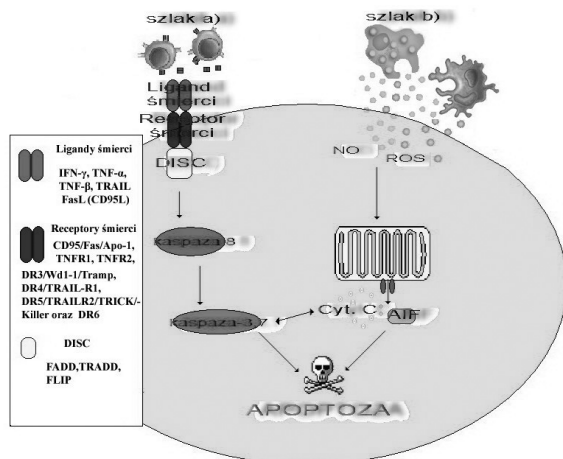
Rys. 1. Mechanizm rozwoju neurodegeneracji uzależnionej od jonów wapnia. Zahamowana produkcja ATP powoduje zatrzymanie Na^+ - K^+ -zależnej ATPazy (a) i Ca^{2+} -zależnej ATPazy (b). Dochodzi do szybkiego napływu do komórki jonów Na^+ (c). Nadmiar jonów Na^+ jest usuwany na zasadzie antyportu z jonami Ca^{2+} (c). Zdepolaryzowane kanały Ca^{2+} typu L uwalniają do aksooplazmy kolejne partie jonów wapnia z retikulum aksooplazmatycznego (d), co powoduje przeładowanie neuronu jonami wapnia (e). Wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce prowadzi do aktywacji enzymów zależnych od wapnia (f), prowadzących do uszkodzenia neuronu (g). Zwiększona produkcja NO powoduje uszkodzenie mitochondriów (h)

nów przez kontaktujące się z nimi limfocyty T oraz monocyty infiltrujące ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Mimo że infiltrujące OUN komórki zapalne nie są antygenowo specyficzne względem neuronów, może dochodzić do bezpośredniego kontaktu między nimi a neuronami. Istnieją doniesienia o infiltracji OUN przez limfocyty $CD4^+$, które posiadają zdolność do interakcji z ciałem komórki nerwowej lub z jego wypustkami, prowadząc tym samym do jej śmierci^(18,19). Molekularny mechanizm, który prowadzi do apoptozy komórek w OUN, oparty jest na interakcji tzw. ligandu śmierci ulegającego ekspresji lub uwalnianiu przez komórki zapalne z receptorem śmierci na komórce docelowej, którą mogą być neurony, oligodendrocyty lub zaktywowane autoreaktywne limfocyty $T^{(20)}$. Do tzw. ligandów śmierci wywołujących apoptozę zaliczamy takie molekuly, jak: TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), CD95 (Apo-1/Fas), a także $TNF-\alpha$ i $TNF-\beta$. Łączą się one z odpowiednimi receptorami śmierci, do których zaliczamy: CD95/Fas/Apo-1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wd1-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK/Killer oraz DR6^(20,21) (rys. 3, szlak a). Po połączeniu się ligandu śmierci z receptorem śmierci dochodzi do wzbudzenia przekaźnictwa wewnątrz komórki, tzw. DISC (*death-initiating signal complex*), opartego na obecności takich molekuł, jak: FADD (*Fas-associated death domain*), TRADD (*TNF receptor-associated DD*), FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), co ostatecznie owocuje aktywacją szlaku kaspaz (kaspaza 8., kaspaza 3., kaspaza 7.) i apoptozą komórki⁽²⁰⁾ (rys. 3, szlak a). Podobnie jak przez limfocyty $CD4^+$, proces apoptozy może być wywoływany również



