

Stres oksydacyjny w patogenezie stwardnienia rozsianego. Nowe możliwości terapeutyczne

Oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis. New possibilities of treatment

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. n. med. Dagmara Mirowska-Guzel, Centrum Badań Przedklinicznych WUM, ul. Banacha 1b, 02-097 Warszawa, tel.: +48 22 116 61 60, e-mail: dmirowska@wum.edu.pl

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane to choroba zapalno-demielinizacyjna ośrodkowego układu nerwowego o dotychczas nieznaną przyczynę. W przebiegu stwardnienia rozsianego następuje uszkodzenie osłonki mielinowej komórek nerwowych oraz śmierć neuronów i oligodendrocytów. W ostatnich latach zwrócono uwagę, że ogniwem łączącym proces zapalny z neurodegeneracją może być stres oksydacyjny, czyli przewaga tworzenia wolnych rodników nad ich eliminacją przez systemy antyoksydacyjne komórki. Udowodniono, iż stres oksydacyjny ma związek z patogenezą wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona czy choroby Alzheimerera. Wykazano także jego udział w patogenezie stwardnienia rozsianego. W związku z tym zwalczanie stresu oksydacyjnego stało się jednym z nowych celów terapeutycznych. W badaniach przedklinicznych i klinicznych oceniano skuteczność różnych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, m.in. polifenoli, witamin, kwasu α -liponowego czy ekstraktów z *Ginkgo biloba*, jako potencjalnych leków na stwardnienie rozsiane. Ich skuteczność w modelach zwierzęcych rzadko znajduje odzwierciedlenie w wynikach badań klinicznych, ale wybrane związki są obecnie w trakcie oceny klinicznej. W badaniach zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych skuteczny okazał się fumaran dimetylu, zarejestrowany w 2013 roku do leczenia stwardnienia rozsianego. Mechanizm działania tego związku nie został jeszcze w pełni poznany. Wiadomo jednak, że pobudza on naturalny szlak antyoksydacyjny związany z czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2, co prowadzi do redukcji nasilenia stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, wolne rodniki, stres oksydacyjny, antyoksydanty, fumaran dimetylu

Abstract

Multiple sclerosis is a progressive inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system. Although the primary cause of this disease has not been established yet, it is known that destruction of myelin sheaths and loss of neurons and oligodendrocytes can be observed as disease progresses. It has been suggested that a possible link between neuroinflammation and neurodegeneration could be the phenomenon of oxidative stress. Oxidative stress develops when there are too many free radicals produced within the cell, and the natural antioxidative mechanisms are not effective enough to dispose of them. It has been proven to contribute to the pathomechanism of such neurodegenerative disorders as Parkinson's disease or Alzheimer's disease. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis has also been recently confirmed, establishing it as a new target in the disease's management. Even though the efficacy of such antioxidants as polyphenols, vitamins (A, C, E) and alpha-lipoic acid has been confirmed in many preclinical experiments, no significant effect has been shown in clinical trials. However, some clinical trials related to the use of antioxidants in multiple sclerosis treatment are still in progress. One compound with antioxidant potential that has been proven effective and safe in both preclinical and clinical trials is dimethyl fumarate. It was licensed for the treatment of multiple sclerosis in 2013. Even though its mechanism of action has not been fully established, one of its known effects is the induction of antioxidant pathway related to Nrf2 transcription factor and synthesis of antioxidant enzymes, leading to decrease in oxidative stress.

Key words: antioxidants, dimethyl fumarate, oxidative stress, multiple sclerosis, free radicals

WSTĘP

Stwardnienie rozsiane (*multiple sclerosis*, MS) należy do grupy przewlekłych schorzeń zapalno-demielinizacyjnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Szacuje się, że dotyczy około 2,5 mln osób na świecie (Tulman, 2013). Jest to najczęściej występująca neurologiczna jednostka chorobowa w grupie młodych dorosłych; MS rozpoznaje się zazwyczaj u pacjentów w wieku 15–45 lat, jednak choroba może się pojawić zarówno wcześniej, jak i później (Goodin, 2014). Objawy zależą od miejsca uszkodzenia w OUN, a przebieg jest bardzo zróżnicowany. Klasycznie wyróżnia się postacie: rzutowo-remisyjną (obecną na początku choroby u około 85% pacjentów), wtórnie postępującą (będącą następstwem postaci rzutowo-remisyjnej), pierwotnie postępującą (około 15% przypadków) oraz – rzadko – postępująco-rzutową (Lublin i Reingold, 1996). W 2014 roku zaproponowano nowe określenia przebiegu MS, w większym stopniu uwzględniające aktywność procesu demielinizacyjnego (Lublin *et al.*, 2014).

Kobiety chorują 2–3 razy częściej niż mężczyźni. W przypadku postaci pierwotnie postępującej nie obserwuje się różnic między płciami (Kingwell *et al.*, 2013; Koch-Henriksen i Sorensen, 2010). Uważa się, że do MS predysponują niektóre czynniki genetyczne i środowiskowe. Dotychczas odnotowano związek występowania choroby m.in. z polimorfizmem genu *HLA-DRB1*, paleniem papierosów czy infekcją wirusem Epsteina–Barr (Bray *et al.*, 1983; Riise *et al.*, 2003; Sumaya *et al.*, 1980; Willer *et al.*, 2003). Jednak pomimo długoletnich badań nad etiopatogenezą MS wciąż nie wiadomo, jaka jest pierwotna przyczyna choroby. W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących roli stresu oksydacyjnego w patogenezie MS (Ohl *et al.*, 2016).

STRES OKSYDACYJNY I NATURALNE SYSTEMY ANTYOKSYDACYJNE

Stres oksydacyjny to stan komórki, który charakteryzuje się przewagą tworzenia wolnych rodników (WR), szczególnie wolnych rodników tlenowych (WRT), nad ich skuteczną eliminacją. WR to atomy lub cząsteczki mające jeden niesparowany elektron na powłoce walencyjnej. Ich bardzo duża reaktywność wynika z naturalnej tendencji do sparrowania wolnego elektronu i wytworzenia stabilnego wiązania chemicznego. WR powstają w komórkach w warunkach fizjologicznych i pełnią szereg istotnych funkcji: biorą udział w regulacji ekspresji genów, procesów fosforylacji białek czy poziomu wapnia w komórkach, aktywują białka kontrolujące podziały komórkowe, uczestniczą w eliminowaniu drobnoustrojów. Jednak nadmiar WR prowadzi do niszczenia elementów strukturalnych i funkcjonalnych komórek, do zaburzeń homeostazy, a także do śmierci komórek w wyniku apoptozy lub nekrozy (Chandra *et al.*, 2000; Dröge, 2002).

