



Središnja medicinska knjižnica

Poljaković, Zdravka (2004) *Razina hormona rasta i IGF-I u serumu i likvoru oboljelih od multiple skleroze*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/181>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

ZDRAVKA POLJAKOVIĆ

RAZINA HORMONA RASTA I IGF-I U SERUMU I LIKVORU
OBOLJELIH OD MULTIPLE SKLEROZE

Doktorska dizertacija

Zagreb, 2004.

Istraživanje je provedeno u Klinici za neurologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Endokrinološkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada je prof dr sc. Niko Zurak.

Ovaj je rad posvećen mom ocu čiji lik me pratio i hrabrio kada sam već mislila odustati.

Zahvaljujem se prof dr sc N. Zuraku na stručnoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja me pratila tijekom izrade ovog rada, a posebno posljednjih nekoliko mjeseci svojom podrškom pomogla da ga privedem kraju.

Zahvaljujem se i svojim kolegama na radnom mjestu, bez čije pomoći i razumijevanja ovaj rad ne bi bilo moguće dovršiti.

1. UVOD

1. Mijelin i njegova uloga u centralnom živčanom sustavu	7
1.1 Biokemijske značajke mijelina.....	8
1.2 Razvoj mijelinskog omotača u centralnom živčanom sustavu	10
1.3 Fiziološka uloga mijelina	13
1.4 Propadanje mijelinskog omotača i čimbenici demijelinizacije	15
2. Glija stanice i njihova funkcija	20
2.1 Prekursori glija stanica	21
2.2 Astroglija	23
2.3 Oligodendroglia	26
2.4 Uloga glija stanica u stvaranju i održavanju mijelinskog omotača centralnog živčanog sustava	29
3. Faktori rasta i njihov utjecaj na razvoj glija stanica	35
3.1 PDGF (Platelet-derived growth factor)	36
3.2 FGF I i II (Fibroblast growth factor)	38
3.3 TGF β 3 (Thrombocyte growth factor beta)	40
3.4 IGF I i II (Insulin-like growth factor I i II)	41
4. Hormon rasta (HR) i njegova uloga u procesima mijelinizacije	45
4.1 biokemijska svojstva HR	46
4.2 fiziološke uloge HR	51
4.3 HR i procesi mijelinizacije	53
5. Patofiziološki mehanizmi demijelinizacijskih bolesti	57
5.1 eksperimentalni modeli demijelinizacije	58
5.2 patologija oligodendrocita u demijelinizacijskim lezijama.....	61

5.3 značajke demijelinizacijskih lezija u multiploj sklerozi .	64
5.4 uloga faktora apoptoze u multiploj sklerozi.....	68
6. Remijelinizacija u eksperimentalnim i fiziološkim uvjetima	73
6.1 strukturne promjene remijeliniziranog aksona	74
6.2 remijelinizacija u animalnim modelima	75
6.3 Faktori rasta i eksperimentalne mogućnosti promocije remijelinizacije	79
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	84
3. BOLESNICI I POSTUPCI	88
4. REZULTATI	94
5. RASPRAVA	115
6. ZAKLJUČAK	125
7. SAŽETAK	128
8. SUMMARY	130
9. LITERATURA	132
10. POPIS KRATICA	154
11. ŽIVOTOPIS	156

UVOD

1. MIJELIN I NJEGOVA ULOGA U CENTRALNOM ŽIVČANOM SUSTAVU

Poznavanje karakteristika mijelina kao i njegovih osnovnih fizioloških zadaća unutar funkcioniranja centralnog živčanog sustava (CNS) neophodno je za razumijevanje procesa demijelinizacije i remijelinizacije. Osnovna uloga mijelina poznata je već gotovo stotinu godina, međutim detaljnija saznanja o građi mijelina kao i njegovim drugim svojstvima bilo je moguće otkriti jedino primjenom sofisticiranijih tehnika koje omogućavaju ultrastrukturnu analizu ispitivanog materijala kao i imunohistokemijske postupke u cilju analize međusobnog djelovanja pojedinih proteinskih molekula.

Posljednjih nešto više od 20 godina razvojem potrebnih tehnika saznanja o građi i funkciji mijelina dobila su potpuno novu dimenziju omogućivši bolji uvid u patologiju demijelinizacijskih bolesti.

(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61)

1.1 Biokemijske značajke mijelina

Mijelin je visokospecifična tvar koja sudjeluje u građi aksona perifernog i centralnog živčanog sustava. Funkcionalno prvenstveno potpomaže provođenju električkih impulsa, a čini otprilike 70% težine suhe mase centralnog živčanog sustava.^(1,2,3)

Mijelinski omotač je građen od proteinsko (25-30%) - lipidne (70-75%) strukture netopive u vodenim medijima. Lipidna komponenta u obliku sfingolipida, derivata glicerola, sudjeluje u oko 75% građe mijelina. Jednu četvrtinu lipidnog sastava čini kolesterol a gotovo polovicu fosfolipid. Ostatak lipidne građe pripada galaktolipidima (GalC) koji su glavni mijelinski glikolipidi. Zanimljivo je da su poliklonalna i monoklonalna antitijela na GalC specifični površinski markeri za mijelin ali i oligodendrocite. Manje od 1% lipidne strukture zauzimaju ganglioziidi.^(1,2,3,4)

Proteinsku komponentu sačinjava ukupno desetak različitih proteinskih lanaca. Više od 50% proteina čine bazični mijelinski protein (MBP) na prvom mjestu, a potom proteolipidni protein (PLP) i mijelin-oligodendrocitni glikoproteini (MOG).^(4,5,6)

MBP je osnovna proteinska supstanca odgovorna za strukturni integritet i fragmentaciju mijelinskog omotača. Posebna skupina proteina (od kojih je građeno oko 5% suhe tvari mijelina) su Wolfgramovi proteini. Oni sadrže molekule visoke

molekulske težine (W2) vjerojatno građene od tubulina, dok su molekule manje molekulske težine (W1) vjerojatno mijelin specifični enzimi (npr 2'3-ciklička-nukleotidna-3'-fosfohidroksilaza). ^(7,8,9,10)

Kompaktna mijelinska ovojnica cilindrično obavija aksone neurona, a sastoji se od koncentričnih slojeva mijelina koji se po porijeklu ali i biokemijskim karakteristikama razlikuju u perifernom (PNS) i centralnom živčanom sustavu (CNS). ^(1,2,3,4,5,6,7,8)

Mijelinski omotač u CNS-u nastaje zahvaljujući djelovanju oligodendrocita za razliku od mijelina u PNS-u koji nastaje iz Schwannovih stanica. Mijelin centralnog živčanog sustava nije glikoziliran, a strukturne razlike postoje i na razini Ranvierovih čvorova, (nemijelinizirana područja širine otprilike 1 mikrometra), gdje perinodalni glijalni izdanci učestalo dolaze u kontakt direktno s aksolemom. Akson je obogaćen i s intramembranskim partiklima korespondirajućeg čvora i vezan uz Na kanale što nije slučaj kod Ranvierovog čvora u PNS-u. ^(10,11,12,13)

Paranodalna područja sastavljena su od multiproteinskog kompleksa stanica čija je funkcija u rastavljanju linearne distribucije Na i K kanala.

Danas se zna da mijelin nije isključivo inertni provodni odnosno izolacijski materijal. On naime sadrži i brojne enzimske komponente uključivo i bazičnu protein-kinazu i već spomenutu cikličnu nukleotidnu fosfodiesterazu kao i brojne membranske ionske kanale. Također je uočeno da postoji stalna interakcija između mijelina i some oligodendrocita, koja podržava metaboličku i ostale funkcije svog proizvedenog mijelina tijekom čitavog života organizma, što jasno upućuje na funkcionalnu i anatomsku neodvojivost ove dvije strukture. ^(14,15,16,17,18,19,20)

1.2 Razvoj mijelinske ovojnice u CNS-u

Sinteza mijelina u CNS-u događa se ontogenetski relativno kasno. Usprkos činjenici da se prvi tragovi mijelina mogu naći u području kralješnične moždine oko 75. gestacijskog dana, u čovjeka razdoblje sinteze mijelina i mijelinizacije traje i do druge godine života. ^(1,19,20,21,22,23)

Sinteza i produkcija mijelina u CNS-u rezultat su kompleksnih interakcija oligodendroglia stanica, aksona i faktora rasta. ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23)

Za poticanje mijelinizacijskih mehanizama potreban je kontakt membranskih izdanaka zrelog oligodendrocita s aksonom nakon čega dolazi do obavijanja aksona lamelama mijelina. Pretpostavlja se da u mijelinizaciji ulogu ima i astroglia i to prvenstveno u oblikovanju međučvorova. ^(23,24) Za pravilan vremenski slijed potrebne kaskade zbivanja odgovorni su neuralni faktori rasta koji upravljaju proliferacijom, diferencijacijom i migracijom glije iz prekursorskih stanica. ^(25,26,27)

Mijelinizacija ovisi i o karakteristikama stanične površine oligodendrocita i molekulama ekstracelularnog matriksa koje potiču interakcije između aksona i mijelina. Kako bez stalne interakcije aksona i oligodendrocita nema mijelinizacije potrebno je neprekidno održavanje glio-neuralne sveze što omogućava diferentna ekspresija adhezijskih molekula (kao što su tenascin, laminin ili fibronektin). Samu sintezu mijelina potiče pak direktan kontakt oligodendrocitnog membranskog izdanka i aksona minimalne debljine od jednog milimetra. Jedan oligodendrocit

(površine od oko 100-300 mikrom²) može proizvesti površinu od četiri do čak pedeset tisuća kvadratnih mikrometara mijelinskog omotača, u ovisnosti o broju aksona koje mijelinizira (što predstavlja 600-700 puta veću površinu od njegove vlastite). Kombinacija međustaničnih zbijanja, koja vjerojatno uključuje i nespecifične reakcije izdanka oligodendrocita (OG) sa supstratumom i specifične interakcije između adhezijskih molekula na površini oligodendrocita i neuralne membrane, stimulira sintezu mijelina. ^(18,19,20,22,23,28,29,30,31,32)

Početak mijelinizacije je obavijanje izdanka oligodendrocitne membrane uokolo aksona, dok ga u potpunosti ne okruži, a isti postupak ponavlja se u koncentričnim krugovima, pri čemu se stvara višeslojni mijelinski omotač, odnosno slojevi multiplih membranskih lamela. Tijekom tog procesa postupno se iz slojeva izdvaja sadržaj citoplazme pa se dva unutrašnja sloja lipidne membrane smještavaju jedan nasuprot drugom. Ubrzo potom se spajaju formirajući osnovnu tamnu liniju vidljivu na ultrastrukturnim presjecima. Vanjski slojevi se također spajaju oblikujući nešto nježniju liniju. Ultrastrukturne analize međutim pokazuju da ta vanjska linija nije nikada potpuno spojena, već se sastoji od dva odvojena sloja. ^(33,34,35) Cijela mijelinska ovojnica, odnosno njezini slojevi, spojeni su preko sustava čvrstih veza, građenih od prvenstveno proteinskog materijala, a predstavljaju tzv. radijalne sastavne dijelove. ^(35,36)

Mijelinska ovojnica razvija se u duljinu u oba smjera uzduž aksona i oblikuje internodalne segmente koji završavaju kružno smještenim citoplazmatskim organelama. Internodalni segmenti međusobno su povezani i zajedno tvore paranodalnu regiju koja se nalazi neposredno uz nemijelinizirane Ranvierove čvorove. ^(34,35,36,37,38)

Tijekom razvoja mijelinskog omotača on prolazi različite diferencijacijske stadije. U prvom stadiju omotač još nije kompaktan i ne sadrži mijelinski bazični protein (MPB), ali su već prisutni kolesterol, galaktocerebrozidi (GalC), sulfatidi kao i neki

specifični antigeni i proteini (prooligodendroblast antigen i mijelin oligodendrocitni specifični protein). U idućem stadiju u posebne se regije intenzivno deponira MPB prvenstveno u blizini mikrotubula, a od tamo se intenzivno povlači enzim nazvan 2'3'-ciklička-nukleotidna 3'- fosfohidrolaza (CNP-aza) koja sudjeluje u stvaranju aktinskih filamenata. Ulaganjem MPB-a u područja mijelina on postaje kompaktan čime je omogućeno njegovo omotavanje oko aksona. Posljednji stadij karakteriziran je sve većim gubitkom tekućeg sadržaja i povećavanjem gustoće i čvrstoće mijelina stvaranjem sve većih zona bogatih MPB-om. U konačnici zreli mijelin sadržava samo mali broj područja ispunjenih tekućinom, nazvanih Schmidt-Lantermanovim zonama. ^(21,22,23,39,40)

Jedan oligodendrocit u fiziološkim uvjetima mijelinizira oko 50 aksona koji zadržavaju svoju prvotnu mijelinsku ovojnicu tijekom cijelog života organizma, izuzev u slučaju pojave traumatske nokse ili određenih bolesti. Oligodendrocit uz pomoć faktora rasta “prepoznaje” i mijelinizira isključivo aksone, a uočeno je da je i debljina mijelinskog omotača u direktnoj korelaciji s debljinom aksona (jedino aksoni minimalne debljine od 1 μ m mogu potaknuti proces mijelinizacije, a u konačnici mijelinska ovojnica zauzima 1/3 ukupne debljine mijeliniziranog aksona). ^(19,20,21,22,23,40,41)

1.3. Fiziološka uloga mijelina

Danas je poznato da postoji više čimbenika koji su ključni u funkcionalnoj organizaciji strukture mijelina kao i njegovoj fiziološkoj ulozi. Odavno se zna uloga mijelina u specifičnom provođenju impulsa, odnosno akcijskog potencijala. Zahvaljujući trenutnom ulasku potencijala kroz Na⁺-kanale u području Ranvierovog čvora, te njihovom izlasku na mjestu slijedećeg čvora brzim zatvaranjem odnosno otvaranjem voltažnih kanala, akcijski potencijal putuje uzduž aksona brzinom i do 120 metara u sekundi. ^(1,8,41,42)

Uloga mijelina međutim nije samo u prijenosu akcijskog potencijala. Najnovija su otkrića vezana uz otkrivanje posebne skupine proteina unutar čvrstih veza mijelinskog omotača. Radi se o kladin-11/OSP proteinu koji se nalazi u radijalnim sastavnim dijelovima mijelina CNS-a. Izgleda naime da je mijelin mreža međusobno povezanih čvrstih i priljubljenih spojeva koji zajednički sudjeluju u perfuziji i održavanju periaxonskog prostora, a time indirektno i aksona. ^(43,44)