Rys. 2. Mechanizm uszkodzenia neuronu wywołany przez demielinizację. W zmielinizowanym włóknie nerwowym (lewa część rysunku) większość kanałów dla jonów K^+ (kolor ciemnoszary) znajduje się pod osłonką mielinową, utrudniając im swobodny wypływ z komórki. Rozmieszczenie kanałów dla jonów Na^+ (kolor jasnoszary) jest na całym aksonie bardziej równomierne w porównaniu z kanałami dla jonów K^+ , częściej występują jednak one w przewężeniach Ranviera⁽¹⁷⁾. W zdmielinizowanym włóknie nerwowym (prawa część rysunku) kanały dla jonów K^+ są odkryte i następuje swobodny wypływ jonów K^+ z komórki. Powoduje to zaburzenie polaryzacji neuronu, znaczny wzrost zużycia ATP, stan tzw. wirtualnej hipoksji, czego konsekwencją jest uszkodzenie neuronu i przerwanie jego ciągłości

przez limfocyty CD8⁺ (22). Do bezpośredniego uszkodzenia neuronów może także dochodzić przy udziale zaktywowanych makrofagów i komórek mikrogleju. Komórki te zdolne są do produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1, IL-6, które podobnie jak w warunkach *in vitro*, mogą prowadzić do śmierci komórek nerwowych, a zwłaszcza glejowych w obecności takich cytokin, jak IFN- γ (23-25). W ogniskach zapalnych makrofagi i mikroglej zdolne są do tzw. wybuchu tlenowego, czyli uwolnienia dużych ilości wolnych rodników tlenowych, takich jak: O₂⁻, H₂O₂^{*}, OH (reactive oxygen species, ROS), a także NO (26,27) (rys. 3, szlak b). Reaktywne formy tlenu mogą wchodzić w interakcje z kwasami nukleinowymi i niszczyć w ten sposób neurony (28,29). Ponadto NO i ROS hamują oksydację fosforylacyjną (12) i powodują uwalnianie z mitochondriów cytochromu c i czynników inicjujących apoptozę – AIF (apoptosis initiating factors) (rys. 3, szlak b). Zarówno w SM, jak i w EAE zanotowano podwyższony poziom markerów stresu oksydacyjnego (30,31). Ponadto zastosowanie antyoksydantów, takich jak kwas liponowy i bilirubina, redukuje proces zapalny i neurodegenerację podczas ostrego EAE (32,33). Dodatkowo endogenne antyoksydanty, takie jak katalazy (27), metalotioneiny (34), kwas moczowy (35), hemoksygenaza-1 (36), wykazują protekcyjne działanie podczas procesów zapalnych w OUN. Kolejnym czynnikiem uwalnianym przez komórki mikrogleju i makrofagi jest glutaminian,



Rys. 3. Mechanizm uszkodzenia neuronu, oligodendrocytu lub autoreaktywnego limfocyta T wywołany przez: szlak a) – apoptoza poprzez bezpośrednie interakcje tzw. ligandów śmierci ulegających ekspresji lub uwalnianych przez komórki zapalne, np. limfocyty T, z tzw. receptorem śmierci na komórce docelowej; szlak b) – apoptoza będąca wynikiem uszkadzającego działania tlenu azotu (NO) i reaktywnych form tlenu (ROS), produkowanych w ogniskach zapalnych głównie przez makrofagi i mikroglej. NO i ROS, hamując fosforylację oksydacyjną, prowadzą do uwalniania cytochromu c i czynników inicjujących apoptozę (AIF), a tym samym do apoptozy

który jest toksyczny dla neuronów i oligodendrocytów (37,38). Przedłużona ekspozycja neuronów na glutaminian powoduje ich uszkodzenie poprzez produkcję NO, ROS, kwasu arachidonowego, fosfolipazy A2, proteaz, zwiększa też stężenie jonów Ca²⁺ w komórce (39).

Do procesu neurodegeneracji w przebiegu SM może dochodzić także na drodze wtórnej względem demielinizacji będącej konsekwencją procesu zapalnego. W ognisku zapalnym w OUN pojawiają się antygenowo specyficzne względem mieliny limfocyty T, występuje fagocytoza, produkcja cytokin zapalnych przez makrofagi i mikroglej, produkcja wolnych rodników przez komórki zapalne, wytwarzanie NO. Wszystkie te reakcje mogą powodować uszkodzenie mieliny i odsłonięcie włókna nerwowego, co z kolei może prowadzić, jak już wspomniano wcześniej (patrz rys. 2), do rozwoju neurodegeneracji wtórnej względem demielinizacji.