WR mogą pochodzić z wewnątrz albo z zewnątrz komórki. Najwięcej wewnątrzkomórkowych WRT powstaje

w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym wskutek niepełnej redukcji tlenu cząsteczkowego. W niewielkim stopniu zjawisko to występuje w warunkach fizjologicznych. Działanie bodźców patologicznych, np. zapalenia czy niedotlenienia, może prowadzić do znaczących zaburzeń oddychania komórkowego. W konsekwencji dochodzi do produkcji dużych ilości WRT. Wzmożona synteza WR może być też skutkiem nadmiernego gromadzenia wewnątrz komórek metali takich jak miedź bądź żelazo (Ercal *et al.*, 2001). Metale te katalizują reakcje Fentona i Habera–Weissa, których produktami są rodnik ponadtlenkowy i najbardziej reaktywny z rodników spotykanych w systemach biologicznych – rodnik hydroksylowy. Źródłem zewnątrzkomórkowym WR mogą być natomiast komórki odpowiedzi immunologicznej, wytwarzające wolne rodniki w celu unieszkodliwienia drobnoustrojów i komórek rozpoznanych jako obce (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Zjawiskiem analogicznym do stresu oksydacyjnego i występującym równolegle jest stres nitrozacyjny, związany z syntezą nadmiernej ilości małych molekuł zawierających w swojej cząsteczce atom azotu – tzw. reaktywnych form azotu (RFA). Zalicza się do nich produkowany w znacznych ilościach m.in. podczas odpowiedzi immunologicznej tlenek azotu (NO) i jego pochodne: jon nitroksylowy (NO=), kwas azotowy (III) (HNO₂), dwutlenek azotu (NO₂), kwas azotowy (V) (HNO₃). Bardzo reaktywną cząsteczką jest produkt reakcji między NO i anionem ponadtlenkowym – nadtlenoazotyn (ONOO⁻). Nadtlenoazotyn nie jest wolnym rodnikiem, lecz właśnie ta cząsteczka odpowiada za powstawanie nitrowanych form białek, które w efekcie tej przemiany tracą prawidłową funkcję. Przyczynia się to do upośledzenia funkcjonowania komórki jako całości i może doprowadzić do jej śmierci (Calabrese *et al.*, 2000; Smith i Lassmann, 2002).

Niefizjologiczna ilość WR w komórce aktywuje naturalne systemy antyoksydacyjne, pozwalające zapobiegać negatywnym skutkom oddziaływania WR albo zmniejszać to oddziaływanie. Działanie systemu ochronnego w komórkach polega na niedopuszczeniu do oddziaływania reaktywnych rodników ze składnikami komórki przez przerywanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych.

Wewnątrzkomórkowy system antyoksydacyjny tworzą antyoksydanty drobnocząsteczkowe (witamina C, witamina E, koenzym Q, karoteny, glutation, pierwiastki śladowe) oraz antyoksydanty wielkocząsteczkowe (enzymatyczne), do których należą m.in. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationu, peroksyredoksyny czy oksydaza hemowa (Halliwell i Gutteridge, 2015). Elementy składające się na ochronę antyoksydacyjną komórki zebrano w tab. 1.

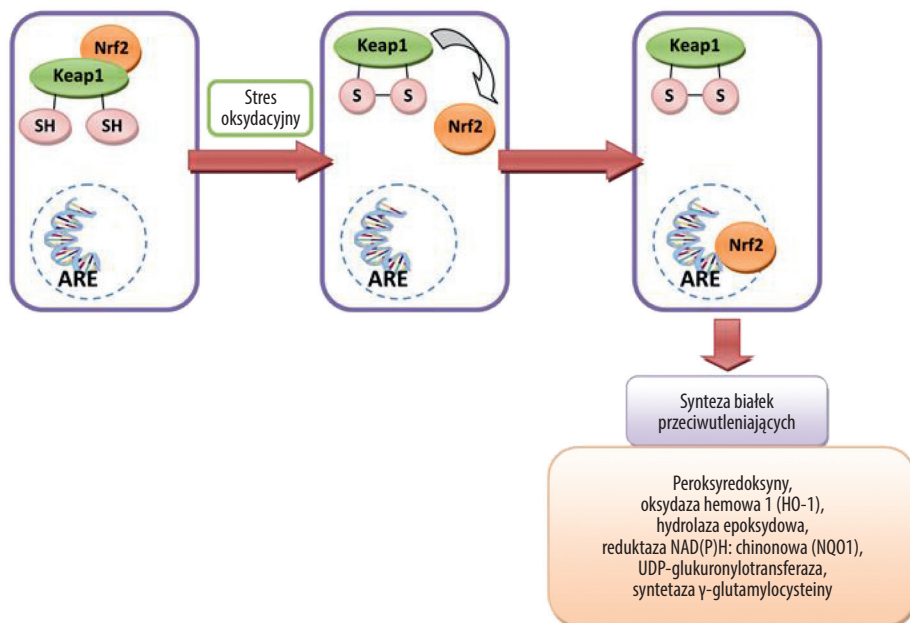
Antyoksydanty drobnocząsteczkowe odpowiadają za niespecyficzne reakcje prowadzące do inaktywacji reaktywnych rodników. W większości są to związki pochodzenia egzogenne, dostarczane do organizmu z pożywieniem. Lokalizują się w cytoplazmie lub błonie komórkowej, w zależności od właściwości fizycznych. Nieenzymatyczne antyoksydanty są stosunkowo mało skuteczne w ochronie

Antyoksydanty	
Drobnocząsteczkowe	Enzymatyczne
Glutation (GSH) α-tokoferol (witamina E) Kwas askorbinowy (witamina C) Koenzym Q Karoteny (witamina A)	Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD1, SOD2, SOD3) Katalaza (Cat) Peroksydaza glutationowa (GPx) Peroksyreduksyny Oksydaza hemowa 1 (HO-1) Hydroksylaza epoksydowa Reduktaza NAD(P)H: chinonowa (NQO1) UDP-glukuronylotransferaza Syntetaza γ-glutamylcysteiny

Tab. 1. Naturalne antyoksydanty drobnocząsteczkowe i enzymatyczne

komórek przed oddziaływaniem WR. Większą skuteczność i swoistość wykazują antyoksydanty enzymatyczne, które katalizują reakcje istotne dla eliminacji wolnych rodników. W odpowiedzi na nadmiar WR w komórce aktywowane są także szlaki odpowiedzi antyoksydacyjnej, w tym szlak związany z czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2, odpowiadający za produkcję antyoksydantów enzymatycznych. Czynniki transkrypcyjne Nrf2 jest zaliczany do rodziny białek CNC (*cap'n'collar*), zawierających w swojej strukturze motyw zamka leucynowego, umożliwiając im wiązanie się do jądrowego DNA. W warunkach fizjologicznych Nrf2 znajduje się głównie w cytozolu, w formie nieaktywnego kompleksu z białkiem wiążącym Nrf2 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*, Keap1). Białko Keap1 ma na swojej powierzchni liczne reszty cysteinowe, które mogą ulec utlenieniu (np. w wyniku zwiększenia ilości wolnych rodników w komórce).