Osnovna uloga čvrstih spojeva jest regulacija adhezije i formacije pora u mijelinskom omotaču. Izgledno je da proteini imaju glavnu ulogu kako u izgradnji tako i u posredovanju odnosno signalizaciji djelovanja mijelina, a osim tubulina i aktina, najviše dokaza govori u prilog tome da je osnovni medijator baš MBP. ^(29,30,31,32)

Navedeni sustavi signalizacije putem stvaranja ili razaranja čvrstih spojeva izgleda da reguliraju rast stanica i to moguće baš stanica koje sudjeluju u rastu odnosno širenju mijelinskog omotača. Jedan od mogućih mehanizama ide i preko GalC glikolipida, koji se u velikoj koncentraciji nalazi u području vanjskog sloja omotača, a nalazi se i u citoplazmi oligodendrocita. Vezanje specifičnih antitijela na GalC dovešće do signala za okidanje kaskade zbivanja koja obuhvaća

raspadanje fosfolipida, ulaz kalcija (Ca) u citoplazmu, defosforilaciju MBP i redistribuciju membranskih površinskih antitijela direktno iznad područja bogatih MBP-om, a dolazi i do redistribucije kolesterola koji se, do tada ravnomjerno raspoređen, počinje skupljati u pojedinim dijelovima citoplazme. Sve navedeno konačno dovodi do nestajanja polimeriziranih mikrotubula, gubitka tekućeg sadržaja citoplazmatskih kanala, spajanja dijelova bogatih MBP-om, te do zaustavljanja rasta omotača. ^(1,22,45)

Mijelin stoga nije samo pasivni provodni sustav, već njegovi proteinski sustavi aktivno sudjeluju u vlastitom rastu, kao i prolazu i izmjeni tvari odnosno iona. Jedna od zanimljivih teorija jest da navedeni sustav proteina sudjeluje i u regulaciji količine tekućine u posebnim odjeljcima unutar mijelinskog omotača koji uglavnom sadrže vodu i natrijev klorid. Na taj bi način isti sustav mogao regulirati količinu tekućine u periaxonskom prostoru, odnosno regulirati perfuziju navedenog prostora. Signali za navedeno djelovanje dolaze najvjerojatnije iz samog aksona putem akcijskog potencijala. On trigerira fosforilaciju MBP-a, a fosforilacija odnosno defosforilacija potom predstavlja poticaj za aktivaciju odnosno deaktivaciju čvrstih spojeva, čime se otvaraju pore za ulaz tekućine u periaxonski prostor. Takav ulaz odnosno izlaz tekućine mogao bi služiti održavanju izotoničnosti samog periaxonskog prostora, odnosno održavanju biostabilnosti membrane nakon svakog akcijskog potencijala. Slijedeća uloga opisanog mehanizma mogla bi biti u održavanju potrebne udaljenosti između mijelina i aksonske membrane, koja je nužna za provođenje akcijskog potencijala. U eksperimentalnim je uvjetima, na posebno mutiranim miševima, uočeno da navedeni mehanizam aktivno sudjeluje i u porastu volumena mijelina što je reverzibilan proces, ali i vrlo često prvi znak propadanja omotača. Gubitak funkcije i pojačana propusnost krvno-moždane barijere ili nefiziološka aktivacija pojedinih membranskih receptora na mijelinskoj membrani može također dovesti do porasta

volumena mijelina upravo zbog gubitka funkcije proteina na mjestima čvrstih spojeva i akumulacije tekućine unutar omotača. ^(1,13,41,45)

Navedeni dokazi ukazuju da je uloga mijelinskog omotača višeznačna, i da je on aktivni čimbenik u međusobnoj regulaciji i funkcioniranju i oligodendrocita i aksona, odnosno da je za pravilno funkcioniranje navedenih struktura nužna stalna interakcija sva tri faktora. ^(1,22,23,24,37,38,39,41,44)

1.4 Propadanje mijelinskog omotača i čimbenici demijelinizacije

Održavanje funkcije aksona u potpunosti je ovisno o intaktnosti mijelinskog omotača. Već sasvim mala oštećenja mijelina dovest će do poremećaja u provođenju impulsa, a potom i do patomorfoloških promjena samog aksona. ^(1,22,37,38,39,43)

Značajan gubitak provodljivosti nastupa odmah u času demijelinizacije aksona, a prvenstveno je posljedica redistribucije Na⁺-ionskih kanala, koji su u fiziološkim uvjetima smješteni u najvećem broju u području Ranvierovih čvorova. Nakon nokse koja uzrokuje demijelinizaciju, kanali se preraspodjeljuju uzduž aksona, kako bi se donekle održala funkcija provođenja potencijala, tako da unutar nekoliko dana i demijelinizirani akson može provoditi impulse, međutim daleko manjom brzinom. Iako takav akson donekle provodi impulse, on je bioelektrički izrazito nestabilan, hiperekscitabilan i stvara «ektopičke» potencijale koji putuju uzduž aksona u oba smjera dovodeći do funkcionalnih poremećaja. ^(22,23)

Demijelinizacija tijekom života organizma je relativno čest proces, a rezultat je brojnih noksi od kojih su najčešće posljedica direktne ili indirektna traume,

hipoksije, temperaturnih poremećaja ili pak upalnih reakcija. U većini slučajeva demijelinizacija jest reverzibilan proces i predstavlja fiziološku reakciju na navedena patološka stanja. ^(1,22,23)

Demijelinizacijske reakcije na upalne procese odnosno na autoimune poremećaje danas su najčešći predmet istraživanja, budući da se smatra da upućuju na razjašnjavanje etiopatogeneze demijelinizacijskih bolesti, pa tako i multiple skleroze. ^(23,37,38,39)

Uobičajeni slijed upalnog zbivanja započinje migracijom aktiviranih limfocita kroz cerebralnu i spinalnu endotelnu barijeru, odnosno poremećajem hematolikovske barijere. Aktivirani limfociti uzrokuju lokalnu upalnu reakciju, te zbog svojih antigenskih svojstava aktiviraju mikrogliju, to jest primarne imunokompetentne stanice centralnog živčanog sustava. Limfociti mogu potom biti odstranjeni bilo fagocitozom bilo apoptotičkom smrću, potomje uslijedi ukoliko nisu bili prepoznati kao antigeni. Akutna simptomatologija uzrokovana je međutim nekontroliranim otpuštanjem citokina iz aktiviranih limfocita odnosno nagomilavanjem citokina. Akumulacija citokina aktivira mikrogliju i na taj način povećava afinitet površinskih receptora same mikroglije na odgovarajuća antitijela (ili druge odgovarajuće ligande). Ukoliko oligodendrociti ili sam mijelin po površini sadrži navedena antitijela ili ligande, doći će do fatalnog vezanja aktivirane mikroglije (što je proces čiji je redoviti posrednik tumorski nekrotički faktor alfa – TNFalfa) i do propadanja mijelinskog omotača. ^(1,22,32)

Vidljivo je stoga da značajnu ulogu medijatora u navedenoj kaskadi zbivanja ima mikroglija. Stanice mikroglije predstavljaju oko 20% svih glija stanica u CNS-u, a funkcijski su najsličnije perifernim makrofazima. Sadrže antigen koji memorira T-limfocite i aktivira native T stanice a imaju i citotoksičke i fagocitičke sposobnosti. U aktiviranom stanju proizvode citokine i medijatore upalne reakcije povećavajući imunološku funkciju. Fiziološka im je uloga i u odstranjivanju

nepotrebnog materijala nakon nokse ili tijekom razvojnog razdoblja centralnog živčanog sustava.

Aktivacija je ključni trenutak funkcije mikroglije. Eksperimentalno je dokazano da ih aktiviraju lipopolisaharidi, citokini iz T-stanica, kao i neke druge grupe citokina. Nakon aktivacije mikroglija mijenja svoj morfološki izgled, postaje ameboidnog oblika uz značajno povećanje motiliteta i adhezivnih sposobnosti. Dezaktivacija mikroglije posljedica je programirane stanične smrti, odnosno apoptoze. Sasvim je izvjesno da nefiziološka aktivacija ili izostanak apoptotičkih mehanizama, mogu dovesti do već opisanog razvoja događaja koji dovode konačno i do demijelinizacije. ^(1,22,23,46,47)

U brojnim istraživanjima danas je dokazano da je proces demijelinizacije usko vezan i uz propadanje oligodendrocita (OG). Smrt i gubitak OG uočen je u rubnim područjima aktivnih demijelinizacijskih lezija, odnosno mjestima aktivne destrukcije mijelina. Taj nalaz može upućivati bilo na propadanje OG istovremeno s mijelinskim omotačem ili pak na njihovo propadanje kao posljedicu uništenja mijelinskog omotača. Ovo potonje češće je primijećeno u demijelinizacijskim lezijama koje su posljedica autoimune reakcije. Ultrastrukturne analize takvih OG ukazale su da je njihovo propadanje posljedica i apoptotičkih mehanizama kao i nekroze. ^(48,49)

Dodatno je uočeno da postoji najmanje pet modela demijelinizacijskih lezija: demijelinizacijske lezije s vrlo malim gubitkom pripadajućih OG, demijelinizacijske lezije uz koje istovremeno ide i gubitak OG samo na mjestu aktivne destrukcije mijelina, demijelinizacijske lezije s postupnim gubitkom OG koji je to manji što je mjesto udaljenije od same aktivne lezije, izrazito destruktivne demijelinizacijske lezije uz koje se paralelno javlja gubitak aksona i astroglije i na kraju demijelinizacijske lezije kod kojih je i na rubovima uočen ekscesivan gubitak OG. ^(23,50,51,52,53)

Budući da je OG metabolički aktivna stanica, njegovo fiziološko djelovanje vezano je uz neprekidan prolazak signala kroz staničnu membranu koji induciraju otvaranje ili zatvaranje ionskih kanala, te promjenu u koncentraciji intracelularnog kalcija i protein-kinaze. ^(54,55,56) Te reakcije dovode do indukcije gena čime trenutačno počinje proces transkripcije stanično specifičnih produkata. Za nesmetano održavanje čitavog procesa potrebno je neprekidno održavanje homeostaze stanice, koja je moguća samo ukoliko je stanica zadržala mogućnost brze intracelularne reakcije što omogućava adekvatnu sintezu proteina i obnavljanje stanične strukture. Indukcija tzv. brzodjelujućih gena stimulirana je prisustvom faktora rasta, kao i porastom koncentracije intracelularnog kalcija u trajanju od svega nekoliko minuta. Ipak dugotrajniji porast koncentracije intracelularnog kalcija može prekinuti transkripciju gena i proizvodnju specifičnih proteina i dovesti do destabilizacije stanice pa i njenog ireverzibilnog oštećenja. Već ranije spomenuti faktor TNFalfa (prisutan tijekom imunološke upalne reakcije) inducira porast intracelularnog kalcija u stanicama glije (poglavito astroglije) i ima direktan utjecan na metabolizam aksona. ^(54,57,58,59)

Porast intracelularnog kalcija može biti fatalan i za oligodendrogliju, poglavito u istovremenom prisustvu T stanica koje im značajno povećavaju propusnost membrane i dovode do naglog porasta citosolnog slobodnog kalcija. Oligodendroglija je sposobna za regenerativne procese ukoliko opisana noksa ne traje dulje od dvadesetak minuta. Ipak, zanimljivo je da je već jednom oštećen OG, usprkos činjenici da se uspio regenerirati, znatno osjetljiviji na ponovljenu noksu uz manju reparabilnu sposobnost. Primijećeno je također, da u slučaju postojanja čak i manje koncentracije antitijela na površini OG, dolazi do značajno povećane osjetljivosti tog istog OG na litička oštećenja. TNF-alfa samostalno može inducirati porast intracelularnog kalcija, a in-vitro direktno oštećuje OG i dovodi do lize stanice. Ubrizgavanje TNF alfa u eksperimentalnim uvjetima u kulturu aksona

optičkog živca miša dovest će do demijelinizacije aksona, a u kralježničnu moždinu murine do upalnog odgovora koji sadrži značajke autoimunog encefalomijelitisa. (22,33,57,59,60)

S druge strane postojanje anti-TNFalfa antitijela ili tumorskog faktora rasta-beta imat će protektivnu ulogu za oligodendrocit, odnosno in vitro je dokazano da skupine faktora rasta mogu spriječiti nekontrolirani porast intracelularnog kalcija u OG. Optimalna koncentracija više faktora rasta u eksperimentima in-vitro i in-vivo dokazano može spasiti stanicu od inače letalne kaskade događaja na njezinoj staničnoj membrani. (59,60,61)

Propadanje mijelinske ovojnice stoga je posljedica poremećaja neurobioloških mehanizama staničnog reda oligodendroglije kao i poremećene homeostaze same stanice odnosno njezine okoline, dok su etiopatogenetski faktori koji dovode do demijelinizacije sasvim sigurno višestruki. (1,23,54,58,59,61)

2. GLIJA STANICE I NJIHOVA FUNKCIJA U PROCESU MIJELINIZACIJE

Razmišljanja koja su prevladavala u drugoj polovici ovog stoljeća, da je isključivo oligodendrocitni stanični red zaslužan odnosno odgovoran za procese mijelinizacije, te da će se problem nemogućnosti remijelinizacije u brojnim patološkim stanjima moći riješiti potpunim poznavanjem patofiziologije oligodendroglije, u posljednjih je dvadesetak godina sasvim napušteno. Danas se zna da je mijelinizacija složen proces, koji za nesmetano odvijanje zahtjeva međudjelovanje brojnih (još uvijek nedovoljno poznatih) čimbenika u točnom vremenskom slijedu. Sasvim je sigurno da i drugi stanični redovi glija stanica sudjeluju (izravno ili neizravno) u procesu mijelinizacije, a da se pri tom ne smije zanemariti i međusobni utjecaj neurona i glije tijekom razvojnog procesa centralnog živčanog sustava. Jedino poznavanje fizioloških mehanizama i djelovanja glijalnih stanica od samih početaka razvoja zrelih oblika moći će pomoći i prilikom rasvjetljavanja etiopatogenetskih čimbenika demijelinizacije i eventualnog promoviranja remijelinizacijskih procesa.