NEURODEGENERACJA I JEJ MARKERY W STWARDNIENIU ROZSIANYM

Stwardnienie rozsiane należy do grupy chorób zapalno-demielinizacyjnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu najprawdopodobniej autoimmunologicznym. Morfologicznie charakteryzuje się:

- zapaleniem;
- demielinizacją;
- astroglizją i oligodendropatią;
- neurodegeneracją (utrata aksonów i neuronów).

Zmiany zapalne są rozsiane w OUN i występują głównie w okolicach tzw. plak (ognisk) demielinizacyjnych. W obszarze plak spotyka się maszyną infiltrację komórkami immunokompetentnymi oraz występują różnego rodzaju rozpuszczalne związki o typie mediatorów zapalenia. Wśród komórek zapalnych największą liczbę stanowią limfocyty T o fenotypie CD3⁺CD4⁺, poza tym spotyka się limfocyty B, monocyty i makrofagi. Do rozpuszczalnych mediatorów zapalnych w ogniskach demielinizacyjnych zaliczamy m.in. cytokiny (np. TNF- α , IFN- γ), chemokiny (np. CCL5, CXCL10), białka szoku cieplnego (Hsp) i wiele innych. Pojawienie się plaki w OUN związane jest często z wystąpieniem rzutu choroby, a ze stałą progresją niesprawności w przebiegu SM związany jest proces neurodegeneracji z utratą aksonów i neuronów. Plaki demielinizacyjne zlokalizowane są głównie w obrębie istoty białej, najczęściej okołokomorowo, a ponadto w obrębie pnia mózgu i rdzenia kręgowego. Badanie mózgow pacjentów chorych na SM metodą rezonansu magnetycznego (NMR) wykazuje czasami obecność ognisk wzmacniających się po podaniu środka kontrastowego – gadoliny (40). Stwierdzono jednak, iż intensywność wzmocnienia pokontrastowego oraz ilość plak demielinizacyjnych nie koreluje z nasileniem deficytów neurologicznych w przebiegu SM. Udowodniono również, iż jednym z czynników korelujących z wystąpieniem deficytów neurologicznych

jest poziom N-acetyloaspartazy w mózgu, która mierzona jest techniką spektroskopii NMR. Poziom ten koreluje dodatkowo z nasileniem niesprawności mierzonym w skali EDSS. Bjatmar i wsp. wysnuli hipotezę, iż aksonopatia jest jednym z czynników powodujących przejście z postaci RR-MS (*remitting-relapsing MS*) w postać SP-MS (*secondary progressive MS*).

Patomechanizm neurodegeneracji w SM nie jest do końca poznany. Postuluje się jednak, iż czynnikami wywołującymi aksonopatię są destrukcyjny wpływ limfocytów T CD3⁺CD8⁺, które spotykane są w obrębie plak demielinizacyjnych, jak również zaburzenia w dystrybucji wapnia w obrębie aksonu, zaburzenia kanałów sodowych oraz brak enzymów oligodendrocytów czy białek mielinowych^(41,42).

W ciągu ostatnich lat pojawiły się liczne doniesienia na temat poszukiwań potencjalnych markerów neurodegeneracji w SM. Markery takie umożliwiłyby ocenę zaawansowania choroby i być może byłyby przydatne w ocenie skuteczności jej leczenia. Poniżej przedstawiamy wyniki dotychczasowych badań w tym zakresie.

BIAŁKA CYTOSZKIELETU AKSONÓW WYKRYWANE W SUROWICY I PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM (PMR)

• Neurofilamenty

Do białek cytoszkieletu aksonów wydzielanych do PMR i surowicy należą neurofilamenty (Nf).

Nf składają się z:

- łańcuchów lekkich (NfL, masa 68 kDa);
- łańcuchów ciężkich (NfH, masa 190-210 kDa);
- łańcuchów pośrednich (NfM, masa 150 kDa).