Efektami utlenienia reszt cysteinowych są zmiana struktury białka Keap1 i uwolnienie czynnika Nrf2 z połączenia kompleksowego. Wtedy czynnik Nrf2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie może połączyć się z fragmentem DNA będącym regionem odpowiedzi antyoksydacyjnej (*antioxidant response element*, ARE) o sekwencji 5'-TGACnnnGCA-3', mieszczącym się w regionach promotorowych genów kodujących białka antyoksydacyjne – m.in. peroksyredoksyny, oksydazę hemową 1 (HO-1), hydrolazę epoksydową, reduktazę NAD(P)H: chinonową (NQO1), UDP-glukuronylotransferazę, syntetazę γ-glutamylcysteiny (Itoh *et al.*, 2004). Białko Keap1 pełni zatem funkcję czujnika stresu oksydacyjnego i jest częścią pośrednio odpowiedzialną za regulację ekspresji genów zależnych od Nrf2 (Itoh *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). Schemat odpowiedzi antyoksydacyjnej po aktywacji białka Keap1 przedstawiono na ryc. 1.



ARE – region odpowiedzi antyoksydacyjnej; **Keap1** – białko wiążące czynnik Nrf2 w cytoplazmie; **Nrf2** – czynnik transkrypcyjny Nrf2; **SH** – grupy tiolowe białka Keap1. W warunkach fizjologicznych czynnik Nrf2 zlokalizowany jest w cytoplazmie w połączeniu kompleksowym z białkiem Keap1. W warunkach stresu oksydacyjnego reszty tiolowe białka Keap1 ulegają utlenieniu – powstają mostki siarczkowe. Prowadzi to do zmiany struktury białka i uwolnienia czynnika Nrf2. Wolny czynnik Nrf2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie przez połączenie z regionami ARE pobudza syntezę enzymów antyoksydacyjnych. Zaburzenie funkcjonowania szlaku związanego z Nrf2 może mieć konsekwencje w postaci braku skutecznej obrony antyoksydacyjnej na poziomie komórkowym.

138 Ryc. 1. Schemat działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2

Uważa się, że efektywność naturalnych systemów antyoksydacyjnych zależy od wielu czynników – jest wypadkową działania czynników środowiskowych i uwarunkowań genetycznych oraz różni się w zależności od rodzaju tkanki (Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009). Bywa osłabiona wtórnie do stanu stresu oksydacyjnego, ponieważ WR mogą wpływać na strukturę i funkcję białek enzymatycznych, w tym białek antyoksydacyjnych (Asahi *et al.*, 1997; Blum i Fridovich, 1985; Pigeolet *et al.*, 1990). Jeżeli odpowiedź antyoksydacyjna jest niewystarczająca, w komórce powstają warunki stresu oksydacyjnego.

Stres oksydacyjny może być zatem konsekwencją nadmiernej produkcji WR, obniżonej wydajności naturalnych systemów antyoksydacyjnych, a także obydwu tych zjawisk jednocześnie.

ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO W PATOGENEZIE MS

Na podstawie wieloletnich badań nad patogenezą MS uważa się, że jest to choroba autoimmunologiczna. Procesy leżące u podstaw patomechanizmu MS polegają bądź na nieprawidłowościach w odpowiedzi immunologicznej (obejmującej m.in. efekty działania autoreaktywnych limfocytów Th₁, Th₂, Th₁₇, T_{reg}, limfocytów B), bądź na zaburzeniach dotyczących komórek produkujących mielinę (Barnett i Prineas, 2004; Lucchinetti *et al.*, 2000). Jednak bez względu na pierwotną przyczynę wiadomo, iż w MS dochodzi do wytworzenia ognisk zapalno-demielinizacyjnych w różnych rejonach OUN: w istocie białej i szarej mózgu, w rdzeniu kręgowym oraz w okolicy nerwów wzrokowych. Konsekwencjami reakcji zapalnej i napływu autoreaktywnych limfocytów są: postępująca demielinizacja, obumieranie oligodendrocytów, degradacja aksonów i neurodegeneracja (Trapp i Nave, 2008). Jednym ze zjawisk, które może łączyć te procesy i proces zapalny, jest stres oksydacyjny. Potwierdzono już jego udział w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona czy choroba Wilsona, a także w MS (Chiurchiù *et al.*, 2016; Kalita *et al.*, 2014).

W ogniskach zapalnych umiejscowionych w przypadku MS w OUN znajdują się liczne limfocyty i makrofagi, które wydzielają cytokiny prozapalne, chemokiny oraz tlenek azotu (NO) i WR. W konsekwencji komórki sąsiadujące z ogniskiem zapalnym są narażone na ich działanie.

Nadmierna produkcja WR przez komórki odpowiedzi immunologicznej może skutkować utlenieniem składników błony cytoplazmatycznej komórek sąsiadujących z ogniskiem zapalnym. Na atak WR narażone są szczególnie neurony, ponieważ w porównaniu z innymi rodzajami komórek w ich błonie cytoplazmatycznej występuje więcej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT). WNKT, ze względu na obecność wiązań podwójnych, są bardzo podatne na atak wolnych rodników i prolongację wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej. Konsekwencją

utleniania składników błony cytoplazmatycznej jest zwiększenie jej przepuszczalności. Powoduje to nasilenie napływu jonów wapnia do komórki i uruchomienie zależnych od wapnia mechanizmów prowadzących do apoptozy albo nekrozy, takich jak aktywacja białek z rodziny kalpain (Ray *et al.*, 2000).

Procesowi zapalnemu w mózgu towarzyszy aktywacja mikrogleju. Pobudzony mikroglej produkuje cytokiny prozapalne, w tym TNF α i TNF β , jak również neurotoksyczny NO oraz duże ilości anionorodnika nadadtlenkowego (Colton i Gilbert, 1987; Merrill *et al.*, 1993; Pawate *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2005). Uwalnianie tego rodnika może więc w pewnym stopniu przyczynić się do oksydacyjnego uszkodzenia błon cytoplazmatycznych pobliskich komórek.

Najważniejszym źródłem stresu oksydacyjnego jest jednak wewnątrzkomórkowa synteza znacznych ilości WR, które w MS są wytwarzane w odpowiedzi na toczący się proces zapalny. Dzieje się tak, gdyż warunki panujące w ognisku zapalnym przyczyniają się do niedotlenienia pobliskich komórek. Niedotlenienie jest efektem wytwarzania przez komórki odpornościowe znacznych ilości NO. Związek ten hamuje transport elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i w efekcie fosforylację oksydacyjną. Skutkuje to niepełną redukcją tlenu i wewnątrzkomórkową syntezą znacznych ilości WRT, co dodatkowo zwiększa pulę WR w komórce, powoduje zmiany w budowie i funkcjonowaniu mitochondriów oraz prowadzi do powstania warunków stresu oksydacyjnego (Brown i Cooper, 1994; Mander *et al.*, 2005; Pulsinelli i Duffy, 1983).