(1,2,3,6,7,22,23,54,57,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77)

2.1. Prekursori glija stanica

Dokazi o postojanju stanica-prekursora glije protežu se unatrag više od desetak godina a od tada i započinju brojna istraživanja o karakteristikama prekursora, te njihovoj ulozi kako u razvojnoj fazi centralnog živčanog sustava, tako i u mozgu odraslog organizma. ^(62,63,64,65,66)

Istraživanja na eksperimentalnim životinjama, prvenstveno miševima i štakorima dokazala su da stanice prekursori oligodendroglije potječu iz subventrikularne zone prednjeg dijela mozga, a najraniji dokazi o postojanju prekursora OG spinalne moždine otkriveni su već 12-14 embrionalnog dana u ventralnom dijelu neuralne tube. ^(67,68,69) Novija istraživanja in-vitro, ali i in-vivo pokazala su međutim da su najmlađe, potpuno nediferencirane stanice, tzv. «pre-progenitori» u stvari izvor malih, visokoproliferativnih, izrazito pokretljivih pravih progenitorskih stanica, koje in vitro iskazuju bipolarnu morfologiju, a identificira ih se pomoću monoklalnog antitijela A2B5 koji prepoznaje GD3 ganglioizid na površini tih stanica. One napuštaju subventrikularnu zonu i nastavljaju svoju proliferaciju istovremeno migrirajući, prelazeći relativno veliku udaljenost do svoje ciljne odrednice, odnosno regija sive i bijele tvari centralnog živčanog sustava. ⁽⁷⁰⁾ Prekursori tada paralelno i započinju proces diferencijacije, postajući morfološki zrele stanice s brojnim izdancima, relativno jednostavnog uzorka te ubrzo počinju ekspimirati specifične antigene stanične površine koje prepoznaje O4 monoklono antitijelo. U tom trenutku prestaje navedeni ciklus, a nove stanice počinju formirati mrežu povezanu s vlastitim izdancima, te se javlja novi površinski antigen, galaktocerebrozid, kojeg se smatra karakterističnim za zrele oligodendrocite. Zreli OG ekspimiraju i druge klasične već spomenute mijelinske

proteine kao što su MBP, CNP, mijelinski proteolipidni protein (PLP) i mijelinski glikoprotein (MAG). ^(1,22,23,62,67,70)

Zanimljivo je međutim da su subependimske stanice, odnosno “pre-progenitori”, homogena populacija stanica koja je međutim sposobna proliferirati i diferencirati i u glija stanice ali i u neurone. ^(23,67,70,71) Ultrastrukturne analize “pre-progenitora” dokazale su homogenost stanica ventrikularnog područja koje su opisane kao uniformna populacija nediferenciranih stanica blasta. Saznanja o njihovoj mogućoj pluripotentnosti potječu već iz 19. stoljeća. Danas se međutim zna da takove pluripotentne stanice možemo naći i u području neuralne kreste, embrionalne ventrikularne zone, retine, septalne regije i tektuma. Njihov najveći broj vjerojatno podliježe programiranoj staničnoj smrti, a one koje prežive diferenciraju se bilo u glija stanice bilo u neurone. U kojem trenutku je proces diferencijacije konačan u smislu pojedinog staničnog reda još nije poznato, ali je sasvim sigurno rezultat djelovanja faktora okoline, odnosno u najvećoj mjeri faktora rasta čije se specifično djelovanje izmjenjuje tijekom migracije, proliferacije i diferencijacije stanica. U fazi koja je značajna za procese maturacije stanica i mijelinizaciju, razvojem već opisanog O-2A progenitora (oligodendrocit-tipa 2 astrocit progenitor) stanica još uvijek zadržava (barem u in-vitro studijama) mogućnost bipotentnosti, tj. diferencijacije bilo u oligodendrocit ili astrocit. ^(1,22,23,67,68,70,71,72)

Posebno značajna za procese remijelinizacije jest činjenica da i u odraslom organizmu postoji populacija “pre-progenitorskih” stanica koje su pluripotentne i zadržavaju sposobnost diferencijacije bilo u neurone bilo u glija stanice u ovisnosti o adekvatnom fiziološkom signalu. Odrasle i neonatalne progenitorske stanice imaju brojne sličnosti, ali i neke razlike. Obje eksprimiraju gangliozid koji prepoznaju A2B5 antigeni, međutim stanice odraslog organizma eksprimiraju i O4 antigen, dok neonatalne eksprimiraju isključivo vimentin intermedijatorne filamente. Odrasli O-2A progenitor je obično unipolaran, sporije migrira i ima duži

stanični ciklus nego njegov neonatalni par. Odrasli progenitor također sporije maturira, naime potrebno mu je 4-5 dana da bi 50% stanice ekspimiralo GalC dok je neonatalnom progenitoru za isto potrebno svega 2 dana. Vjerojatno je “odrasli” progenitor treća vrsta stanica u koju je neonatalni “pre-progenitor” sposoban diferencirati. Na taj je način omogućeno samoobnavljanje i generacija novih oligodendrocita u odrasloj dobi organizma. Poticaj za obnavljanje je vjerojatno postojanje različitih noksi, uključivo i demijelinizacijskih, te je neophodan preduvjet remijelinizacije. ^(62,63,64,65,66,73,74)

2.2. Astroglija

Stanični red astroglije, odnosno astrociti imaju brojne funkcije u centralnom živčanom sustavu. Oni čine arhitektonsku mrežu koja je podloga neuronima i određuju anatomske granice pojedinih područja, izvor su raznih faktora rasta i citokina, a danas se zna da imaju ulogu i u provođenju impulsa kao i procesu reparacije CNS-a nakon različitih noksi. ^(1,62,63,66,73,75)

Novija su istraživanja pokazala da astrociti sadrže veliki broj Na⁺-ionskih kanala te da anatomski čvrsto priliježu uz akson u području Ranvierovih čvorova. Izgleda da su upravo astrociti važan izvor Na⁺-ionskih kanala, a postoje i neke pretpostavke da Astrocit tip-2 sudjeluje u samom stvaranju i oblikovanju Ranvierovog čvora, iako neka najnovija istraživanja tu ulogu dodijeljuju oligodendrogliji, odnosno progenitorima oligodendroglije. ^(1,63,75,76)

Brojni upalni i reaktivni odgovori posredovani su putem astroglije, odnosno faktora koje astroglija proizvodi (uključivo i već spomenute brojne faktore rasta). Astrociti prvenstveno “odgovaraju” na neuralne signale dobivajući karakteristike reaktivnih

stanica koje sudjeluju ili posreduju u procesima adhezije, proizvodnji citokina, vezanju kalcija, citoskeletnim trenutnim odgovorima, transportnim ili receptorskim mehanizmima. Hipertrofični astrociti zajedno s fibroblastima i meningealnim stanicama sačinjavaju glijalni ožiljak. In vitro je dokazano da i astrociti u mirovanju proizvode citokine i faktore rasta, ponekad i u suradnji s mikroglijom. Smatra se međutim da jedni te isti citokini proizvedeni u različitim vremenskim fazama tijekom nokse mogu djelovati i pro- ali i antiupalno. Ono što je sasvim sigurno jest da su astrociti glavni izvor topivih medijatora upale sintetiziranih lokalno tijekom odgovora na nastalu noksu. ^(1,54,566,73,76)

Razvoj astroglije također ovisi o prisustvu faktora rasta, međutim današnja istraživanja nisu ih još u potpunosti definirala. Zna se da postoje najmanje dva podtipova astrocita: tip 2 astrocit (prvi puta opisan u kulturama optičkog živca) i tip 1 astrocit koji je morfološki sličan fibroblastima. Tip 1 astrociti eksprimiraju GFAP ali ne i A2B5 dok tip 2 astrociti eksprimiraju oba antigena. Smatra se da su tip 2 astrociti oni oblici koji sudjeluju u formiranju Ranvierovih čvorova. ^(62,63,69,73,75) Danas još uvijek postoje nesuglasice o progenitorskim stanicama astroglije. Neki autori smatraju da su to “pre-progenitori” čija pluripotentnost omogućava diferencijaciju i u neurone, oligodendrocite ali i u oba tipa astroglija stanica. ^(1,22,23,63,69,71) Posljednjih godina su međutim prikupljeni dokazi koji opovrgavaju takvo tumačenje. Posebnim metodama dokazivanja diobe stanica (inkorporacijom timidina) uz upotrebu određenih profila antigena, dokazano je da unutar optičkog živca postoje i astroblasti i oligodendroblasti ali ne i bipotencijalni progenitori. Prema tim istraživanjima, astrociti se razvijaju iz svoje vlastite progenitorske stanice a ne iz O-2A progenitora. ^(75,76,77) Ipak više studija je pokazalo da se tijekom demijelinizacijskih noksi iz tog progenitora može razviti i oligodendrocit ali i tip 2 astrocit. Alternativna interpretacija uočenog fenomena jest da O-2A stanice mogu biti bipotentne, odnosno razviti se i u astrocite samo u

određenim patološkim stanjima. U prilog tom objašnjenju govori i uloga CNTF, jednog od faktora rasta koji se izlučuje kada postoji oštećenje stanice, a in vitro inducira diferencijaciju astrocita iz O-2A progenitora. ^(1,23,63,66) U svjetlu tih saznanja treba naglasiti i ulogu astroglije u reakcijama na oštećenja. Jedan od najznačajnijih faktora rasta u procesu stvaranja ožiljaka nakon eksperimentalno izazvane penetrantne ozljede moždane kore jest tumorski faktor rasta $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), čija se inače niska koncentracija izrazito povisuje tijekom sličnih noksi. Koncentracija se povisuje u stanicama koje su bilo ciljevi fokalnog oštećenja ili posreduju u odgovoru na njega (neuroni, glija stanice, ependimalne stanice, mikroglia i upalne stanice). TGF $\beta 1$ povećava sposobnost djelovanja molekula koje sudjeluju u rastu aksona (laminin i fibronektin), ograničava infiltraciju makrofaga i mikroglije i potencira stvaranje glijalne membrane koju sačinjavaju reaktivni astrociti ograničavajući tako štetno zbivanje od ostalih dijelova CNS-a. TGF $\beta 1$ pronađen je u većim koncentracijama i u astrocitima u kroničnim demijelinizirajućim lezijama. ^(1,23,37,76,77)

U zdravom organizmu precizno je određena granica između promoviranja reaktivnih promjena astrocita, koji tada “inkapsuliraju” oštećeno područje i osiguravaju medijatore (citokine, faktore rasta i potrebne stanice) za nastajanje procesa oporavka, i s druge strane, nastajanja ožiljka (građenog od gusto poslaganih hipertrofičnih astrocita) koji će onemogućiti regeneraciju. Mehanizmi koji posreduju i reguliraju te procese, odnosno njihove patofiziološke inačice, još nisu u potpunosti poznati. ^(1,22,23,37,39,66,75,76,77)

2.3. Oligodendroglia

Danas je (kao što je već ranije spomenuto) sasvim sigurno dokazano da se oligodendroglia razvija iz prekursorskih stanica, koje se tek nakon točno determiniranih razdoblja migracije i proliferacije, konačno diferenciraju u odrasli oligodendrocit. Te prekursorske stanice nalaze se u brojnim područjima centralnog živčanog sustava tijekom njegovog razvoja i sazrijevanja, međutim izgleda da ih je najviše u ventrikularnim zonama i strijatalnom području. ^(62,63,64,65,66)

Prvi stadij diferencijacije oligodendrocitnog progenitora izgleda da nastaje u trenutku kada ta stanica počinje lučiti površinske molekulske markere koje prepoznaje monoklonalno antitijelo nazvano O4. To antitijelo može markirati sulfatide, seminolipide i, za sada još nedovoljno poznat, pro-oligodendroblastični antigen. Daljnjom diferencijacijom ta stanica postaje sve manje pokretna (iako zadržava sposobnost proliferacije) a ultrastrukturalno gubi vimentin-pozitivne filamente. Danas se također zna da u času pozitivnosti na O4 antitijelo stanica vrlo vjerojatno počinje gubiti mogućnost razvoja i u astrogljarni stanični red (karakterističnu za O-2A pozitivne progenitore), te da je u ovoj fazi djelomične diferencijacije već pro-oligodendrocit. ^(22,23,65,66,67)

Daljnijim sazrijevanjem postupno počinje ekspresija sve većeg broja komponenti koje su karakteristične bilo za oligodendrocite ili sam mijelin. To uključuje već spomenuti GalC, (protein čija ekspresija već u stvari označava terminalnu diferencijaciju oligodendrocita, a time i gubitak i proliferacijskog i migracijskog potencijala stanice) kao i MBP i mijelin-oligodendrocitni-glikoprotein (MOG) što imunohistokemijski predstavlja konačni stadij sazrijevanja oligodendrocita. ^(1,22,23,38,39,66,68,69)

Ultrastrukturno zreli oligodendrocit postaje manji veličinom, ali gušći u smislu sadržavanja intrastaničnih organela kao i heterokromatina jezgre. Njegov izgled je po mnogočemu karakterističan, a izgleda da postoje i ultrastrukturne razlike između oligodendrocita koji aktivno mijelinizira, te starije, zrelije stanice koja održava postojeći mijelin. ^(67,68,69,70)

Izgleda međutim da odrasli oligodendrocit zadržava (pod utjecajem određenih čimbenika okoline, prvenstveno faktora rasta) sposobnost de-diferencijacije i ponovnog ulaska u proliferativnu fazu uz mogućnost ponovne mijelinizacije u slučaju potrebe. Iako je u nekim istraživanjima dokazano da čista kultura zrelih oligodendrocita (a takvima se smatraju oni koji ekspimiraju MBP antigen) nije više sposobna niti proliferirati niti mijelinizirati, ^(68,69,70,71,72) brojna kasnija su dokazala da to stanje, ukoliko su u kulturi stanica prisutni i određeni faktori rasta, nije konačno. Tako je uočeno da u miješanoj kulturi zrelih oligodendrocita i stanica O-2A progenitora uz prisustvo fibrocitičnog faktora rasta (FGF) izrazito pada broj zrelih OG a raste broj progenitora, što je shvaćeno kao indirektan dokaz mogućnosti dediferencijacije OG u prisustvu FGF. ⁽⁷⁷⁾ Izgleda, međutim, da prisustvo samo jednog faktora rasta nije dovoljno za navedeni proces dediferencijacije i remijelinizacije. ⁽⁷⁸⁾ Druga istraživanja pokazuju da izlaganje oligodendrocita FGF dovodi do stimulacije diobe stanice i mitotičke aktivnosti. Opisana mitotička aktivnost, međutim, aktivira stanični signal koji inducira apoptozu i dovodi do programirane smrti oligodendrocita. Paralelna istraživanja imala su slične rezultate i za neke druge faktore rasta, iako su pojedine njihove kombinacije imale sasvim suprotan učinak. Očigledno je stoga da utjecaj faktora rasta može biti dijametralno suprotan u ovisnosti o trenutačnom staničnom ciklusu, ekspresiji određenih površinskih gena ili posredovanim staničnim signalima. ^(71,77,78) Opisana saznanja rezultat su istraživanja na stanicama glijе eksperimentalnih životinja, pretežno glodavaca. Teško je međutim jednostavno povlačiti paralelu

između tih otkrića i istraživanja na humanom materijalu, budući da se sada već zna da postoje neke važne razlike. ^(67,68,69)