Łańcuchy lekkie interferują z NfH i NfM, tworząc cytoszkielet aksonu (Nf). Nf, a w szczególności stopień ich fosforylacji, są postulowane jako potencjalne markery neurodegeneracji i wykrywane w płynach ustrojowych w przebiegu SM^(43,44). Wykazano, iż stężenie Nf (NfL) w PMR pacjentów z postacią rzutową MS (RR-MS) w czasie rzutu choroby oraz u pacjentów z postacią wtórnie postępującą (SP-MS) jest podobne i jednocześnie wyższe niż u pacjentów z grupy kontrolnej. Ponadto wykazano, iż stężenie Nf w PMR jest niezależne od wieku, płci i czasu trwania choroby⁽⁴⁵⁾. Obecność łańcuchów ciężkich neurofilamentów w PMR była podobna u pacjentów z postacią pierwotnie postępującą (PP-MS), SP-MS oraz RR-MS, jednocześnie nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem tego białka a stopniem niesprawności mierzony w skali EDSS⁽⁴⁶⁾.

• Przeciwciała przeciwko neurofilamentom

Obecność przeciwciał przeciwko neurofilamentom (anty-NfL i anty-NfH) oznaczano w PMR chorych na SM. Wykazano, iż poziom tych przeciwciał nie różni się pomiędzy typami SM (PP-MS, RR-MS, SP-MS), lecz jest istotnie wyższy niż w grupach kontrolnych oraz korelu-

je dodatkowo z nasileniem atrofii mózgu w przebiegu SM mierzonej przy pomocy NMR⁽⁴⁶⁾.

• Tubulina, aktyna oraz przeciwciała anty-tubulina i anty-aktyna

Aktyna i tubulina (szczególnie podjednostki α i β) należą do najistotniejszych czynników warunkujących wzrost neuronu poprzez regulacje szlaków metabolicznych i sygnałowych zależnych od GTPaz Rho i Rac. Stężenie aktyny i tubuliny w PMR pozytywnie koreluje z nasileniem niesprawności mierzony w skali EDSS u pacjentów z postacią postępującą SM. Jednocześnie nie wykryto tubuliny i aktyny w surowicy chorych na SM. Nie stwierdzono żadnych statystycznie istotnych zależności pomiędzy poziomem przeciwciał anty-tubulina i anty-aktyna w CSF pacjentów z SM a chorymi z innymi chorobami neurologicznymi i zdrowymi ochotnikami⁽⁴⁷⁾. A zatem można uznać, iż białka te mogą być jedynie markerami progresji choroby.

• Białko tau i fosfo-tau

Białko tau zlokalizowane jest głównie w neuronach, jednakże jego obecność również stwierdzano w komórkach glejowych. Jego funkcja polega m.in. na stabilizowaniu mikrotubuli aksonów. Akumulacja białka tau w neuronach, astrocytach i oligodendrogleju prowadzi do wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych. Jak dotąd nie wykryto ekspresji tego białka w obrębie plak demielinizacyjnych w przebiegu SM⁽⁴⁸⁾. Ponadto wykazano, iż poziom białka tau w PMR jest podobny w różnych typach SM i jednocześnie jest najwyższy u pacjentów z CIS (*clinically isolated syndrome*). Wykazano również, iż poziom białka tau koresponduje z progresją choroby⁽⁴⁹⁾. Nie ma jednoznacznych doniesień potwierdzających korelację pomiędzy poziomem białek tau i fosfo-tau a nasileniem niesprawności mierzony w skali EDSS. Jak dotychczas nie ma żadnych doniesień określających poziom tego białka w surowicy w przebiegu SM.

BIAŁKA HOMEOSTAZY BŁONY AKSONU

• 24S-hydroksycholesterol (24S-ChOH)