W ogniskach zapalnych w wyniku niepełnej redukcji tlenu tworzy się m.in. anion nadadtlenkowy, mający wpływ na rozwój stresu oksydacyjnego. Anion nadadtlenkowy jest substratem reakcji, w wyniku których powstaje bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Jest także ogniwem łączącym stres oksydacyjny ze stresem nitrozacyjnym, ponieważ wskutek reakcji tego rodnika z NO tworzy się nadtlenoazotyn, powodujący nitrację elementów komórek. NO – wytwarzany w znacznych ilościach w ogniskach zapalnych w MS – prowadzi również do bezpośredniej nitrozylacji składników komórek. Tak zmodyfikowane białka zmieniają właściwości i nie spełniają prawidłowo swojej funkcji. W konsekwencji może dochodzić do zaburzeń transdukcji sygnału w komórce i do jej śmierci. W efekcie zwiększenia syntezy NO przez komórki odpowiedzi immunologicznej w ognisku zapalnym zwiększa się zatem pula nie tylko WRT, lecz także RFA, co określa się mianem stresu nitrozacyjnego (Calabrese *et al.*, 2000).

Jeśli wytwarzanie WR nie zostanie skutecznie zahamowane, stres oksydacyjny się pogłębia. Powstaje błędne koło procesów, których efektem jest coraz intensywniejsze wytwarzanie WR. Przekłada się to m.in. na wzrost przepuszczalności bariery krew-mózg. Wykazano, że bariera ta jest uszkodzana przez lokalnie wytwarzane WR, co ułatwia infiltrację OUN przez obwodowe leukocyty i nasila stan zapalny, a w konsekwencji stres oksydacyjny (Haorah *et al.*, 2007).

Innym istotnym skutkiem wzmożonej produkcji WR jest zahamowanie dojrzewania oligodendrocytów – komórek odpowiadających za produkcję mieliny. Komórki prekursorowe oligodendrocytów są bardzo wrażliwe na działanie WR ze względu na niewielką zawartość enzymów antyoksydacyjnych i dużą zawartość WNKT. W badaniach *in vitro* wykazano ponadto istotny w MS związek między wytwarzaniem NO a spadkiem ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję mieliny przez te komórki i w efekcie zmniejszenie zawartości: zasadowego białka mieliny – MBP (*myelin basic protein*), mielinowej glikoproteiny oligodendrocytów – MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), białka proteolipidu – PLP (*proteolipid protein*) (Jana i Pahan, 2013). Zahamowanie dojrzewania oligodendrocytów wskutek działania WR i wpływ NO na te komórki mogą zatem prowadzić do zmniejszenia syntezy osłonki mielinowej neuronów, a w konsekwencji do osłabienia ich działania i do większej podatności na dalsze uszkodzenia (French *et al.*, 2009; Mitrovic *et al.*, 1994).

OUN charakteryzuje się niewielką tolerancją na konsekwencje stresu oksydacyjnego, co wynika też z mniejszej niż w innych układach skuteczności systemów antyoksydacyjnych. Nawet w warunkach fizjologicznych aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak katalaza czy peroksydaza glutationowa, jest w mózgu mniejsza niż w pozostałych lokalizacjach (Halliwell, 2001). Co ciekawe, wykazano związek palenia papierosów z większą częstością występowania MS (Riise *et al.*, 2003). Palenie obniża skuteczność obrony antyoksydacyjnej (Zhou *et al.*, 2000). Obserwacja ta może pośrednio dowodzić istotnej roli stresu oksydacyjnego w rozwoju MS.

Zjawisko stresu oksydacyjnego wydaje się zatem istotnym ogniwem łączącym proces zapalny z obumieraniem neuronów i oligodendrocytów w MS. Jego znaczenie zostało potwierdzone w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

STRES OKSYDACYJNY W MS – BADANIA PRZEDKLINICZNE I KLINICZNE

W modelu zwierzęcym MS – EAE (*experimental autoimmune encephalitis*) zaobserwowano, że zmiany w mitochondriach i wzmożenie syntezy nitrowanych białek w neuronach poprzedzały proces infiltracji ogniska przez komórki zapalne. Oznacza to, że uszkodzenie mitochondriów – komórek kluczowych dla oddychania komórkowego – następuje już na wczesnych etapach procesu autoimmunologicznego (Qi *et al.*, 2006, 2007). W modelu EAE obserwowano również większe ilości WRT wytwarzanych w mózgu szczurów z objawami klinicznymi choroby w porównaniu ze szczurami zdrowymi i szczurami, które nie rozwinęły objawów (Ruuls *et al.*, 1995). Potwierdzono też, że w EAE dochodzi do dysfunkcji mitochondriów w neuronach (Forte *et al.*, 2007) oraz że ich stabilizacja zmniejsza uszkodzenie aksonów komórek nerwowych (Forte *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007).

Na podstawie analizy mikromacierzy całego genomu materiału pochodzącego z mózgow zmarłych pacjentów z MS wykazano, iż w aktywnych ogniskach zapalno-demielinizacyjnych dochodzi do zwiększonej ekspresji genów kodujących białka prooksydacyjne, m.in. oksydazy NADPH w makrofagach i mikrogleju, oraz do wzmożonej syntezy tych białek (Fischer *et al.*, 2012, 2013). W mózgow chorych z MS obserwowano zwiększoną ekspresję enzymów prooksydacyjnych, takich jak indukowana syntaza tlenu azotu (*incucible nitric oxide synthase*, iNOS) oraz mieloperoksydaza. Obserwacje te dotyczyły makrofagów i aktywowanego mikrogleju (Bö *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2001). W mózgow pacjentów potwierdzono nie tylko nasilenie syntezy iNOS, lecz także wzrost zawartości nitrotyrozyny, będącej markerem nitrozacyjnych modyfikacji białek, co dowodzi udziału stresu nitrozacyjnego w MS (Bizzozero *et al.*, 2005). Wykazano, że w ogniskach demielinizacyjnych w istocie białej i korze mózgowej występują utlenione formy lipidów: utlenione fosfolipidy i dialdehyd malonowy (*malon dialdehyde*, MDA) – marker oksydacyjnych modyfikacji lipidów. Substancje te zlokalizowane były w osłonkach mielinowych, apoptycznych oligodendrocytach i aksonach komórek nerwowych (Fischer *et al.*, 2013; Haider *et al.*, 2011). Zaobserwowano ponadto wpływ WRT uwalnianych przez makrofagi i mikroglej na funkcjonowanie mitochondriów znajdujących się w pobliskich neuronach. Objawiało się to oksydacyjnym uszkodzeniem mitochondrialnego DNA (mtDNA), dużą liczbą delecji w mtDNA oraz zmniejszoną syntezą istotnych dla funkcji całej komórki białek mitochondrialnych (m.in. białek biorących udział w oddychaniu komórkowym i białek antyoksydacyjnych), obniżoną aktywnością kompleksu I łańcucha oddechowego i zwiększoną aktywnością kompleksu IV (Campbell *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2000; Mahad *et al.*, 2009). Zarówno w modelu EAE, jak i u ludzi odnotowano wzrost aktywności bardzo ważnego szlaku antyoksydacyjnego związanego z czynnikiem jądrowym pochodzenia erytroidalnego 2 [*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*, Nrf2] w aktywnych ogniskach zapalno-demielinizacyjnych. Szczegółowa analiza wykazała, że zwiększenie ekspresji czynnika Nrf2 i aktywowanych przez niego białek antyoksydacyjnych obserwuje się w astrocytach i makrofagach. W oligodendrocytach i neuronach nie odnotowuje się tego zjawiska, co sugeruje, że wzmożenie aktywności szlaku związanego z Nrf2 w makrofagach i astrocytach w odpowiedzi na wystąpienie stresu oksydacyjnego jest niewystarczające, aby ochronić neurony i oligodendrocyty przed skutkami działania WRT (van Horssen *et al.*, 2010, 2008).

Wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), krwi i moczu pochodzących od chorych z MS nie są spójne, aczkolwiek w zdecydowanej większości z nich stwierdzono podwyższone stężenia markerów stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego (m.in. nitrotyrozyny, MDA, 4-hydroksy-2-nonenalu, izoprostanów), a także obniżoną ekspresję i aktywność enzymów antyoksydacyjnych (przede

wszystkim peroksydazy glutationowej) oraz spadek stężenia antyoksydantów drobnocząsteczkowych (m.in. glutationu, witaminy E) w aktywnej fazie choroby (Acar *et al.*, 2012; Fiorini *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). U pacjentów z MS odnotowywano ponadto mniejszy niż u osób zdrowych całkowity potencjał antyoksydacyjny surowicy (Karlík *et al.*, 2015); potencjał antyoksydacyjny jest miarą działania mechanizmów pro- i antyoksydacyjnych we krwi.

Badania na modelach zwierzęcych i z udziałem ludzi dowodzą zatem znaczącej roli stresu oksydacyjnego w patomechanizmie MS.

ZMNIEJSZENIE STRESU OKSYDACYJNEGO JAKO CEL TERAPEUTYCZNY W MS

Potwierdzenie związku stresu oksydacyjnego z patogenezą MS stwarza nowe możliwości terapeutyczne. Jeden z potencjalnych celów to zmniejszenie stresu oksydacyjnego, mające spowolnić lub zahamować procesy neurodegeneracyjne, a w konsekwencji postęp choroby.

Substancje o działaniu antyoksydacyjnym wchodzą w skład niektórych produktów spożywczych, leków dostępnych bez recepty i suplementów diety. Trzeba pamiętać, że suplementy diety nie są poddawane badaniom klinicznym, a ich bezpieczeństwo nie jest monitorowane, więc niewiele wiadomo o ich skuteczności i działaniach niepożądanych. Prawdopodobnie część chorych przyjmuje suplementy, mimo że ich skuteczność w MS i w innych schorzeniach nie została potwierdzona (Plemel *et al.*, 2015).

W badaniach przedklinicznych bazujących na modelu EAE, w badaniach *ex vivo* z wykorzystaniem mózgów osób z MS i w badaniach klinicznych oceniano skuteczność różnych związków przeciwutleniających, w tym związków należących do grupy polifenoli: kwercetyny, luteoliny, kurkuminy, resweratrolu i epigallokatechiny (EGCG), a także witamin: A, C i E, kwasu α -lipionowego (*alpha-lipoic acid*, ALA) oraz ekstraktów z *Ginkgo biloba* (Plemel *et al.*, 2015). Oceniano różne parametry, m.in. to, czy badane substancje wykazują działanie przeciwzapalne (przykładowo: redukcja napływu limfocytów do mózgu i rdzenia kręgowego, zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych) i neuroprotekcyjne oraz czy łagodzą objawy choroby. W badaniach klinicznych oceniano stężenia markerów stresu oksydacyjnego i zapalenia oraz wpływ na zdolności poznawcze (w przypadku *Ginkgo biloba*).

Jedną z grup antyoksydantów poddanych badaniom w MS stanowią polifenole. W modelu EAE wykazano, że kwercetyna (obecna w różnych owocach i warzywach, m.in. w czerwonej fasoli, luncyku, kaparach) podawana dootrzewnowo powodowała opóźnienie wystąpienia objawów i redukcję ich ciężkości w porównaniu z grupą kontrolną. Obserwowano też zmniejszenie napływu limfocytów do rdzenia kręgowego (Hendriks *et al.*, 2004) i słabsze wydzielanie cytokin prozapalnych (Muthian i Bright, 2004). Efektów tych nie odnotowywano przy podaniu doustnym.

W przypadku luteoliny w jednym z dwóch badań stwierdzono mniejsze nasilenie objawów choroby u badanych szczurów w porównaniu z grupą kontrolną oraz mniejszy naciek monocytów i makrofagów. Część zwierząt nie rozwinęła nawet objawów EAE, a korzystne efekty widoczne były również po podaniu doustnym (Hendriks *et al.*, 2004). W drugim badaniu nie zaobserwowano jednak istotnych korzyści ze stosowania luteoliny, a nawet stwierdzono pogorszenie po jej podaniu doustnym (Verbeek *et al.*, 2005).

Obiecujące wyniki badań przedklinicznych uzyskano w przypadku kurkuminy. Jest to związek pochodzenia naturalnego, stosowany na co dzień jako przyprawa (w ilościach znacznie mniejszych od dawki leczniczej) – kurkuma. Dzięki dużej lipofilności kurkumina może łatwo przechodzić przez błony biologiczne. W EAE wykazywała właściwości przeciwzapalne (osłabienie produkcji interferonu γ przez limfocyty T, zmniejszenie ilości limfocytów Th₁₇ w ogniskach zapalnych). Efekty te obserwowano jednak tylko przy podaniu profilaktycznym (Natarajan i Bright, 2002; Verbeek *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2009). Kurkumina jako dodatek do terapii interferonem β 1 znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych (www.clinicaltrials.gov). W przypadku występującego w winogronach i czerwonym winie resweratrolu, a także jego syntetycznej pochodnej SRT501, charakteryzującej się lepszą biodostępnością, wykazano redukcję ciężkości objawów EAE (Fonseca-Kelly *et al.*, 2012; Imler i Petro, 2009; Shindler *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2007). Stwierdzono też zmniejszenie uszkodzenia nerwu wzrokowego u zwierząt (Fonseca-Kelly *et al.*, 2012; Shindler *et al.*, 2010), lecz nie obserwowano zmniejszenia nacieku limfocytów w rdzeniu kręgowym. W jednym z badań odnotowano ponadto spadek stężenia cytokin prozapalnych we krwi po zastosowaniu resweratrolu (Imler i Petro, 2009). Związek ten nie jest obecnie oceniany klinicznie.