Već unatrag više od 15 godina dokazano je postojanje progenitorskih stanica oligodendroglije u humanom fetalnom mozgu. ^(62,63,64,70) Danas je poznato da se one nalaze u brojnim regijama fetalnog CNS-a uključivo i spinalnu moždinu. Mogu se dokazati negdje oko 7-9 tjedna gestacije, a sa sigurnošću su definirane 2-3 tjedna prije početka mijelinizacije aksona (koja obično nastupa 83. dan života embrija). U kulturi moždanih stanica fetusa starog 15-18 tjedana dokazano je istovremeno postojanje preoligodendrocita kao i potpuno zrelih oligodendrocita, ali i tipa-2 astrocita što je smatrano dokazom za bipotentnost humanih progenitorskih stanica. Kasnija istraživanja međutim nisu uspjela potvrditi kod glodavaca uočenu mogućnost dediferencijacije zrelih oligodendrocita u ovisnosti o postojanju istih faktora rasta. Ipak izgleda da određene kombinacije faktora rasta i nekih drugih, za sada još nepoznatih, faktora okoline dovode do remijelinizacijskih sposobnosti zrelih humanih oligodendrocita. Neka istraživanja upućuju na drugačiju ekspresiju lipoproteinskih antigena u humanih OG, a sasvim je sigurno da u humanih OG važnu ulogu igraju i ontogenetski mehanizmi i signali tipa transdukcije gena. U kori odraslog mozga dokazano je postojanje, iako u malom postotku (3%), progenitorskih stanica koje su O4 pozitivne/GalC-negativne, kao i preoligodendrocitnih stanica (1,3%) što sasvim sigurno potvrđuje sposobnost i odraslog humanog mozga za dediferencijaciju odraslih oligodendrocita kao i remijelinizacijske procese. ^(62,63,64,70,73,74)

2.4 Uloga glija stanica u stvaranju mijelinskog omotača centralnog živčanog sustava

Proces mijelinizacije u čovjeka započinje u otprilike 11-12 embrijskom tjednu a rezultat je međudjelovanja brojnih čimbenika. ^(22,28,29) Sasvim je sigurno za inicijaciju mijelinizacije neophodna precizno regulirana interakcija oligodendroglije i aksona, a danas je uočeno da i astroglija ima ulogu u određenim fazama mijelinizacije. ^(1,6,7,37,38) Složenost procesa upotpunjava uloga faktora rasta potrebnih tijekom sazrijevanja glija stanica kao i stvaranja mijelina, dok u očuvanju zdravog mijelinskog omotača tijekom života organizma, osim navedenog, značajnu ulogu igraju i faktori okoline od kojih su još mnogi nedovoljno poznati. ^(79,80)

U osiguranju adekvatne i od nepoželjnih utjecaja osigurane mikro- i makrookoline centralnog živčanog sustava glavnu ulogu ima hematolikovska barijera (HLB). Ona se sastoji od sloja endotelnih stanica koje su obavijene izdancima astrocita. Zahvaljujući svojoj karakterističnoj ultrastrukturnoj građi, kao i činjenici da stanice od kojih je građena imaju brojne mitohondrije ali ne i tjelešca koja su sposobna aktivno prenositi proteine u ekstravaskularni prostor, HLB je visokopropusna samo za vodu i molekule topive u masti. Na taj način HLB osigurava sigurnu granicu za tvari koje prolaze plazmom, čime sprječava da ekstracelularni prostor CNS-a postane jednostavni ultrafiltrat plazme. Za potrebne hranjive tvari (prvenstveno glukozu, zatim određene aminokiseline i ione) postoje specifični transportni mehanizmi, iako najveće polarne molekule (prvenstveno proteini) ne mogu proći kroz intaktnu HLB. ^(1,81,82)

Neka istraživanja upućuju da pojedine regije mozga u glodavaca nemaju toliko izraženu nepropusnost HLB (u području pituitarne žlijezde, arei postremi,

preoptičkom recesusu, pinealnoj žlijezdi kao i u području endotelnih stanica koroidnog pleksusa) iako još nije sasvim jasno koliko je to izraženo u primata. U svakom slučaju osnovni element koji osigurava nepropusnost HLB jesu izdanci astrocita koji sudjeluju u oblikovanju endotelnih stanica. ^(1,66,75,76)

Navedena građa i funkcija HLB osigurava imunološku odvojenost CNS-a od ostalog dijela organizma što je njegov isključivi privilegij. Infiltracija unutar endotelijalne membrane i povećanje propusnosti HLB pod utjecajem je citokina i citokinima izazvanih promjena u ekspresiji liganada cirkulirajućih limfocita. Izgleda također da je propusnost neoštećene HLB to manja što su upalne stanice više specifične za antigene prisutne u centralnom živčanom sustavu, osiguravajući na taj način maksimalno moguću stabilnost okoline CNS-a. Oštećena hematoliquorska barijera dovest će do ulaska imunokompetentnih stanica u likvorski prostor što će u slučaju zatajivanja obrambenih mehanizama CNS-a lako ugroziti i proizvodnju i održavanje mijelina. ^(1,57,58,59)

Značajna je i uloga astrocita u održavanju mijelina tijekom života organizma. Oba glijalna stanična reda su prema tome neophodna kako za stvaranje mijelina tako i za njegovo preživljenje. Kako i nadalje postoje dokazi o razvoju oba stanična reda iz istog prekursora, jasno je da je potrebna vrlo oprezna orkestracija u razvoju jednog ili drugog reda u određenim fazama diferencijacije. ^(22,23,62,63) Neka novija istraživanja upućuju i na utjecaj aksona na proliferacijske sposobnosti progenitorskih glija stanica. ^(1,22,37,38,39) Iako je danas sasvim jasno da je zreli oligodendrocit stanica koja proizvodi mijelin, a, zajedno sa astroцитom, najviše sudjeluje i u njegovom održanju i nadalje su prisutna razmimoilaženja oko samog procesa mijelinizacije (a time i remijelinizacije) odnosno u kojem stadiju razvoja zrelih glija stanica taj proces i započinje. Većina se autora ipak slaže da stanica koja mijelinizira mora zadržati sposobnost diobe time naglašavajući ključnu ulogu prekursora stanica. ^(62,63,64,65) Tip progenitorske stanice O-2A u

eksperimentalnim uvjetima izgleda da ima najjaču sposobnost i migracije i mijelinizacije. Ipak tijekom istih ispitivanja uočen je i jak utjecaj aksona na stanice glije. U cilju raspoznavanja čimbenika koji potiču mijelinizaciju posljednjih su više od petnaestak godina provedena brojna istraživanja pri čemu su primijenjivane različite metode kao i različite kombinacije kultura stanica. Uočeno je nekoliko zanimljivih činjenica. U najranijim eksperimentima uočeno je da O-2A progenitori proliferativno reagiraju na medij u kojem postoje i astrociti i neuroni, dok preoligodendrocit reagira i na čistu kulturu neuronskih stanica. Neka slična istraživanja pokazala su i da čista kultura neuronskih stanica u dodiru s preoligodendrocitima dovodi do porasta broja progenitora i usporavanja diferencijacije, a kasnije je uočena i uloga faktora rasta u navedenim medijima. U većini istraživanja je međutim za promociju mijelinizacije bio potreban isključivo medij koji je sadržavao aksone neurona ili na bilo koji način bio u izravnom kontaktu s njima. Neki su autori smatrali i da električka aktivnost prisutna u aksonu djeluje na proliferaciju progenitora, a i da broj zrelih oligodendrocita savršeno odgovara broju zrelih aksona koji trebaju biti mijelinizirani, pa čak i da preživljenje tih zrelih OG ovisi o tom broju. ^(37,38,67,68,69,70)

Dodatna potvrda o međudjelovanju aksona i glija stanica jest i činjenica da su neuroni jedan od izvora PDGF (platelet-derived growth factor)-a koji je značajan u procesu diferencijacije glija stanica. ^(76,77)

Posljednjih je godina također konačno potvrđena pretpostavka o utjecaju aksona na maturaciju glija stanica. Danas se zna da akson djeluje na O-2A progenitorske stanice tako da spriječava maturaciju oligodendrocitnog staničnog reda. ^(37,38,39)

Novija su istraživanja ukazala da zapravo to svojstvo ima određena grupa faktora rasta čiji je izvor akson, što je dokazano i u in-vivo istraživanjima. Jedna od uloga te obitelji faktora rasta jest posredovanje u spriječavanju sinteze staničnih proteina. Zanimljivo je da sličan efekt ima i kultura astrocita tipa-1, odnosno medija koji je

bio u izravnom dodiru s astrocitima. Autori navedenog otkrića sugeriraju stoga da reaktivni astrociti izlučuju neke još nedovoljno poznate faktore koji onemogućavaju remijelinizaciju (koja se doista i ne događa u područjima kroničnih plakova koji su histološki građeni od reaktivnih astrocita). ^(77,78)

Izgleda da neuroni imaju još dodatne uloge. Ono što je također primijećeno jest da oni reduciraju ekspresiju gangliozida i na progenitorskim stanicama i na astrocitima. Danas se zna da gangliozidi imaju brojne uloge u tijeku razvoja glija stanica, iako njihova točna funkcija nije do kraja poznata. Vjerojatno je da utječu na fuziju stanice, kao i na vezivanje i funkciju nekih faktora rasta, a čini se da djeluju na inzulin-ovisan rast stanica. ^(83,84)

Posebno su zanimljiva istraživanja koja se bave stadijima mijelinizacije na kulturama humanih stanica. U posljednjih desetak godina sve je veći broj istraživanja na čistim kulturama stanica glije, prvenstveno oligodendrocita, pri čemu se pokušalo potpuno izbjeći prisustvo pre-oligodendrocita ili bilo koje vrste progenitorskih stanica. Materijal je uglavnom obdukcijski, dobiven iz stanica pojedinih područja centralnog živčanog sustava. Početna su istraživanja vrlo često bila bezuspješna budući da se kultura stanica oligodendrocita nije uspjela samostalno održati živom. Dodavanjem određenih obitelji faktora rasta, poglavito onih koje luče aksoni omogućilo je duže preživljenje stanica. ^(1,22,23,37,38,39)

Definitivno je uočeno da dodavanjem kulture stanica neurona (čak i druge vrste, u ovom slučaju glodavaca) izrazito raste vjerojatnost preživljenja različitih humanih staničnih kultura, uključujući i čiste oligodendrocite, pa i miješanih kultura sastavljenih od (u raznim omjerima) zrelih OG, preoligodendrocita, astrocita i progenitora. U istim uvjetima uočena je i proliferacija staničnih redova astroglije, fibroblasta i mikroglije. Oligodendrociti se u takvim medijima jasno priljubljuju uz aksone, pri čemu dolazi do izduljivanja njihovih staničnih izdanaka te pokušaja “omotavanja” oko navedenog aksona. Ipak, nije uočeno stvaranje kompaktnog

mijelina. To se tumačilo time što se ipak radilo o staničnim kulturama različitih vrsta, naime očigledno je da je došlo do aksonsko-glijalne interakcije ali medij ipak nije bio odgovarajući za konačni proces mijelinizacije. Pokušano je stoga s kulturama humanih potpuno diferenciranih neurona koji eksprimiraju neurofilamente (dobivenih iz stanica humanog koriokarcinoma) čime je zaista uočeno postojanje brojnih zona aksonsko-glijalnih sveza kao i početaka mijelinizacijskih procesa. Ipak, niti ultrastrukturne elektronskomikroskopske analize nisu uspjele detektirati kompaktan mijelin što ipak ukazuje na potrebu dodatnih faktora za proces mijelinizacije odnosno re-mijelinizacije. ^(22,28,29,37,38,39,85)

S obzirom na neospornu potrebu međudjelovanja aksona i glije tijekom mijelinizacijskih procesa, postavlja se pitanje kako je remijelinizacija uopće moguća u slučaju oštećenja neurona, odnosno aksona, odnosno postavlja se pitanje regeneracije samog aksona. Danas se smatra da regeneraciju aksona djelomično sprječava i samo postojanje potpuno diferenciranih oligodendrocita, a i da postoji čisto mehanički ograničavajući faktor čiji su uzrok astrociti. ^(22,23,86) Možda je nemogućnost regeneracije aksona centralnog živčanog sustava odraslog organizma cijena koja je plaćena još u razvojnoj fazi, kada je okolina u jednom trenutku trebala postati inhibitorni čimbenik daljnjeg rasta aksona, koji u suprotnom ne bi bio smješten u odgovarajućem ciljnom području. In-vitro je zaista dokazano da astrociti, oligodendrociti pa i sam mijelin u CNS-u svaki za sebe mogu aktivno zaustaviti neuronski rast. Ipak izgleda da je utjecaj uzajaman i recipročan, naime kolikogod navedene stanice sprječavaju daljnji rast neurona, neke supstance dobivene iz oligodendrocita upravo omogućavaju preživljenje tog istog neurona. Eksperimentima na kulturi stanica miša dokazano je da su baš oligodendrociti onaj ključni čimbenik koji određuje broj i debljinu aksona optičkog živca. Dodatno je uočeno da OG luče i određeni faktor koji je potreban za razvoj točno određenog

broja specifičnih Na⁺-ionskih kanala na aksonu koji se razvija čime indirektno utječu i na konačnu debljinu aksona. ^(22,23,37,38,39,85,86)

Astroцити sasvim sigurno imaju ulogu u spriječavanju regeneracije aksona. Prema današnjim saznanjima izgleda da ju blokiraju mehanizmima koji induciraju signale za zaustavljanje normalnog procesa rasta. Dodatni dokaz ove tvrdnje je i činjenica da su živčana vlakna koja se ne regeneriraju uvijek u kontaktu s astroцитима. Molekule matriksa stanice astroцита za koje se zna da imaju svojstva inhibicije rasta su proteoglikani (цитотактин/tenascin i hondroitin-6-sulfat). ^(62,63,66,76,77)