Cholesterol jest głównym lipidem błony aksonu, a 24S-hydroksycholesterol jest metabolitem cholesterolu specyficznym dla mózgu. Powstaje w wyniku katalitycznej aktywności enzymu cytochromu P450 – CYP46, który zlokalizowany jest głównie w neuronach, ale występuje także w oligodendrocytach⁽⁵⁰⁾. Poziom 24S-ChOH w surowicy jest markerem zaburzeń cyrkulacji mózgowej frakcji cholesterolu, który może być spowodowany demielinizacją czy neurodegeneracją. W jednej z prac wykazano obniżenie poziomu 24S-ChOH w surowicy chorych na SM (PP-MS)⁽⁵¹⁾. Jednocześnie Teunissen i wsp. w swojej pracy podali, iż poziom 24S-ChOH w surowicy jest podwyższony, ale tylko u tych chorych z SM,

u których występują Gd+ – plaki demielinizacyjne w NMR. Takiej zależności nie stwierdzono u chorych niemających plak aktywnie wzmacniających się po podaniu kontrastu⁽⁵²⁾. Wzrost poziomu 24S-ChOH w PMR u chorych na SM koreluje z poziomem uszkodzenia bariery krew-mózg. 24S-ChOH jest jedynym jak dotąd znanym markerem neurodegeneracji, którego zmiany poziomu można badać w krwi obwodowej.

- **Apolipoproteina E (ApoE)**

ApoE jest białkiem zaangażowanym w transport lipidów i utrzymywanie homeostazy cholesterolowej. Krążąca ApoE związana z frakcją VLDL bierze udział w zwrotnym transporcie cholesterolu z komórek do wątroby. Wyróżniamy 3 różne allele genu dla ApoE (ε2, ε3, ε4). ApoE jest produkowana w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) przez astrocyty⁽⁵³⁾. ApoE jest także jednym z czynników warunkujących stabilność bariery krew-mózg⁽⁵⁴⁾, jak również spełnia funkcję immunomodulatora, ponieważ jej niedobór stymuluje nadmierne wytwarzanie IL-6 i TNF-α w surowicy i w tkankach po stymulacji LPS oraz hamuje ekscytotoksyczność w hodowlach komórkowych⁽⁵⁵⁾. Jak dotychczas ukazały się tylko trzy prace oceniające stężenie ApoE w płynach ustrojowych w przebiegu SM. Wyniki tych prac nie są jednoznaczne. Dwie z nich prezentują obniżenie stężenia ApoE w PMR w przebiegu SM^(56,57), natomiast trzecia podaje odwrotny wynik⁽⁵⁸⁾. Obniżenie poziomu ApoE w PMR było niezależne od fenotypu ApoE. Nie wykazano jednocześnie związku pomiędzy stężeniem ApoE a wiekiem pacjentów, płcią czy czasem trwania choroby.

INNE MARKERY NEURODEGENERACJI W PRZEBIEGU SM

- **Białko prekursorowe amyloidu (APP)**

Akumulacja APP w owoidach aksonalnych jest jednym z najczulszych markerów uszkodzenia aksonu w plakach SM. W astrocytach spotykamy formę APP770, a w neuronach APP695⁽⁵⁹⁾. Obecność APP była badana metodą ISH (*in situ hybridization*) w skrawkach mózgów chorych na SM. Wykazano obecność APP we wszystkich rodzajach plak demielinizacyjnych, jednakże największą akumulację tego białka stwierdzono w plakach aktywnych (wczesnych i późnych). Obecność APP wykrywano również w plakach nieaktywnych i tych, w których zachodziła remielinizacja. Ponadto obecność APP stwierdzono w okolicach przyplakowych i w prawidłowo wyglądającej istocie białej (*normal-appearing white matter*, NAWM)^(44,60). Ponieważ akumulacja APP występuje jedynie we wczesnej fazie formowania plaki demielinizacyjnej, ocena poziomu tego białka może być pomocna wyłącznie w prognozowaniu we wczesnej fazie choroby. Jak dotychczas nie ma żadnych prac oceniających stężenie APP w surowicy czy CSF u pacjentów z SM.

- **Kwas N-acetyloasparaginowy (NAA)**

NAA pełni najprawdopodobniej funkcję molekularnej „pompy wodnej” kontrolującej osmoregulację w neuronach. Jedna cząsteczka NAA transportuje poza neuron 32 cząsteczki wody. Poziom NAA mierzony jest obecnie przy pomocy spektroskopii NMR i odzwierciedla poziom utraty aksonów w przebiegu SM. Obniżenie poziomu NAA spotykane jest w początkowej fazie tworzenia plaki demielinizacyjnej. Poziom NAA koreluje negatywnie z nasileniem niesprawności mierzonej w skali EDSS. Ponadto poziom NAA w OUN jest sprzężony z objętością aksonu. Pośrednio poziom NAA świadczy o uszkodzeniu oligodendrocytów ze względu na fizjologiczną cyrkulację NAA pomiędzy neuronami a oligodendrocytami. Jak dotychczas nie ma żadnego doniesienia wykazującego obecność NAA w surowicy czy PMR w przebiegu SM⁽⁶¹⁾.