U zwierząt, których dieta zawierała składnik zielonej herbaty – galusan epigallokatechiny (EGCG) – stwierdzono mniejsze nasilenie objawów EAE, zmniejszenie nacieku komórek zapalnych, demielinizacji i produkcji cytokin prozapalnych w porównaniu z grupą kontrolną (Aktas *et al.*, 2004; Herges *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Obecnie prowadzonych jest sześć badań klinicznych z zastosowaniem EGCD jako dodatku do terapii podstawowej w MS (www.clinicaltrials.gov).

W badaniach nad witaminami antyoksydacyjnymi, do których zalicza się witaminy A, C i E, obserwowano korzystne działanie w modelu EAE. Duże dawki witaminy A podawane domięśniowo zmniejszały odsetek świnek morskich z objawami EAE (Vladutiu i Cringulescu, 1968). Z kolei witamina E podawana dootrzewnowo powodowała wzrost stopnia regeneracji mieliny w eksperymentalnym modelu demielinizacji wywołanym bromkiem etyldyny (Goudarvand *et al.*, 2010; Spanevello *et al.*, 2009). W badaniach klinicznych witaminy te nie wykazały jednak istotnej skuteczności u chorych z MS (Plemel *et al.*, 2015).

ALA to naturalny związek antyoksydacyjny – występujący m.in. w wątróbce, szpinaku i brokułach – bezpośrednio zaangażowany w inaktywację WR. W dość licznych badaniach przedklinicznych wykazywał skuteczność w EAE. Powodował zmniejszenie napływu limfocytów T do ognisk zapalnych i spadek stężenia mediatorów zapalnych oraz redukował demielinizację (Chaudhary *et al.*, 2006, 2011; Jones *et al.*, 2008; Marracci *et al.*, 2002; Morini *et al.*, 2004; Schreibelt *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013). W jednym z badań z udziałem ludzi zaobserwowano wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego i zmniejszenie stężenia markerów zapalenia we krwi – m.in. interferonu γ , transformującego czynnika wzrostu (TGF- β) i interleukiny 4 – po 12 tygodniach terapii ALA (Khalili *et al.*, 2014a, 2014b). W innych badaniach klinicznych efekty te nie były jednak widoczne (Plemel *et al.*, 2015). Brakuje danych dotyczących wpływu terapii ALA na częstość występowania rzutów czy progresję choroby, aczkolwiek trwają badania kliniczne mające ocenić wpływ stosowania ALA na przebieg MS (www.clinicaltrials.gov).

Innym produktem o właściwościach antyoksydacyjnych jest ekstrakt z liści *Ginkgo biloba*. Oceniano jego wpływ na zdolności poznawcze chorych z MS. W większości badań uzyskano poprawę pamięci i możliwości poznawczych (Diamond *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2006; Lovera *et al.*, 2007), lecz w największym badaniu z użyciem *Ginkgo biloba* nie obserwowano żadnej poprawy względem grupy kontrolnej (Lovera *et al.*, 2012).

Pomimo zachęcających wyników badań przedklinicznych rzadko odnotowuje się kliniczną poprawę stanu chorych z MS po zastosowaniu związków o własnościach antyoksydacyjnych. Może to wynikać z właściwości farmakokinetycznych, ponieważ u zwierząt w większości badań antyoksydanty podawano drogą iniekcji dootrzewnowych, podczas gdy u ludzi wybiera się zazwyczaj drogę doustną. W związku z tym substancja badana może zostać zmetabolizowana w wątrobie i jej stężenie może być niewystarczające do uzyskania efektów klinicznych; substancja może też nie przedostać się do OUN przez barierę krew–mózg.

Najbardziej obiecującą strategią zwalczania stresu oksydacyjnego wydaje się nie samo dostarczanie antyoksydantów, lecz pobudzanie wewnątrzkomórkowych szlaków odpowiedzi antyoksydacyjnej, takich jak szlak związany z czynnikiem Nrf2, a potencjalnie także hamowanie szlaków prooksydacyjnych, np. związanych z syntezą NO.

Związkiem, który wpływa na aktywność szlaku związanego z czynnikiem Nrf2, jest fumaran dimetylu (FDM). Dokładny mechanizm jego działania nie został dotąd poznany. FDM wykazuje wiele różnych efektów działania, co obserwowano w badaniach *in vitro*. Wiadomo, że jednym z tych efektów jest wzrost aktywności szlaku związanego z czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2. Powoduje to zwiększenie ekspresji genów kodujących białka

antyoksydacyjne i wzrost ich stężenia w mózgu, co może prowadzić do zmniejszenia stresu oksydacyjnego (Lin *et al.*, 2011; Linker *et al.*, 2011). W badaniach *in vitro* stwierdzono protekcyjne działanie FDM, ograniczające śmierć neuronów i astrocytów indukowaną nadtlaniem wodoru (Linker *et al.*, 2011), oraz spadek ekspresji iNOS w astrocytach (Lin *et al.*, 2011). W badaniach *in vitro* wykazano ponadto, że oprócz właściwości antyoksydacyjnych FDM ma właściwości immunomodulujące (de Jong *et al.*, 1996; Litjens *et al.*, 2004) i przeciwzapalne: hamuje różnicowanie komórek dendrytycznych oraz zmniejsza produkcję cytokin prozapalnych (interleukin 6, 12 i 23) przez limfocyty Th₁ i Th₁₇ (Ghoreschi *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2012). Prawdopodobnie FDM przyczynia się również do nasilenia apoptozy limfocytów T i spadku potencjału migracji tych komórek do ogniska zapalnego (Dehmel *et al.*, 2014; Treumer *et al.*, 2003).

FDM stosowany był wcześniej w terapii łuszczycy (Altmeyer *et al.*, 1994; Mrowietz *et al.*, 1998; Ständer *et al.*, 2003), istnieją też doniesienia o jego skuteczności w leczeniu sarkoidozy (Gutzmer *et al.*, 2004; Nowack *et al.*, 2002) czy ziarniniaka obrączkowego (Breuer *et al.*, 2005; Eberlein-König *et al.*, 2005; Kreuter *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2009). Dotychczasowe badania kliniczne w MS potwierdziły skuteczność leku, objawiającą się redukcją liczby rzutów choroby i jej wolniejszą progresją w ciągu 2 lat stosowania FDM (Fox *et al.*, 2012; Gold *et al.*, 2012). Obecnie FDM jest lekiem zarejestrowanym do leczenia MS. Ponieważ jednak dokładny mechanizm działania tego związku nie został jeszcze poznany, nie można mieć pewności, w jakiej mierze pobudzenie szlaku związanego z czynnikiem Nrf2 odpowiada za korzystne efekty działania leku wykazane w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Nie należy również zapominać, że patomechanizm MS jest bardzo złożony, a stres oksydacyjny to tylko jedno ze zjawisk składających się na patogenezę. Indywidualne różnice w wydajności systemów antyoksydacyjnych mogą się przekładać na różne nasilenie objawów albo na przewagę innych procesów patologicznych (np. zaburzeń jonowych). W konsekwencji między chorymi mogą występować różnice dotyczące odpowiedzi na leczenie preparatami zmniejszającymi stres oksydacyjny. Niemniej pobudzanie szlaku związanego z Nrf2 wydaje się obiecującą strategią terapeutyczną w leczeniu MS.