Ranije je spomenuto da (usprkos svom važnom pozitivnom utjecaju na maturaciju aksona u razvojnoj fazi centralnog živčanog sustava) oligodendrociti također inhibiraju rast aksona. Primijećeno je naime da zreli OG izlučuju posebne mijelinske proteine koji imaju inhibitorna svojstva, te da u stanjima njihove očuvanosti rast aksona neće biti moguć. Prilikom povreda kralježnične moždine, nakon kojih je uočen rast i regeneracija aksona, potvrđeno je da se u tom slučaju radi o medijima koji nisu mijelinizirani (pa nema niti zrelih OG) ili da se u tim medijima dokazalo prisustvo antitijela na inhibitorne proteine oligodendrocita, koji su se tamo mogli zateći vrlo vjerojatno zbog posttraumatski pojačane propusnosti HLB. Istraživanja koja su rađena i na drugim životinjskim vrstama kao i na humanom materijalu pokazala su da je za regeneracijske procese potreban i imunološki odnosno upalni odgovor, koji može utjecati na promociju regeneracije. Takvo mišljenje podupire i činjenica da regenerativni procesi u znatno bolje “izoliranom” centralnom živčanom sustavu gotovo i ne postoje, u komparaciji s perifernim živčanim sustavom. ^(37,38,39)

3. FAKTORI RASTA I NJIHOV UTJECAJ NA RAZVOJ GLIJA STANICA

Iz svih dosadašnjih istraživanja procesa i čimbenika mijelinizacije vidljivo je da isključivo međudjelovanje neurona i glije nije dovoljno za fiziološke procese mijelinizacije. Već tijekom razvoja stanica glije a kasnije i tijekom čitavog njihovog životnog razdoblja ispunjavanja fizioloških zadaća, dokazano su potrebni specifični čimbenici okoline, odnosno medija u kojem se navedeni procesi događaju. Današnja su saznanja jasno potvrdila neobično važnu ulogu više obitelji specifičnih supstanci iz grupe hormona, nazvanih “faktorima rasta”. Njihova je uloga ključna u točno određenim razvojnim fazama centralnog živčanog sustava, a u većoj ili manjoj mjeri djeluju tijekom čitavog života. Ispitivanja pojedinih obitelji faktora rasta traju uvelike još i danas, a u sklopu demijelinizacijskih bolesti, posebno su zanimljive one za koje se dokazano zna njihov utjecaj na razvoj i funkcioniranje glija stanica.

(1,22,23,35,36,37,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109)

3.1 Trombocitički faktor rasta (PDGF – Platelet-derived growth factor)

Trombocitički faktor rasta je jedan od relativno dobro definiranih faktora rasta, kako što se tiče njegove ultrastrukturalne podloge tako i što se tiče njegove uloge tijekom razvoja glija stanica. ^(1,22,23,87,88,89) Izgleda da je uloga PDGF-a najviše izražena tijekom razvoja glije u fazi nastanka stanica progenitora. Samostalno ili u sinergističkim djelovanjem s nekim drugim faktorima rasta PDGF utječe na proliferaciju, migraciju i preživljenje progenitorskih stanica, a nešto manje i na početne stadije njihove diferencijacije. PDGF ima izrazito mitogeno djelovanje, poglavito na prekursorske stanice. Izgleda međutim da je njegovo djelovanje ograničeno na unaprijed točno određen broj stanica. Tijekom ispitivanja stanica optičkog živca štakora uočeno je da se te stanice u prisustvu PDGF-a umnažavaju i to u više ciklusa, da bi se potom koordinirano stvarale grupe postmitotičkih oligodendrocita. Reakcija na PDGF i njezin intenzitet izravno su ovisni o postojanju i količini alfaPDGF receptora na površini progenitora oligodendrocita. Uočeno je da vremenska i prostorna raspodjela stanica koje eksprimiraju alfaPDGF receptore točno odgovara vremenskom i prostornom rasporedu progenitorskih glija stanica. ^(87,88,89,90,91)

PDGF u centralnom živčanom sustavu izlučuju astrociti i neuroni. Neka istraživanja pokazuju da je njegova uloga u zreom centralnom živčanom sustavu relativno neznatna. Poznato je da može podržati preživljenje prekursorskih glija

stanica pa i pro-oligodendrocita, međutim potpuno je beskoristan u cilju održavanja zrelog OG na životu. Ipak zna se da pokreće biološki odgovor na brojnim (još nedovoljno poznatim) sustavima, što sasvim sigurno može opravdati i njegovo postojanje u odraslom organizmu. Dovodi također do aktivacije genskih sustava, proliferacije stanica, pojačane motilnosti stanica ili pojačane sekrecijske mogućnosti stanica. Osim što je u razvojnem stadiju glije izrazito mitogen, PDGF pojačava i motilitet prekursora OG. Takva stanica zadobiva bipolarni oblik, a njegova nova morfologija potpuno je neovisna o sintezi DNA, međutim zahtjeva transkripciju i translaciju gena *de novo* što je očito rezultat djelovanja PDGF-a i nestaje oduzimanjem tog faktora iz medija. ^(90,91,92)

Izgleda da u nekim fazama razvoja sinergistički djeluje s fibroblastičkim faktorom rasta (FGF) i to poglavito u fazi proliferacije progenitora, pojačavajući mitogene sposobnosti medija. ⁽⁹³⁾

Najnovija su istraživanja dodatno dokazala da dimerni oblik PDGF-a luče astrociti tip-1 upravo u razvojnoj fazi proliferacije oligodendroglije. Prvenstveno se to odnosi na proliferaciju staničnog reda O-2A progenitorskih stanica na koje PDGF ima snažan mitogeni efekt. Uočeno je da te stanice imaju izrazito brojne receptore s visokim afinitetom baš za PDGF čime se objašnjava utjecaj tog faktora rasta. ^(89,90)

PDGF je zasigurno značajan faktor rasta upravo za stanice glije. Posredan dokaz njegove mitogene aktivnosti je i njegovo prisustvo u patološkim uvjetima, poglavito u gliomskim tumorima čije stanice izlučuju PDGF-u slične molekule u visokim koncentracijama i sintetiziraju PDGF mRNA.

Osim jasne mitogene aktivnosti, izgleda da je PDGF značajan i za migraciju progenitorskih stanica tipa O-2A budući da im značajno povećava motilitet u eksperimentalnim uvjetima.

Vjerojatno PDGF ima više uloga tijekom razvoja glija stanica, prvenstveno u cilju promocije proliferacije ali i migracije prekursorskih stanica, što bi moglo imati

implikacije i tijekom reparacijskih mehanizama nakon demijelinizacije.
(87,88,89,90,91,92)

3.2. Fibroblastički faktor rasta I i II (FGF – Fibroblast growth factor)

Obitelj fibroblastičkog faktora rasta ima dva člana nazvana I i II, odnosno tzv. “kiseli”FGF (acidic FGF – aFGF) i “lužnati”FGF (basic FGF – bFGF).⁽⁹³⁾ Njihova uloga je također posebno značajna tijekom razvoja glija stanica, ali je isto tako vrlo često uvjetovana drugim karakteristikama medija. To su prvenstveno faktori koji (samostalno ili sinergistički) djeluju mitogeno na stanice progenitora OG, ali u kasnijim fazama mogu zaustaviti diferencijaciju OG zbog izrazito mitogenog efekta na progenitorske stanice, ili, u slučaju istovremenog prisustva astrocita u mediju, imati sasvim suprotan učinak djelujući u cilju promocije diferencijacije.^(88,93,94)

Pojačavajući ekspresiju alfaPDGF receptora, djeluju sinergistički s PDGF-om prvenstveno pojačavajući njegovo mitogeno i migracijsko djelovanje, iako još uvijek nije sigurno da li FGF djeluje i izravno na migraciju progenitora oligodendrocita.^(88,90,93,94)

Može se dokazati i tijekom razvoja CNS-a (tada pretežno u područjima gdje se razvija neuroepitel i u kortikalnoj ploči) ali i u odraslom mozgu gdje se pretežno nalazi u glija stanicama i neuronima. Kako se u odraslom mozgu nije uspio dokazati specifični signal za sekreciju FGF-a, jedna od teorija smatra da se taj faktor rasta luči isključivo kada dođe do oštećenja tkiva te djeluje tijekom regeneracije navedenog područja. Ipak najnovija istraživanja upućuju da se FGF može izlučivati alternativnim putem i iz zdravih stanica, te da im nije potreban

klasični hidrofobni signal. Također je dokazano da raste koncentracija FGF-a tijekom ponovnog stvaranja mijelina u odraslom CNS-a, što ukazuje i na njegovu ulogu u remijelinizacijskim procesima. Dosadašnja istraživanja te činjenice ukazala su da FGF nije neophodno potreban za održavanje OG na životu, međutim da svojim djelovanjem na zreli oligodendrocit itekako može biti koristan u procesima ponovne sinteze mijelina. Izgleda naime da FGF može inducirati dediferencijaju, odnosno ponovno vraćanje zrelog oligodendrocita u njegov mitotički progenitor, iako je tijekom nekih eksperimenata uočeno da to može dovesti i do programirane smrti te stanice, odnosno njezine apoptoze. ^(87,88,93,94,95)

Zanimljive su i interakcije FGF-a s nekim drugim supstancama u mediju. Upotrijebljen zajedno s transformirajućim faktorom rasta beta (TGF β) povećat će njegov inhibitorni efekt na diobu progenitorskih stanica, dok su njegova vlastita mitogena svojstva povećana međusobnim djelovanjem s heparinom ili proteoglikanima koji se nalaze na površini stanica ili u ekstracelularnom matriksu. ⁽⁸⁷⁾

Takva saznanja dokazuju da i OG i njegov progenitor imaju različite odgovore na različite kombinacije faktora rasta ili nekih drugih supstanci, te da je za adekvatnu reakciju u pojedinim fiziološkim ili patofiziološkim stanjima potrebna sinergistička reakcija točno određenih supstanci. ^(87,90,94,95,96)

3.3. Transformirajući faktor rasta beta (TGF β – transforming growth factor beta)

Transformirajući faktor rasta beta (TGF β) pojavljuje se relativno kasno u procesu razvoja glija stanica, odnosno nakon migracije i pri kraju proliferacije progenitorskih stanica. (97)

Nazvan je i “kontrolorom” staničnog ciklusa, budući da pod njegovim utjecajem dolazi do inhibicije diobe stanice i spriječavanja njezine proliferacije. Tako nastaju preduvjeti za početak diferencijacije. Njegovo je djelovanje oprečno PDGF-u, a pojačavaju ga i FGF i inzulinu-sličan faktor rasta (IGF), snažan promotor diferencijacije progenitora. Zanimljivo je da u toj fazi započinje i djelovanje nekih drugih supstanci kao što su tiroidni hormon, neki steroidni hormoni i retinoidi. Očito da je i njihovo prisustvo potrebno za pravilan tijek zriobe OG pa i mijelinizacije. In vitro je, naime, dokazano da tiroidni hormon dovodi do povećanja broja oligodendrocita, a i in vitro i in vivo je uočeno da smanjenje koncentracije tog hormona dovodi do redukcije mijelinizacije. Zanimljiva je i činjenica, koju je nedavno objavila grupa autora, da je u muških bolesnika s demijelinizacijskom bolesti tipa multiple skleroze uočen značajno veći postotak oboljelih od autoimunog tireoiditisa, a težina bolesti odnosno razvoj teškog oblika hipotireoze bio je izraženiji.

Uloga ostale dvije supstance u ovoj fazi mijelinizacijskog procesa za sada još nije sasvim jasna iako izgleda da i one dovode do indukcije diferencijacije progenitora.

(97,98)

Transformirajući faktor rasta beta izlučuju sami progenitori oligodendrocitnih stanica (barem u in vitro uvjetima), dok njegova eventualna uloga u odraslom CNS-u nije još dokazana. ⁽⁹⁸⁾

3.4. Inzulinu sličan faktor rasta I i II (IGF – insulin-like growth factor I and II)

Posljednja skupina faktora rasta neophodna u razvoju glija stanica i procesu mijelinizacije su inzulinu-slični faktori rasta I i II (IGFI i IGFII). ^(99,100) Prema dosadašnjim saznanjima ta je obitelj faktora rasta vjerojatno najšireg spektra djelovanja kako u razvojnoj dobi tako i u odraslom CNS-u, budući da se djelovanje tih faktora proteže tijekom sve tri faze razvoja glije (proliferativnoj, migracijskoj i diferencijacijskoj) a također su i značajan promotor mijelinizacije. To je također i obitelj somatomedina koja pripada najbolje istraženim faktorima rasta. ⁽¹⁰⁰⁾

Inzulinu-sličan faktor rasta je mitogen za prekursore oligodendrocita, bitan je u diferencijaciji OG, ali i za njihovo preživljenje u zrelom obliku. Receptori za IGF prisutni su na A2B5-pozitivnom oligodendrocitnom progenitoru kao i na GC-pozitivnom OG, aktiviraju ih fiziološke koncentracije IGFI i IGFII ali i visoke koncentracije inzulina. Uistinu, u brojnim standardnim medijima kultura stanica, uobičajene količine inzulina dovoljne su za aktivaciju navedenih receptora. Njihovom se pak aktivacijom inducira signal za inkorporaciju određenih proteinskih struktura u DNA A2B5-pozitivnog OG progenitora i O4-pozitivnog kasnog progenitora (pro-oligodendrocita) i za posljedično povećanje broja stanica. Indukcijom transkripcije gena IGF promovira diferencijaciju prekursora u GC-pozitivan oligodendrocit ali i povisuje razinu mijelin-specifične genske ekspresije u oligodendrocitu. ^(100,101,102)

Mehanizmi indukcije genske ekspresije aktivacijom IGF ili vrlo bliskih inzulinskih receptora za IGF danas su dobrim dijelom poznati. Vezanje liganda za bilo koji od tih receptora dovodi do aktivacije unutrašnje tirozin kinaze na β -podjedinici receptora i do fosforiliziranja tirozina s bazičnim skupinama proteina. Oni služe kao mjesta vezivanja i aktivacije specifičnih proteinskih molekula koja svaka za sebe potom aktivira kaskadu zbivanja bitnih u sintezi mijelina. Posebno uzgojeni miševi kojima kongenitalno nedostaje makar samo jedna od navedenih specifičnih proteinskih molekula, imaju do 25%-50% manju masu mijelina unutar centralnog živčanog sustava. ^(101,102)

Inzulinu-slični faktori rasta vjerojatno imaju značajnije mjesto u razvoju oligodendroglije nego u razvoju astroglije. Pokazano je da fiziološke koncentracije IGF-a povisuju broj oligodendrocita u miješanoj kulturi stanica za više od šesdeset puta, dok broj astrocita nikada nije porastao za više od dva puta. Dodavanjem IGF u kulturu glija stanica u kojoj su prisutni i aksoni, dovodi do značajnog porasta u sintezi mijelina. ^(100,101,102,103)