- **Białko 14-3-3**

Białko to występuje fizjologicznie w każdym typie komórek neuronalnych. Do dzisiaj poznano 7 izotypów tego białka. Jego funkcja nie została do końca poznana, jednakże wiadomo, iż bierze ono udział w kontroli transkrypcji, transdukcji sygnału oraz regulacji funkcji kanałów jonowych⁽⁶²⁾. Kawamoto i wsp. wykazali podwyższoną ekspresję tego białka w komórkach glejowych w plakach demielinizacyjnych w przebiegu SM. W innej pracy wykazano, iż wzrost stężenia 14-3-3 koreluje dodatkowo z nasileniem niesprawności mierzonej w skali EDSS⁽⁶³⁾. Przedstawiono również koncepcję, iż obecność 14-3-3 w PMR u pacjentów z CIS indukuje szybszą konwersję CIS do SM.

- **Specyficzna enolaza neuronalna (NSE)**

NSE jest enzymem warunkującym konwersję 2-fosfoglicerołu do fosfoenolopuryny w procesie glikolizy. Neurospecyficzną enolazą jest izoforma γ, która występuje specyficznie w neuronach oraz aksonach. NSE jest enzymem odzwierciedlającym gęstość neuronów. Nie wykazano żadnej różnicy w poziomie tego enzymu zarówno w surowicy, jak i w PMR u pacjentów z różnymi typami SM i osobami zdrowymi⁽⁶⁴⁾.

- **Białko S100B**

Białko S100B (podjednostka białka S100) występuje w OUN w komórkach glejowych. Wykazano istotny wzrost stężenia tego białka w PMR chorych na SM, szczególnie w czasie rzutu choroby (do 7. dnia rzutu choroby), jak również wzrost ekspresji tego białka w obrębie plak aktywnych w mózgu^(65,66).

PODSUMOWANIE

Zjawisko neurodegeneracji spotykane jest w wielu schorzeniach OUN. Mechanizmy prowadzące do uszkodzenia komórek nerwowych nie zostały jak dotąd do końca

poznane. Wydaje się, że w chorobach o różnej etiologii część z tych mechanizmów może być podobna. Jednym z takich mechanizmów może być neurodegeneracja wywołana przez niedotlenienie komórek nerwowych w ognisku zapalnym. Niedostateczna ilość ATP powoduje zatrzymanie aktywnych kanałów jonowych w błonie komórkowej neuronu, prowadząc do zaburzeń w polaryzacji neuronu i ostatecznie do aktywacji zależnych od wapnia enzymów indukujących apoptozę. Do aktywacji procesu apoptozy może też dojść w neuronach zdemielinizowanych. Jest to tzw. neurodegeneracja wtórna względem demielinizacji wywołana przez zaburzenia w gospodarce jonowej neuronu i jego zwiększonym zapotrzebowaniem na energię. Neurodegeneracja na drodze bezpośredniej jest wynikiem uszkadzającej aktywności infiltrujących OUN komórek zapalnych wobec neuronów. W trakcie rozwoju stwardnienia rozsianego w surowicy i PMR pacjentów obserwuje się podwyższony poziom wielu białek, które mogą być związane z procesem neurodegeneracji, jednakże nie wszystkie z nich korelują z nasileniem objawów tej choroby. Dokładniejsze poznanie mechanizmu rozwoju neurodegeneracji w chorobach OUN i jej markerów może mieć wpływ na rozwój efektywniejszych metod leczenia tych chorób.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