Konflikt interesów

Autorki nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpływać na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji. Dagmara Mirowska-Guzel otrzymała wynagrodzenie za działalność doradcą oraz związaną z przygotowaniem wykładów konferencyjnych i artykułów naukowych w innym zakresie niż tematyka powyższego artykułu od następujących firm: Roche Polska, Novartis Polska, Bayer Polska, Biogen Polska, ABM Pharma.

Piśmiennictwo

- Acar A, Ugur Cevik M, Evliyaoglu O *et al.*: 2012. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 2012; 112: 275–280.
- Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A *et al.*: Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF- κ B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 5794–5800.
- Altmeyer PJ, Matthes U, Pawlak F *et al.*: Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives. Results of a multicenter double-blind study in 100 patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 977–981.
- Asahi M, Fujii J, Takao T *et al.*: The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem* 1997; 272: 19152–19157.
- Barnett MH, Prineas JW: Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004; 55: 458–468.
- Bizzozero OA, DeJesus G, Bixler HA *et al.*: Evidence of nitrosative damage in the brain white matter of patients with multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2005; 30: 139–149.
- Blum J, Fridovich I: Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 500–508.
- Bö L, Dawson TM, Wesselingh S *et al.*: Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 1994; 36: 778–786.
- Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC *et al.*: Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983; 40: 406–408.
- Breuer K, Gutzmer R, Völker B *et al.*: Therapy of noninfectious granulomatous skin diseases with fumaric acid esters. *Br J Dermatol* 2005; 152: 1290–1295.
- Brown GC, Cooper CE: Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1994; 356: 295–298.
- Calabrese V, Bates TE, Stella AM: NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 2000; 25: 1315–1341.
- Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK *et al.*: Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 69: 481–492.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S: Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323–333.
- Chaudhary P, Marracci GH, Bourdette DN: Lipoic acid inhibits expression of ICAM-1 and VCAM-1 by CNS endothelial cells and T cell migration into the spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006; 175: 87–96.
- Chaudhary P, Marracci G, Yu X *et al.*: Lipoic acid decreases inflammation and confers neuroprotection in experimental autoimmune optic neuritis. *J Neuroimmunol* 2011; 233: 90–96.
- Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M: Is modulation of oxidative stress an answer? The state of the art of redox therapeutic actions in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 7909380.
- Colton CA, Gilbert DL: Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987; 223: 284–288.
- Dehmel T, Döbert M, Pankratz S *et al.*: Monomethylfumarate reduces *in vitro* migration of mononuclear cells. *Neurol Sci* 2014; 35: 1121–1125.
- Diamond BJ, Johnson SK, Kaufman M *et al.*: A randomized controlled pilot trial: the effects of EGB 761 on information processing and executive function in multiple sclerosis. *Explore (NY)* 2013; 9: 106–107.
- Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
- Eberlein-König B, Mempel M, Stahlecker J *et al.*: Disseminated granuloma annulare – treatment with fumaric acid esters. *Dermatology* 2005; 210: 223–226.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N: Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 529–539.
- Fiorini A, Koudriavtseva T, Bucaj E *et al.*: 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: e65184. doi:10.1371/journal.pone.0065184
- Fischer MT, Sharma R, Lim JL *et al.*: NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135: 886–899.
- Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R *et al.*: Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain* 2013; 136: 1799–1815.
- Fonseca-Kelly Z, Nassrallah M, Uribe J *et al.*: Resveratrol neuroprotection in a chronic mouse model of multiple sclerosis. *Front Neurol* 2012; 3: 84.
- Forté M, Gold BG, Marracci G *et al.*: Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7558–7563.
- Fox RJ, Miller DH, Phillips JT *et al.*: CONFIRM Study Investigators: Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1087–1097.
- French HM, Reid M, Mamontov P *et al.*: Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *J Neurosci Res* 2009; 87: 3076–3087.
- Ghoreschi K, Brück J, Kellerer C *et al.*: Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208: 2291–2303.
- Gold R, Kappos L, Arnold DL *et al.*: DEFINE Study Investigators: Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1098–1107.
- Goodin DS: The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. In: Goodin DS (ed.): *Handbook of Clinical Neurology: Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Elsevier, Amsterdam 2014: 231–266.
- Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J *et al.*: Vitamins E and D₃ attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 289–299.
- Gray E, Thomas TL, Betmouni S *et al.*: Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2008; 18: 86–95.
- Guan JZ, Guan WP, Maeda T *et al.*: Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening. *Mol Cell Biochem* 2015; 400: 183–187.
- Gutzmer R, Kapp A, Werfel T: [Successful treatment of skin and lung sarcoidosis with fumaric acid ester]. *Hautarzt* 2004; 55: 553–557.
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM *et al.*: Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; 134: 1914–1924.
- Halliwell B: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18: 685–716.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed., Oxford University Press, Oxford 2015.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K *et al.*: Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007; 101: 566–576.
- Hendriks JJ, Alblas J, van der Pol SM *et al.*: Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med* 2004; 200: 1667–1672.
- Herges K, Millward JM, Hentschel N *et al.*: Neuroprotective effect of combination therapy of glatiramer acetate and epigallocatechin-3-gallate in neuroinflammation. *PLoS One* 2011; 6: e25456.
- van Horsen J, Drexhage JA, Flor T *et al.*: Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1283–1289.
- van Horsen J, Schreibelt G, Drexhage J *et al.*: Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1729–1737.