Porijeklo IGF-a je izgleda dvojako. Danas je sigurno da se velik dio tog faktora rasta sintetizira i proizvodi lokalno, unutar CNS-a. Molekule IGF mogu proći i kroz HLB i ući u CNS iz cirkulacije, iako se smatra da je to sekundarni izvor IGF-a. U glodavaca, IGF-I i IGF-II kao i njihove mRNA, nađene su i u fetalnom, neonatalnom kao i odraslom mozgu, uz najveće koncentracije tijekom prvih nekoliko postnatalnih tjedana. ^(100,103)

Najveće koncentracije IGF-aII eksprimiraju koroidni pleksus i meninge a zahvaljujući uskom kontaktu s likvorskim prostorima, IGF-II može doći u sve dijelove centralnog živčanog sustava. Najjača ekspresija IGF-aI nalazi se u neuronima s velikom dužinom aksona, odnosno upravo u onima koje treba mijelinizirati. Nešto niža ekspresija nalazi se u astrocitima, ali i u O4-pozitivnim oligodendrocitnim progenitorima. Ovo sugerira i djelomičnu autoregulaciju

odnosno autokrinu funkciju progenitora što može biti bitna rezerva faktora rasta za početak diferencijacijskog procesa. Maturacijom oligodendrocita, odnosno u času kada oni postanu GC - pozitivni, prestaje njihova mogućnost lučenja IGF-a, čime postaju potpuno ovisni o tom faktoru dobivenom iz vanjskih izvora, iako se jačina njihovog biološkog odgovora na tu supstancu ne smanjuje. ^(102,103,104)

Posebno odabran eksperimentalni soj miševa (tzv. “transgenic” i “knockout” miševi) vrlo je često upotrebljavan za in vivo proučavanja uloga inzulinu sličnog faktora rasta. Kod tih je sojeva, koje su ekspimirale IGF za više od nekoliko puta od normalnih, uočen vrlo blagi porast u tjelesnoj težini ali je zato mozak bio veći za najmanje 55% u odnosu na druge sojeve, a sadržavao je i dvostruko veće količine mijelina. Broj oligodendrocita bio je međutim veći za svega 25%, tako da je povećanje mijelina u stvari bilo rezultat povećane sinteze mijelina jedne stanice. Zaključeno je stoga da IGF, osim što je potreban prilikom diferencijacije oligodendrocita, izravno utječe na sintezu mijelina povećavajući količine sintetiziranog mijelina čineći mijelinski omotač pojedinog aksona značajno debljim nego u normalnih sojeva. Ipak, ovi rezultati donekle su u koliziji s rezultatima eksperimenata in vitro, gdje je porast broja OG značajno veći nego u navedenim istraživanjima. U in vivo ispitivanjima uspoređuje se međutim promijenjeni soj s normalnim a ne posebnim kulturama stanica kod kojih uopće nema IGF-a. To upućuje na to da je u normalnim okolnostima količina IGF-a tolika da može proizvesti gotovo maksimalnu moguću količinu oligodendrocita dok s druge strane kompenzatorni mehanizmi onemogućavaju povećanu produkciju oligodendrocita. ^(1,22,23,99,100,101,102,103)

S druge strane, u brojnim je eksperimentima upotrebljen i soj miševa s deficitom IGF-a u kojih je redovito uočena manja količina mijelina u mozgu. U miševa u kojih je IGF-I potpuno inaktiviran uočeno je 40% smanjenje porođajne težine, a čak do 95% tih životinja je ugibalo i prije nastupa mijelinizacije. Kod preživjelih

uočena je ozbiljna hipomijelinizacija CNS-a, a i broj OG je bio manji od normalnog. Najmanje promjena je bilo u staničnom redu astrocita i neurona. Broj aksona je također bio tek neznatno smanjen, međutim izrazito mali broj aksona je bio mijeliniziran a i oni su imali vrlo tanak sloj mijelina. Izgleda stoga da je hipomijelinizacija rezultat i smanjenog broja OG ali i smanjene sinteze mijelina u nedostatku IGF-a. Iako je, dakle, mijelinizacija moguća i bez IGF-a, ipak je ovako izražena hipomijelinizacija očit dokaz da je IGF glavni promotor mijelinizacije. Izgleda također da u mijelinizaciji veću ulogu ima IGF-I. U odvojenim sojevima, kod kojih su posebno inaktivirani IGF-I i IGF-II, u prvom slučaju je uočena opisana hipomijelinizacija, dok je u drugom uočeno primarno prenatalno smanjenje težine i postnatalno zaustavljanje rasta eksperimentalne životinje, ali nije bilo promjena u mijelinizaciji. ^(1,22,23,100)

Prekid genskog koda za receptore za IGF (i to obje podjedinice) uzrokuje najveće promjene. Takvi su sojevi pri rođenju 40% manji od normalnih, a umiru tijekom nekoliko minuta po porodu. Razvoj OG tih sojeva je izrazito oštećen i vrlo mali broj doseže GC-pozitivnu fazu. ^(100,101)

Prema navedenim rezultatima ključno djelovanje IGF je na diferencijaciju OG a tek potom na promociju mijelinizacije, pri čemu značajniju ulogu igra inzulinu-sličan faktor rasta I. ⁽¹⁰³⁾

Koncentracija IGF-a, a poglavito IGF-I unutar organizma ovisi o kompleksnim interakcijama između njegove produkcije i sekrecije unutar hepatocita, vezivanju sa specifičnim proteinskim nosačima, njegovoj proteolitičkoj razgradnji i njegovom prijenosu u različite organske sustave. ^(104,105,106,107,108,109)

Čimbenici koji najviše utječu na sintezu IGF-a su nutritivni status samog organizma i nadasve hormon rasta. ^(99,100,103,106,107)

4. HORMON RASTA I NJEGOVA ULOGA U PROCESIMA MIJELINIZACIJE

U dosadašnjem je tekstu iznesena važnost međudjelovanja brojnih faktora koji sudjeluju u složenom procesu mijelinizacije. Mehanizam djelovanja navedenih čimbenika poznat je u većoj ili manjoj mjeri a pogotovo se to odnosi na faktore koji upravljaju slijedom zbivanja u razvojnoj fazi centralnog živčanog sustava. Također je jasno da postoje tvari ili sustavi koji su nadređeni opisanima, te tako osiguravaju upravo potrebnu sekvencu zbivanja. ^(1,22,23,110,111)

Već se dugo zna da je sustavu somatomedina nadređen somatotropin, odnosno hormon rasta. Najnovija su istraživanja dokazala da hormon rasta (osim njegovih već duže poznatih utjecaja na razvoj somatskog sustava) izravno sudjeluje u mijelinizacijskim procesima, važan je u autokrinoj regulaciji faktora rasta u centralnom živčanom sustavu (poglavito inzulinu-sličnih faktora rasta), a receptori za hormon rasta aktivni su kako tijekom razvoja centralnog živčanog sustava, tako i u odrasloj dobi. ^(1,22,23,110,111,112,113,114,115)

Vrlo je stoga vjerojatno da je hormon rasta jedan od nadređenih autoregulatora barem nekih sekvenci tijekom razvoja glije i procesa mijelinizacije, a opseg njegovog utjecaja na fiziološke ali i patofiziološke mehanizme tog složenog zbivanja, tek treba dovoljno upoznati. ^(116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127)

4.1. Biokemijska svojstva hormona rasta (HR)

Hormon rasta (HR) složena je peptidna supstanca kodirana genomom koji se nalazi na dugom kraku sedamnaestog kromosoma (17q22-q24 i sadrži 191 (22kDa) i 176 (20kDa) izooblika).⁽¹¹⁰⁾ Secernira ga pituitarna žlijezda, odnosno kultura pituitarnih stanica in vitro. Njegovo izlučivanje većim je dijelom regulirano posebnim hormonskim sustavom u kojem osnovno mjesto zauzima somatostatin (inhibitorni sustav) i faktor koji stimulira sekreciju hormona rasta (Growth hormone-releasing factor – GHRH) kojeg se nalazi u neuronima hipotalamusa i koji izravno djeluje na pituitarnu žlijezdu. Dokazano je da se prednji dio pituitarne žlijezde sastoji od 5 različitih tipova stanica koje sve proizvode različite hormone, a reagiraju na intrapituitarne hormonske signale putem citokina i faktora rasta.^(110,111,112) Posebnu ulogu u navedenim interakcijama imaju molekule stanične adhezije (cell adhesion molecules – CAMs) za koje se danas zna da su ključne u mehanizmima stanične proliferacije, diferencijacije mitogeneze i na kraju apoptoze. Najznačajniji predstavnici CAMs-a su imunoglobulinu-slične molekule i kadherini. Danas se zna da je sekrecija hormona rasta ovisna ne samo o (do sada poznatim) somatostatinu i GHRH-u, već i o spomenutim stanicama CAMs-a i tek nedavno otkrivenom somatskom faktoru – peptidu grelinu. Grelin je prvi puta otkriven 1999. godine kao prirodni endogeni ligand za receptore HR, a prvenstveno se sintetizira u sluznici želuca. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je grelin moćan stimulator otpuštanja hormona rasta iz pituitarne žlijezde, a neka istraživanja upućuju i da ima centralno djelovanje.^(110,111,112)

Sinteza HR vjerojatno se događa unutar samog centralnog živčanog sustava, budući da je mRNA (“messenger”RNA) za HR prisutna u brojnim regijama mozga. Najveća koncentracija HR nađena je u amigdalama, hipokampusu, hipotalamusu (ipak, to su koncentracije koje iznose svega otprilike 1% onih iz prednjeg dijela pituitarne žlijezde). Receptore za HR nalazimo u cijelom humanom organizmu, a u centralnom živčanom sustavu poglavito u području pleksusa korioideusa, iako ih se nalazi i u frontalnom korteksu, hipokampusu, nukleusu kaudatusu, hipotalamusu, putamenu, talamusu kao i u području ponsa i medule, a u nekih životinjskih vrsta jasno je veća koncentracija HR kod ženskih jedinki. Ustanovljeno je također da postoji spolna razlika u količini receptora za HR, odnosno da ih žene imaju obično u većem broju. Receptor hormona rasta je veliki transmembranski glikoprotein koji sadrži 620 aminokiselinskih lanaca i zahtijeva značajne energetske rezerve za kodiranje i transkripciju svojih gena, pa njegovo postojanje unutar brojnih regija centralnog živčanog sustava svakako upućuje na potrebu za HR tijekom čitavog života organizma. ^(110,112,113,114,115)

Smatra se da najveći broj receptora za HR upravo u području koroidnog pleksusa služi aktivnom prijenosu te molekule iz plazme u područje centralnog živčanog sustava. Prolaz HR kroz inače nepropusnu HLB za molekule te veličine sasvim je sigurno moguć. Istraživanja u kojima je u bolesnika s verificiranim deficitom HR u terapijske svrhe parenteralno primijenjen HR, te u kojih su mjerene vrijednosti tog hormona u serumu i cerebrospinalnom likvoru prije i mjesec dana nakon terapije, pokazala su da je došlo do višestrukog (u nekih bolesnika čak i deseterostrukog) porasta vrijednosti HR u likvoru, što se može objasniti prolaskom te molekule kroz HLB. ^(110,116,117) Treba naglasiti da je čak 50% HR u plazmi vezano uz specifični transportni protein («GH binding protein» - GHBP) koji prvenstveno služi održavanju stalnih potrebnih koncentracija HR u plazmi (kako one ne bi previše ovisile o njegovim poznatim značajnim dnevnim oscilacijama). Za većinu

serumskih proteina zna se da, ukoliko prolaze kroz HLB, onda je to omogućeno ultrafiltracijom i u potpunosti ovisi o veličini molekule. Za HR vjerojatno postoje alternativni putevi, pretpostavlja se zahvaljujući transportu koji je posredovan receptorima HR unutar korioidnog pleksusa. Bez obzira na način, mogućnost prolaza HR kroz HLB postoji, budući da je više autora ustanovilo opisano povećanje koncentracije HR u CSL, koje je ovisno i o primijenjenoj dozi hormona, iako taj porast koncentracije nije jasno proporcionalan. Važno je naglasiti da prolaz HR kroz HLB nije ovisio (ili bio pojačan) u oštećenju i pojačanoj propusnosti HLB, što je dokazano u sklopu nekoliko različitih istraživanja. Poznato je također da propusnost HLB za HR raste kod traume CNS-a poglavito hipokampalne, cerebelarne ili općenito kortikalne regije. Ta se pojačana propusnost tumači lokalnim otpuštanjem vazoaktivnih supstanci putem mehanizama potpomognutim antioksidansima. Propusnost je također ovisna o dobi a najveća je u vrijeme fetalnog razvoja. ^(116,117,118)

Danas postoji više teorija o porijeklu HR u CNS-u, a većina podataka dobivena je eksperimentalno uglavnom na glodavcima. Istraživanja su pokazala da je koncentracija mRNA najveća u hipotalamusu, te da izrazito reagira na količinu hormona koji djeluje na otpuštanje HR dok joj se aktivnost smanjuje pod utjecajem stresa. Jedan od ključnih dokaza neuralne autonomne sekrecije i regulacije koncentracije HR jest činjenica da se pituitarni HR razvija i diferencira ontogenetski značajno kasnije od HR koji se nalazi u CNS-u. ⁽¹¹⁰⁾ HR je u CNS-u humanog embrija prisutan otprilike u 8 tjednu gestacije, što je bitno ranije nego što se javlja u pituitarnoj žlijezdi, naime na kraju prvog trimestra gestacije. Nadalje, uočeno je da je najjača imunoreaktivnost HR tijekom razvojnog razdoblja CNS-a kada mu je i koncentracija u neuronalnom i glijalnom tkivu najviša. ^(110,119,120)