- Peruzzi F., Bergonzini V., Aprea S. i wsp.: Cross talk between growth factors and viral and cellular factors alters neuronal signaling pathways: implication for HIV-associated dementia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; 50: 114-125.
- DeLuca G.C., Ebers G.C., Esiri M.M.: Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts. *Brain* 2004; 127: 1009-1018.
- Yuan J., Yankner B.A.: Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-809.
- Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M. i wsp.: Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 278-285.
- Charcot M.: Histology of sclerotic plaques. *Gazette Hôpitaux* 1868; 141: 554-558.
- Trapp B.D., Bö L., Mörk S., Chang A.: Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J. Neuroimmunol.* 1999; 98: 49-56.
- Justicia C., Ramos-Cabrera P., Hoehn M.: MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 2008; 39: 1541-1547.
- Tian C., Erdmann N., Zhao J. i wsp.: HIV-infected macrophages mediate neuronal apoptosis through mitochondrial glutaminase. *J. Neurochem.* 2008; 105: 994-1005.
- Stys P.K.: General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 3-13.
- Lappe-Siefke C., Goebbels S., Gravel M. i wsp.: Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* 2003; 33: 366-374.
- Smith K.J., Lassmann H.: The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002; 1: 232-241.
- Brown G.C., Borutaite V.: Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 1440-1450.
- Taylor C.P.: Na⁺ currents that fail to inactivate. *Trends Neurosci.* 1993; 16: 455-460.
- Stys P.K., Sontheimer H., Ransom B.R., Waxman S.G.: Noninactivating, tetrodotoxin-sensitive Na⁺ conductance in rat optic nerve axons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6976-6980.
- Poliak S., Peles E.: The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 968-980.
- Stys P.K.: Axonal degeneration in multiple sclerosis: is it time for neuroprotective strategies? *Ann. Neurol.* 2004; 55: 601-603.
- Waxman S.G., Ritchie J.M.: Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann. Neurol.* 1993; 33: 121-136.
- Nitsch R., Pohl E.E., Smorodchenko A. i wsp.: Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J. Neurosci.* 2004; 24: 2458-2464.
- Aktas O., Smorodchenko A., Brocke S. i wsp.: Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 2005; 46: 421-432.
- Degterev A., Boyce M., Yuan J.: A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22: 8543-8567.
- Aktas O., Prozorovski T., Zipp F.: Death ligands and autoimmune demyelination. *Neuroscientist* 2006; 12: 305-316.
- Traugott U., Reinherz E.L., Raine C.S.: Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J. Neuroimmunol.* 1983; 4: 201-221.
- Chao C.C., Hu S., Ehrlich L., Peterson P.K.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav. Immun.* 1995; 9: 355-365.
- Chao C.C., Hu S., Sheng W.S. i wsp.: Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 1996; 16: 276-284.
- He B.P., Wen W., Strong M.J.: Activated microglia (BV-2) facilitation of TNF- α -mediated motor neuron death *in vitro*. *J. Neuroimmunol.* 2002; 128: 31-38.
- Bagasra O., Michaels F.H., Zheng Y.M. i wsp.: Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92: 12041-12045.
- Ruuls S.R., Bauer J., Sontrop K. i wsp.: Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 1995; 56: 207-217.
- Lu F., Selak M., O'Connor J. i wsp.: Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2000; 177: 95-103.
- Vladimirova O., Lu F.M., Shawver L., Kalman B.: The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. *Inflamm. Res.* 1999; 48: 412-416.
- Glabinski A., Tawsek N.S., Bartosz G.: Increased generation of superoxide radicals in the blood of MS patients. *Acta Neurol. Scand.* 1993; 88: 174-177.
- MacMicking J.D., Willenborg D.O., Weidemann M.J. i wsp.: Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute

- experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 303-307.
32. Marracci G.H., McKeon G.P., Marquardt W.E. i wsp.: α lipoic acid inhibits human T-cell migration: implications for multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 2004; 78: 362-370.
 33. Liu Y., Zhu B., Wang X. i wsp.: Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2003; 139: 27-35.
 34. Penkowa M., Hidalgo J.: Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 2003; 72: 574-586.
 35. Spitsin S.V., Scott G.S., Mikheeva T. i wsp.: Comparison of uric acid and ascorbic acid in protection against EAE. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 1363-1371.
 36. Emerson M.R., LeVine S.M.: Heme oxygenase-1 and NADPH cytochrome P450 reductase expression in experimental allergic encephalomyelitis: an expanded view of the stress response. *J. Neurochem.* 2000; 75: 2555-2562.
 37. Choi D.W., Koh J.Y., Peters S.: Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* 1988; 8: 185-196.
 38. Li S., Stys P.K.: Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.* 2000; 20: 1190-1198.
 39. Holt W.F.: Glutamate in health and disease: the role of inhibitors. W: Bar P.R., Beal M.F. (red.): *Neuroprotection in CNS Diseases.* Marcel Dekker, New York 1997: 87-119.
 40. Brück W., Stadelmann C.: The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr. Opin. Neurol.* 2005; 18: 221-224.
 41. Kornek B., Storch M.K., Bauer J. i wsp.: Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2001; 124: 1114-1124.
 42. Moll C., Mourre C., Lazdunski M., Ulrich J.: Increase of sodium channels in demyelinated lesions of multiple sclerosis. *Brain Res.* 1991; 556: 311-316.
 43. Mancardi G., Hart B., Roccatagliata L. i wsp.: Demyelination and axonal damage in a non-human primate model of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2001; 184: 41-49.
 44. Kornek B., Storch M.K., Weissert R. i wsp.: Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 267-276.
 45. Lycke J.N., Karlsson J.E., Andersen O., Rosengren L.E.: Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1998; 64: 402-404.
 46. Norgren N., Rosengren L., Stigbrand T.: Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.* 2003; 987: 25-31.
 47. Eikelenboom M.J., Petzold A., Lazeron R.H. i wsp.: Multiple sclerosis: neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 2003; 60: 219-223.
 48. Spillantini M.G., Murrell J.R., Goedert M. i wsp.: Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 7737-7741.
 49. Martínez-Yélamos A., Saiz A., Bas J. i wsp.: Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 2004; 363: 14-17.
 50. Belting M., Petersson P.: Protective role for proteoglycans against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency *in vitro*. *Biochem. J.* 1999; 342: 281-286.
 51. Leoni V., Masterman T., Diczfalusy U. i wsp.: Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 2002; 331: 163-166.
 52. Teunissen C.E., Dijkstra C.D., Polman C.H. i wsp.: Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 2003; 347: 159-162.
 53. Reiber H.: Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 2001; 310: 173-186.
 54. Mauch D.H., Nägler K., Schumacher S. i wsp.: CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 2001; 294: 1354-1357.
 55. Lynch J.R., Tang W., Wang H. i wsp.: APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 48529-48533.
 56. Brooks J.B., Kasin J.V., Fast D.M., Daneshvar M.I.: Detection of metabolites by frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography in serum and cerebrospinal fluid of a patient with Nocardia infection. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 445-448.
 57. Gaillard O., Gervais A., Meillet D. i wsp.: Apolipoprotein E and multiple sclerosis: a biochemical and genetic investigation. *J. Neurol. Sci.* 1998; 158: 180-186.
 58. Gelman B.B., Rifai N., Christenson R.H., Silverman L.M.: Cerebrospinal fluid and plasma apolipoproteins in patients with multiple sclerosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1988; 18: 46-52.
 59. Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C.: Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 2003; 70: 1-32.
 60. Ferguson B., Matyszak M.K., Esiri M.M., Perry V.H.: Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393-399.
 61. Stefano G.B., Cadet P., Rialas C.M. i wsp.: Invertebrate opiate immune and neural signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 521: 126-147.
 62. Berg D., Holzmann C., Riess O.: 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 752-762.
 63. Satoh J., Yukitake M., Kurohara K. i wsp.: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. *J. Neurol. Sci.* 2003; 212: 11-20.
 64. Royds J.A., Davies-Jones G.A., Lewtas N.A. i wsp.: Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1983; 46: 1031-1036.
 65. Missler U., Wandinger K.P., Wiesmann M. i wsp.: Acute exacerbation of multiple sclerosis increases plasma levels of S-100 protein. *Acta Neurol. Scand.* 1997; 96: 142-144.
 66. Petzold A., Eikelenboom M.J., Gveric D. i wsp.: Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 2002; 125: 1462-1473.