- Imler TJ Jr, Petro TM: Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17⁺IL-10⁺ T cells, CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 134–143.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M: Molecular mechanism activating Nrf2–Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1208–1213.
- Jana M, Pahan K: Down-regulation of myelin gene expression in human oligodendrocytes by nitric oxide: implications for demyelination in multiple sclerosis. *J Clin Cell Immunol* 2013; 4.
- Johnson SK, Diamond BJ, Rausch S *et al.*: The effect of *Ginkgo biloba* on functional measures in multiple sclerosis: a pilot randomized controlled trial. *Explore (NY)* 2006; 2: 19–24.
- Jones RE, Moes N, Zwickley H *et al.*: Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with alpha lipoic acid and associative conditioning. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 538–543.
- de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP *et al.*: Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2067–2074.
- Kalita J, Kumar V, Misra UK *et al.*: A study of oxidative stress, cytokines and glutamate in Wilson disease and their asymptomatic siblings. *J Neuroimmunol* 2014; 274: 141–148.
- Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N *et al.*: Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2046–2051.
- Karlík M, Valkovič P, Hančinová V *et al.*: Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2015; 48: 24–28.
- Khalili M, Azimi A, Izadi V *et al.*: Does lipoic acid consumption affect the cytokine profile in multiple sclerosis patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Neuroimmunomodulation* 2014a; 21: 291–296.
- Khalili M, Eghtesadi S, Mirshafiey A *et al.*: Effect of lipoic acid consumption on oxidative stress among multiple sclerosis patients: a randomized controlled clinical trial. *Nutr Neurosci* 2014b; 17: 16–20.
- Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N *et al.*: Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 2013; 13: 128.
- Koch-Henriksen N, Sørensen PS: The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010; 9: 520–532.
- Kreuter A, Gambichler T, Altmeyer P *et al.*: Treatment of disseminated granuloma annulare with fumaric acid esters. *BMC Dermatol* 2002; 2: 5.
- Limón-Pacheco J, Gonshebbat ME: The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; 674: 137–147.
- Lin SX, Lisi L, Dello Russo C *et al.*: The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro* 2011; 3: pii: e00055.
- Linker RA, Lee DH, Ryan S *et al.*: Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011; 134: 678–692.
- Litjens NH, Rademaker M, Ravensbergen B *et al.*: Monomethylfumarate affects polarization of monocyte-derived dendritic cells resulting in down-regulated Th1 lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 2004; 34: 565–575.
- Liu JSH, Zhao ML, Brosnan CF *et al.*: Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 2057–2066.
- Lovera J, Bagert B, Smoot K *et al.*: *Ginkgo biloba* for the improvement of cognitive performance in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Mult Scler* 2007; 13: 376–385.
- Lovera JF, Kim E, Heriza E *et al.*: *Ginkgo biloba* does not improve cognitive function in MS: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology* 2012; 79: 1278–1284.
- Lu F, Selak M, O'Connor J *et al.*: Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000; 177: 95–103.
- 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: 907–911.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA *et al.*: Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83: 278–286.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J *et al.*: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–717.
- Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G *et al.*: Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132: 1161–1174.
- Mander P, Borutaite V, Moncada S *et al.*: Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res* 2005; 79: 208–215.
- Marracci GH, Jones RE, McKeon GP *et al.*: Alpha lipoic acid inhibits T cell migration into the spinal cord and suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2002; 131: 104–114.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP *et al.*: Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 1993; 151: 2132–2141.
- Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J *et al.*: The level of isoprostanes as a non-invasive marker for *in vivo* lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2011; 36: 1012–1016.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestrucque S *et al.*: Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: Its differential effects on primary glial cells *in vitro*. *Neuroscience* 1994; 61: 575–585.
- Morini M, Roccatagliata L, Dell'Eva R *et al.*: α -Lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2004; 148: 146–153.
- Mrowietz U, Christophers E, Altmeyer P: Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. *German Multicentre Study. Br J Dermatol* 1998; 138: 456–460.
- Muthian G, Bright JJ: Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte. *J Clin Immunol* 2004; 24: 542–552.
- Natarajan C, Bright JJ: Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168: 6506–6513.
- Nowack U, Gambichler T, Hanefeld C *et al.*: Successful treatment of recalcitrant cutaneous sarcoidosis with fumaric acid esters. *BMC Dermatol* 2002; 2: 15.
- Ohl K, Tenbrock K, Kipp M: Oxidative stress in multiple sclerosis: central and peripheral mode of action. *Exp Neurol* 2016; 277: 58–67.
- Pawate S, Shen Q, Fan F *et al.*: Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferony. *J Neurosci Res* 2004; 77: 540–551.
- Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB *et al.*: Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor κ B (NF- κ B) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. *J Biol Chem* 2012; 287: 28017–28026.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A *et al.*: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990; 51: 283–297.
- Plemel JR, Juzwik CA, Benson CA *et al.*: Over-the-counter anti-oxidant therapies for use in multiple sclerosis: a systematic review. *Mult Scler* 2015; 21: 1485–1495.
- Pulsinelli WA, Duffy TE: Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 1983; 40: 1500–1503.
- Qi X, Lewin AS, Sun L *et al.*: Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 2006; 281: 31950–31962.

- Qi X, Lewin AS, Sun L *et al.*: Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 681–691.
- Qin L, Li G, Qian X *et al.*: Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 2005; 52: 78–84.
- Ray SK, Fidan M, Nowak MW *et al.*: Oxidative stress and Ca²⁺ influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 2000; 852: 326–334.
- Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A: Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 2003; 61: 1122–1124.
- Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K *et al.*: Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 1995; 56: 207–217.
- Schreibelt G, Musters RJ, Reijerkerk A *et al.*: Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 2006; 177: 2630–2637.
- Shindler KS, Ventura E, Dutt M *et al.*: Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis. *J Neuroophthalmol* 2010; 30: 328–339.
- Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ *et al.*: Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 1508–1521.
- Smith KJ, Lassmann H: The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2002; 1: 232–241.
- Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R *et al.*: Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 2009; 80: 45–51.
- Ständer H, Stadelmann A, Luger T *et al.*: Efficacy of fumaric acid ester monotherapy in psoriasis pustulosa palmoplantaris. *Br J Dermatol* 2003; 149: 220–222.
- Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW: Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1980; 37: 94–96.
- Sun Q, Zheng Y, Zhang X *et al.*: Novel immunoregulatory properties of EGCG on reducing inflammation in EAE. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013; 18: 332–342.
- Trapp BD, Nave KA: Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 247–269.
- Treumer F, Zhu K, Gläser R *et al.*: Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1383–1388.
- Tullman MJ: Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 2013; 19 (Suppl): S15–S20.
- Verbeek R, van Tol EA, van Noort JM: Oral flavonoids delay recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 220–228.
- Vladutiu A, Cringulescu N: Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by vitamin A. *Experientia* 1968; 24: 718–719.
- Wang J, Ren Z, Xu Y *et al.*: Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4⁺ T-cell subsets. *Am J Pathol* 2012; 180: 221–234.
- Wang KC, Tsai CP, Lee CL *et al.*: α -Lipoic acid enhances endogenous peroxisome-proliferator-activated receptor- γ to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Clin Sci (Lond)* 2013; 125: 329–340.
- Wang P, Xie K, Wang C *et al.*: Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2014; 72: 249–254.
- Weber HO, Borelli C, Röcken M *et al.*: Treatment of disseminated granuloma annulare with low-dose fumaric acid. *Acta Derm Venereol* 2009; 89: 295–298.
- Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ *et al.*; Canadian Collaborative Study Group: Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12877–12882.
- Xie L, Li XK, Funeshima-Fuji N *et al.*: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 575–581.
- Zhou JF, Yan XF, Guo FZ *et al.*: Effects of cigarette smoking and smoking cessation on plasma constituents and enzyme activities related to oxidative stress. *Biomed Environ Sci* 2000; 13: 44–55.