Tijekom posljednjih tridesetak godina nekoliko se puta pokušala odrediti koncentracija hormona rasta u likvoru bolesnika oboljelih od različitih neuroloških

oboljenja kao i u kontrolnih pojedinaca. ^(116,118,120,121) Najviše podataka postoji o koncentraciji HR u likvoru u bolesnika u kojih je verificiran deficit tog hormona. Prvi pokušaji određivanja koncentracije HR u likvoru datiraju od ranih sedamdesetih godina kada je u 12 bolesnika s akromegalijom i 8 bolesnika bez dokazane pituitarne bolesti izmjerena koncentracija HR u likvoru. ⁽¹¹⁸⁾ U tom je ispitivanju kontrolna skupina bolesnika (njih osam) imala izrazito niske, u šest bolesnika čak nemjerljive vrijednosti HR. Bolesnici s akromegalijom imali su oko pet puta veće vrijednosti HR u likvoru. U sličnom ispitivanju, ali gotovo petnaest godina kasnije, mjerenja su izvršena u standardiziranim uvjetima, na dvadeset i jednom bolesniku s različitim neurološkim bolestima ali bez dokazane bolesti pituitarne žlijezde. Srednja vrijednost koncentracije hormona rasta u toj je skupini bolesnika iznosila 0,43 ng/ml (+/- 2.1). U jednom drugom istraživanju (rađenom krajem sedamdesetih godina) koje je rađeno na kontrolnoj skupini od 43 bolesnika u kojih nije bila dokazana hipotalamičko-pituitarna disfunkcija, vrijednost HR u likvoru bila je 0.35 ng/ml (+/- 0.03). ^(113,114,115,116,118,121)

Današnja se saznanja o biokinetici HR temelje uglavnom na mjerenjima koncentracija i njihovim cirkadijanim kretanjima u plazmi. ^(110,120) Poznato je da koncentracija HR nije jednaka tijekom 24 sata, da ovisi o bioritmu određene osobe, kao i da postoje spolne razlike. Uočeno je da u zdravog pojedinca unutar 24 sata dolazi do više naglih skokova koncentracije HR (njih otprilike 10-12), koji mogu biti izazvani i nekim dokazanim vanjskim utjecajima (kao što su na primjer hipoglikemija ili fizički napor) a da je konstantan porast koncentracije HR odmah nakon usnivanja i traje i do dva sata nakon usnivanja. Uočeno je da se u ljudi u kojih je bioritam bio mijenjan, isti porast uočava nakon usnivanja, makar se ono događalo u različitim dijelovima 24-satnog ciklusa. I bez spavanja u većine ljudi najveći porast koncentracije nastupa otprilike nakon 22 sata. Proučavanjem faza spavanja, odnosno polisomnografskim metodama, uočeno je da je maksimalna

koncentracija HR u plazmi nekoliko minuta nakon što se u elektroencefalografskom zapisu pojave spori delta valovi. U muškaraca je moguće da se navedeni porast koncentracije uoči samo u toj fazi dnevnog ciklusa, dok inače koncentracija HR ostaje stabilna. U žena je međutim uobičajen i veći broj skokova tijekom dana, a ponekad onaj prilikom usnivanja i nije najveći. Kako je uočena povezanost stimuliranja sekrecije HR sa estrogenima, te općenito laktativnim hormonima, smatra se da upravo zbog poznatih hormonskih oscilacija kod žena dolazi i do nepravilnog ritma izlučivanja HR. Pojačano lučenje hormona rasta vezano je i uz fizičku aktivnost, emocionalni stres, hipoglikemiju, pojačani unos proteina, dok pojačani unos ugljikohidrata dovodi do smanjenog lučenja HR. Navedeni su podaci vezani za koncentracije HR u plazmi. Tijekom života također postoje određene razlike u koncentraciji HR u plazmi. Najjača sekrecija je u neonatalnom i predpubertetskom razdoblju, dok kasnije tijekom godina koncentracija HR u plazmi opada, tako da u postadolescentnoj dobi iznosi 25-50% one iz puberteta, a nakon šesdesete godine života čak i ispod 10% ili do nemjerljivo niskih vrijednosti. ^(110,120,122)

Postoji velika vjerojatnost da se opisane dnevne (i dobno-ovisne) promjene koncentracije hormona rasta u serumu ne odrazuju u jednakoj mjeri na koncentracije u likvoru, usprkos mogućnosti njegovog prolaska kroz hemato-likvorsku barijeru. Naime neki dokazi upućuju da je koncentracija hormona rasta unutar centralnog živčanog sustava podložna znatno manjim kolebanjima, što možda govori u prilog mišljenju da je hormon u CNS-u potreban u stabilnim količinama, a da je njegov prolazak kroz HLB reguliran, kao što je već spomenuto, posebnim, aktivnim transportnim sustavima. ⁽¹²⁰⁾

4.2 Fiziološke uloge hormona rasta

Hormon rasta je supstanca aktivna tijekom cijelog života organizma, a ne samo u fazi njegovog razvoja i rasta. Osnovna zadaća HR je omogućavanje i koordinacija rasta organizma, odnosno njegovih organskih sustava, što je najizraženije u razvojnoj životnoj dobi. Poznato je da HR ima izravan učinak na metabolizam lipida, ugljikohidrata i proteina, kao i da ima izrazito anabolno djelovanje. (110,111,112,120)

Novija istraživanja pokazala su međutim da i u odrasloj dobi, osim već navedenih, HR ima dodatan učinak na brojne druge funkcije organizma. Uočeno je da sudjeluje u regulaciji ritma spavanja i buđenja (čemu u prilog govore i primijećene promjene koncentracija ovisne o usnivanju ili buđenju) pri čemu istovremeno “suraduje” s molekulama imunološkog sustava, kao što su prvenstveno interleukin-1 (IL-1) i tumorski nekrotički faktor (TNF). Neka istraživanja sugeriraju da kod povećane koncentracije HR u serumu dolazi do somnolencije i pojačane želje za spavanjem. Uočeno je također da bolesnici sa simptomatologijom apnee u spavanju (sleep-apnea) imaju relativni deficit hormona rasta koji je reverzibilan kada se u terapijske svrhe primijeni maska s kontinuiranim nazalnim inspirijem (CPAP). (110,120,121)

Izgleda da HR sudjeluje i u regulaciji krvnog tlaka. Naime u bolesnika s akromegalijom uočena je pojava hipertenzije u znatno većem postotku nego u ostaloj populaciji. Jedno od tumačenja tog fenomena jest da hormon rasta dovodi do retencije vode i natrija, te da je hipertenzija u toj skupini bolesnika u stvari sekundarna pojava. ⁽¹¹⁰⁾

Nasuprot tome, deficit HR dovest će do povećanja količine masnog tkiva u organizmu, smanjenja količine korisne mišićne mase, smanjenja količine vode u ekstracelularnom prostoru, smanjenja mase kostiju, reducirane kardijalne funkcije kao i smanjenja fizičke snage. U takvih bolesnika povećana je i incidencija smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. ⁽¹¹⁰⁾

HR rasta izravno i neizravno utječe i na neke druge tvari. Osim izravnog utjecaja na skupinu somatomedina, HR utječe i na druge hormonske sustave uključivo i na koncentraciju hormona štitnjače u plazmi i CSL, a izgleda da djeluje i na metabolizam dopamina, aspartata i β -endorfinskog sustava. Posljednje je vrijeme uočen i pozitivan utjecaj HR na raspoloženje i kvalitetu života ispitanika (poboljšanje raspoloženja i mentalne efikasnosti). Koliko je taj utjecaj izravan, a koliko posredan zbog djelovanja hormona rasta na već spomenute sustave, potrebno je još dokazati. U svakom je slučaju kod deficita hormona rasta uočeno opadanje kognitivnih funkcija, socijalna izolacija kao i emocionalne promjene. S druge strane, dodavanje HR u terapijske svrhe pozitivno je koreliralo s mentalnom efikasnošću, poboljšanju pamćenja i procesa učenja. ^(110,120,122)

Posebno je zanimljiv neuroprotektivni utjecaj hormona rasta. Izgleda da HR ima antiapoptički učinak koji pozitivno utječe na preživljenje stanica. U istraživanju na neuronima hipokampusa koji su bili podvrgnuti pilokarpinski induciranim epileptičkim izbijanjima kao i neuronima nakon ishemičkih noksi, ustanovljeno je da se, treći dan od ozljede, javlja povećana imunoreaktivnost HR poglavito u glijalnim stanicama i mijeliniziranim aksonima u graničnim područjima oštećenog tkiva i unutar endodimalnih stanica koroidnog pleksusa. Ta aktivnost jasno prethodi IGF – I ekspresiji i ima neuroprotektivnu ulogu. Primijećeno je naime da dodavanjem HR u hipoksičko-ishemička područja dolazi do značajnog smanjenja neuronske smrti. Neuroprotektivni učinak primijećen je i u područjima mozga s najjačom ekspresijom receptora HR koja istovremeno imaju najniže koncentracije

IGF-I, što govori u prilog izravnog neuroprotektivnog učinka hormona rasta. Neka istraživanja govore i u prilog neuroprotektivnog djelovanja HR putem IGF-I, što upućuje na sinergistički učinak oba sustava. ^(110,115,116,117,122)

4.3 Hormon rasta i procesi mijelinizacije

Utjecaj hormona rasta tijekom procesa mijelinizacije dokazala su brojna ispitivanja, poglavito u kontekstu njegovog utjecaja na inzulinu-slične faktore rasta čija je uloga značajna i u razvoju staničnog reda oligodendroglije i u samoj mijelinizaciji. Samo prisutstvo HR i njegovih receptora u najranijoj razvojnoj fazi CNS-a govore o njihovoj važnosti u tom životnom razdoblju. ^(110,124,125,126)

Hormon rasta je snažan medijator IGF-a. Poglavito se to odnosi na IGF-I koji daleko više ovisi o HR nego, inzulinu sličniji, IGF II. Imajući ovu činjenicu na umu, zanimljivo je da je sam inzulin, odnosno inzulinom izazvana hipoglikemija izraziti stimulator lučenja hormona rasta (što se i koristi u eksperimentalne i dijagnostičke svrhe). Nadalje receptori za IGF u velikoj su mjeri istodobno receptori i za HR koji se veže na njih istim afinitetom. Primjena HR u terapijske svrhe dovodi do višestrukog porasta IGF-I (najmanje dvostrukog) koje nije u izravnoj svezi s povećanjem IGF-I u serumu, što se tumači mogućnošću potenciranja sinteze tog, za patofiziologiju oligodendrocita, izrazito važnog faktora rasta. ^(22,23,110,124,125,126) Dodavanje HR unutar CNS-a (intratekalno) dovest će do

višestrukog porasta ekspresije IGF-I, čak i u eksperimentalnih životinja koje su hipofizektomirane. Zanimljivo je da će takva primjena HR kod glodavaca djelovati samo u mladih životinja. Parenteralnim dodavanjem HR u terapijskim koncentracijama (u bolesnika s dokazanim deficitom tog hormona) uočen je i porast koncentracije proteina na koji se veže IGF (IGF binding protein – IGFBP) i u serumu i u likvoru (međutim bez jasne korelacije porasta). IGFBP značajan je za funkciju IGF zbog toga što, osim što je transportna molekula, može potencirati djelovanje IGF (produžujući mu poluživot) ili ga smanjivati (vlastitim vezivanjem na receptorska mjesta ciljne stanice). Čimbenici koji utječu na jednu ili drugu aktivnost tog proteinskog nosača još nisu u potpunosti poznati. ^(1,22,23,110,111)

Utjecaj hormona rasta je i preko nekih drugih modulatorskih sustava. Za sada se zna da je već ranije spomenut IRS-1 (insulin receptor substrate-1, čija je uloga u transkripciji gena prilikom indukcije sinteze mijelina, a djelovanje mu potiču faktori rasta), uključen i u signalne mehanizme na receptorima za hormon rasta. Izgleda stoga da HR i direktno sudjeluje u mijelinizacijskim procesima putem aktivacije IRS-1, djelujući sinergistički sa svojim somatomedinskim sustavom, poglavito IGF-I. ^(110,111,124,125) Još jedan dokaz za navedenu tvrdnju jest eksperimentalni rad na posebno uzgojenom soju miševa s manjkom hormona rasta. Kako je poznato da je HR glavni postnatalni regulator sinteze i lučenja IGF-I, nije iznenadilo da su razine cirkulirajućeg IGF-a-I bile snižene za više od 20 puta. Takvi miševi imali su tek polovinu normalne količine cerebralnog mijelina u tridesetom danu života, a nisu niti (za razliku od kontrolne skupine), mogli akumulirati mijelin tijekom drugog postnatalnog mjeseca. Hipomijelinizacija je, smatra se, rezultat zaustavljene proliferacije prekursora glija stanica, a možda čak i neuronskih stanica. HR izgleda djeluje i na formiranje tzv. «gap-junction»-s, odnosno uskih sveza između neuronskih, glijalnih i endotelnih stanica CNS-a koje služe prijenosu aktivnih supstanci, neurotransmiterskih sustava te ionskih i drugih

molekula. Štoviše, u nekoliko je radova uočena povezanost, odnosno pozitivna korelacija između opadanja u cerebralnoj mikrovaskularizaciji i pada sekrecije HR koje se dešavaju pod utjecajem godina odnosno porastom životne dobi. (1,110,111,122,123,124,125,126,127)

Osim ovih utjecaja treba spomenuti i utjecaj HR na tiroidne hormone. Već je ranije spomenuto da je u završnim fazama diferencijacije oligodendrocita kada započinje najintenzivnija mijelinizacija, uočena uloga i tiroidnog hormona u tim procesima. Eksperimentalne životinje koje su bile hipotireotične bile su i hipomijelinizirane. Danas je dokazano da HR ima direktan utjecaj na lučenje tiroidnog hormona, poglavito postnatalno. Ispitivanja koncentracije tiroidnog hormona u likvoru bolesnika u kojeg su mjesec dana primijenjivane terapijske doze HR parenteralno (indicirane zbog dokazanog deficita tog HR) pokazala su da je koncentracija T4 u CSL-u niža nakon primjene HR nego nakon primjene placeba, dok je koncentracija ukupnog T3 nakon jednomjesečne primjene hormona porasla. Primijećeno je također da u ljudi u kojih je dokazan deficit HR dolazi do konverzije T4 u T3, dok se to može primijetiti u zdravih pojedinaca dodavanjem hormona rasta. Dokazano je da postoji međudjelovanje HR i tiroidnog hormona, a ovaj potonji može utjecati i na lokalnu bioraspoloživost IGF-I u nekim tkivima. Postnatalno, T4 je podjedinica koja predominantno ulazi u CNS. Transportni mehanizmi za T4 nalaze se u koroidnom pleksusu, a čini ih proteinski nosač nazvan transtiretinom. Također se zna da pad koncentracije T4 u cerebrospinalnom likvoru dovodi do induciranja konverzije T4 u T3 i relativnog porasta koncentracije T3. ^(110,111,121)

Posebno zanimljivi su nedavno objavljeni rezultati eksperimentalnog rada grupe autora iz Španjolske koji su proučavali izravno djelovanje HR na kulturi fetalnih stanica, pri čemu su uspjeli dokazati direktan učinak hormona rasta na proliferaciju fetalnih cerebralnih kortikalnih stanica i njihovih prekursora, na proliferaciju astrocita, diferencijaciju neurona, te na aktivaciju IGF-I i IGFBP sustava. ⁽¹¹¹⁾

Razina hormona rasta tijekom mijelinizacijskih procesa sasvim je sigurno bitan čimbenik nesmetanog odvijanja tih procesa, putem hormonskih i somatomedinskih sustava, ali i izravno. Prema navedenom, još je, međutim, značajnija njegova postnatalna uloga u funkcioniranju tih sustava, što bi moglo imati značajne implikacije u reparatornim procesima, odnosno remijelinizaciji. ^(1,22,23,110,11,123)

5. PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI DEMIJELINIZACIJSKIH BOLESTI

Zbog kliničkog značenja demijelinizacijskih bolesti kao i njihovog uglavnom progresivnog karaktera i nemogućnosti kauzalnog liječenja, ispitivanje eksperimentalnih demijelinizacijskih modela danas je put kojim se nastoji shvatiti etiopatogenezu te bolesti, pa i pronaći načine liječenja. Danas postoji već nekoliko uvriježenih eksperimentalnih modela demijelinizacije koji se uglavnom temelje na potenciranju autoimunog odgovora uzimajući međutim u obzir i druge čimbenike mijelinizacijskih procesa. ^(1,22,23,27,37,38,40,41,54,57)

Najvažniji predstavnik demijelinizacijskih bolesti jest multipla skleroza i zbog svoje visoke učestalosti u općoj populaciji ali i uglavnom loše prognoze. Upravo su zbog toga brojna istraživanja usmjerena na proučavanje te bolesti i njezinih kliničkih oblika. Najvjerojatnije je patološka demijelinizacija, poglavito u slučaju multiple skleroze, rezultat zakazivanja više sustava koji sudjeluju u mijelinizaciji a da je autoimuni odgovor samo jedan djelić kaskade zbivanja u toj bolesti.

^(1,22,23,27,57,128,129,130,131,132,133,134,135)

5.1. Eksperimentalni modeli demijelinizacije

Danas su općenito prihvaćena tri animalna eksperimentalna modela pogodna za istraživanje demijelinizacijskih lezija centralnog živčanog sustava. Radi se o demijelinizaciji izazvanoj toksinima, autoimunim mehanizmima i virusima. Svaki od ta tri modela ima svoje prednosti i nedostatke, a niti jedan ne odgovara u potpunosti karakteristikama demijelinizacijskih bolesti u humanoj patologiji. Najvažnija razlika je u činjenici da u eksperimentalnih modela, u trenutku kada se iz medija ukloni faktor koji je doveo do demijelinizacije, nastupa relativno brza i potpuna remijelinizacija. Ipak je i ovakav pristup proučavanju demijelinizacijskih lezija stalan izvor novih podataka o karakteristikama pojedinih oblika demijelinizacijskih bolesti. ^(1,22,23,37,38)

Različiti toksini mogu vrlo brzo izazvati demijelinizacijske lezije koje nestaju uklanjanjem tih istih toksina iz organizma eksperimentalne životinje. Često se upotrebljava Cuprizon, koji dovodi do brze destrukcije mijelina poglavito u području korpusa kalozuma i gornjim cerebelarnim pedunkulima a toksičan učinak mu je prvenstveno usmjeren na stanični red oligodendroglije. Remijelinizacija nastupa kada se iz hrane ukloni navedena supstanca i potpuna je nakon nekoliko tjedana iako novonastali mijelin nije jednake debljine kao što je bio prije demijelinizacije. ^(1,22,23,128)

Demijelinizaciju će uzrokovati i ubrizgavanje ethidium bromida u centralni živčani sustav direktnim toksičkim efektom na oligodendrocite, nakon čega također brzo nastupa faza remijelinizacije. ^(1,22,23,128)

Ubrizgavanjem lizolecitina međutim dolazi do lize mijelinske ovojnice, a destrukcija mijelina izaziva i umjereni upalni odgovor, prvenstveno posredovan

makrofagima. Spontana remijelinizacija nastupa i u ovom slučaju nakon uklanjanja ostataka mijelina i također je potpuna nakon nekoliko tjedana. ⁽¹²⁸⁾

Virusima izazvana demijelinizacija centralnog živčanog sustava prilično je specifični proces koji mogu izazvati brojne skupine virusa uključivo posebne skupine specifične za pojedine životinjske vrste (na primjer visna virus u ovaca, mišji virus hepatitisa, Theilerov virus murinog encefalomijelitisa, herpes simplex virus, Semliki Forest virus u miša i brojni drugi). U čovjeka je infekcija raznim virusima često povezivana s razvojem demijelinizacije. Najčešće spominjane skupine su papovavirusi, virusi ospica, HIV, herpes simplex virus tip 6, i neki drugi, međutim niti jedna skupina virusa nije izravno povezana s razvojem multiple skleroze. ^(1,22,23)

U eksperimentalne svrhe najčešće se koristi virus mišjeg hepatitisa i Theilerov virus murinog encefalomijelitisa. U virusa mišjeg hepatitisa dolazi do razvoja bifazičkog tipa bolesti. U prvoj fazi dolazi do razvoja akutne epizode encefalomijelitisa i demijelinizacije, nakon čega nastupa faza intenzivne spontane remijelinizacije, da bi potom uslijedila kronična faza tijekom koje se izmjenjuju periodi demijelinizacije i remijelinizacije. Smatra se da demijelinizacija u tom obliku bolesti nastupa zbog izravnog citolitičkog djelovanja virusa na oligodendrocite iako novija istraživanja upućuju i na ulogu imunološkog sustava u navedenom modelu. ^(1,22,23) U drugom modelu (Theilerovog virusa murinog encefalomijelitisa) dolazi do kronične, progresivne, upalne demijelinizacijske bolesti centralnog živčanog sustava s minimalnom spontanom remijelinizacijom. Taj oblik demijelinizacije je prvenstveno imunološki posredovan T-stanicama, a uočena je samo minimalna remijelinizacija i to isključivo na rubnim dijelovima demijelinizacijskih lezija. Ipak neke genetski promijenjene vrste eksperimentalnih miševa pokazale su daleko veće mogućnosti remijelinizacije, što govori da su genetski faktori kao i međudjelovanje organizma-domaćina i uzročnika itekako

značajni za reparacijske procese. Uočeno je da su vrste miševa u kojih je spontana remijelinizacija najviše izražena one koje genetski imaju smanjen ili minimalan imunološki upalan odgovor. Izgleda stoga da baš izražena imunološka reakcija može inhibirati spontanu remijelinizaciju. U nekim je drugim eksperimentima uočeno da humoralni autoimuni odgovor koji je upućen upravo na određeni antigen može imati i povoljan utjecaj na remijelinizacijske procese, za razliku od imunološkog odgovora koji je posredovan T-stanicama. ^(1,22,23,37,38,40,41)

Možda je multiploj sklerozi najbliži eksperimentalni (i zato u tom svjetlu i najčešće proučavani) model autoimuno izazvana demijelinizacija, odnosno izazivanje eksperimentalnog autoimunog (alergijskog) encefalomijelitisa (EAE). EAE je autoimuna bolest posredovana T-stanicama kod koje je imuni odgovor usmjeren upravo protiv mijelina, odnosno njegovih antigenih svojstava. Postoji i akutni i kronični oblik EAE, a oni se međusobno razlikuju i po metodi kojom se induciraju, ali i po obimu demijelinizacije odnosno remijelinizacije. Akutni oblik je primarno upalni proces u kojem proširenost demijelinizacijskih lezija varira, dok u kroničnom obliku postoji relaps-remitirajući tijek bolesti za vrijeme kojeg se faze demijelinizacije izmjenjuju s remijelinizacijom i kliničkom remisijom bolesti. U pravilu, aktivne lezije pokazuju minimalnu remijelinizaciju dok su kronične inaktivne lezije sjelo aktivnih i izraženih remijelinizacijskih procesa, sugerirajući ponovno da upalni odgovor u stvari sprečava reparacijske mehanizme. Model EAE je vrlo često upotrebljavan za proučavanje uzroka nastanka demijelinizacije kao i za ispitivanje mogućnosti promocije remijelinizacije. ^(1,22,23,37,38,40,41)

Zanimljivo je kojim se sve mehanizmima može izazvati demijelinizacija centralnog živčanog sustava, koji mogu sami, ili u kombinacijama, i u prirodnim okolnostima dovesti do oštećenja mijelina. Izgleda, međutim, da je za patofiziologiju demijelinizacijskih bolesti daleko značajnija sposobnost reparacije, odnosno

remijelinizacije, i da, dok je ta sposobnost očuvana, i ne dolazi do razvoja kliničke slike demijelinizacijske bolesti. ^(1,22,23)

5.2 Patologija oligodendrocita u demijelinizacijskim lezijama

Slijedeći patofiziološke mehanizme stanične smrti vidljivo je da često različite nokse u konačnici dovode do jednakog ishoda, odnosno smrti oštećene stanice. Jačina oštećenja je ponekad tolika da nadjača fiziološke obrambene mehanizme i aktivira kaskadu nepovoljnih zbivanja za preživljenje stanice. Vraćanje stanične homeostaze zahtjeva brzu intracelularnu reakciju sinteze proteina. Danas je poznato da faktori rasta (ali ne samo oni) dovode do aktivacije transkripcije i ekspresije gena, čime se može započeti oporavak stanice. Vrlo je vjerojatno da je osnovni signal za transkripciju gena ulazak iona kalcija i brzi i prolazan porast razine intracelularnog kalcija. Ipak, različiti geni su i različito osjetljivi na razinu koncentracije kalcija a osim toga previsoka koncentracija iona kalcija ili njegovo produženo djelovanje može imati i suprotan učinak odnosno može dovesti i do ireverzibilnog oštećenja stanice. ^(1,22,23,27,57)

Sasvim je sigurno da u fiziološkim uvjetima postoji vrlo osjetljiva ravnoteža između staničnog oporavka i/ili njezinog ireverzibilnog oštećenja. Ustanovljeno je da ako unutar dvadesetak minuta ne započnu procesi obnavljanja stanice (odnosno ukoliko je stanica duže izložena noksi ili je intenzitet nokse veći), nastupit će stanična smrt. Čak i kada je nastupio oporavak stanice, ona još određeno vrijeme ostaje izrazito osjetljiva na oštećenja i teško može preživjeti tri neposredna

izlaganja istom oštećenju, ukoliko su oštećenja u razmacima manjim od šest sati.
(57)

Ustanovljeno je da oštećenje oligodendrocita može nastupiti pod utjecajem upalnih medijatora, anoksije i ekscitotoksičkih oštećenja (oštećenja koja nastupaju uslijed aktivacije glutamatnih i kainatnih receptora a posredovana su slobodnim radikalima). (27,57)

Pojam ekscitotoksičkog oštećenja poznat je već više od 50 godina, a rezultat je pojačanog signala glutamata koji dovodi do hiperekscitacije glutamatnih receptora (GluRc). Dokazano je da tu vrstu oštećenja mogu pretrpjeti sve stanice živčanog sustava koje imaju GluRc a ono je česta posljedica akutnog oštećenja CNS-a ali i kroničnih neurodegenerativnih poremećaja. Glutamat je transmitter koji djeluje na otvaranje ionskih kanala i povišenje metabolizma stanice. Njegovi se receptori sastoje od tri podjedinice: AMPA, NMDA i kainatne podjedinice (kainat može aktivirati i kainatne i AMPA receptore). AMPA i kainatni receptori postoje i na oligodendrogliji, astrogliji i mikrogliji, dok su NMDA receptori izrazito slabo zastupljeni u tim staničnim redovima. Međutim, u zrelih oligodendrocita nedostaje jedan fragment podjedinice AMPA (i to GluR2 fragment) što njih čini posebno propusnima za ione kalcija. (57)

Intracelularni ioni kalcija su glavni pokretač celularne smrti. Posljedica ishemičkog ili traumatskog oštećenja CNS-a je gomilanje ekstracelularnog glutamata i hiperekscitacija GluRc a time i nakupljanje intracelularnog kalcija. Dugotrajnije izlaganje stanice ionima kalcija dovest će do njezinog ireverzibilnog oštećenja, koje se između ostalog manifestira i propadanjem mitohondrijske membrane. Ustanovljeno je da je upravo gubitak mitohondrijske membrane jedan od najvažnijih signala indukcije apoptoze. U kulturi neurona, toksičnost glutamata obično je prevenirana antagonistima NMDA receptora, koji međutim nisu posebno aktivni u staničnom redu glije. Upravo su zbog toga oligodendrociti izrazito

osjetljivi na hiperekscitaciju GluRc, odnosno povećanu koncentraciju glutamata. Uočeno je da dugotrajnije (u trajanju od više dana) izlaganje OG antagonistima glutamatnih receptora dovodi do masivne smrti oligodendrocita, demijelinizacije, oštećenja aksona i upalne reakcije. Štoviše, dugoročno ekscitotoksičko oštećenje oligodendrocita dovest će do atrofije i izražene demijelinizacije aksona. Izgleda stoga da postoje mehanizmi koji se mogu obraniti od akutnih oštećenja ali postanu nemoćni u slučaju kroničnog izlaganja noksi. ^(27,57,129,130,131,132,133)

Pitanje je međutim da li ekscitotoksička reakcija izaziva upalnu ili je redosljed obrnut. Konačan odgovor je još nepoznat. Zanimljivo je ipak da aktivacija GluRc mikroglije dovodi do njezine aktivacije i otpuštanja upalnog medijatora, naime citokina TNFalfa (tumorskog nekrotičkog faktora alfa) koji sam može izazvati staničnu smrt OG. Mora se naglasiti da i aksoni pa i sam mijelinski omotač ima GluRc, tako da se postavlja i pitanje propadanja tih struktura, odnosno da li je demijelinizacija i atrofija izravna posljedica aktivacije njihovih GluRc ili samo pasivna posljedica smrti oligodendroglije? Navedena saznanja nameću i pitanje da li je poremećaj u signalnom sustavu glutamata, ili čak genetski predisponirana preosjetljivost GluRc, jedan od mogućih uzroka demijelinizacijskih bolesti. Jedan od dokaza za bitnu ulogu ekscitotoksičke smrti stanice u demijelinizacijskim bolestima jest i činjenica da u eksperimentalnim demijelinizacijskim stanjima (prvenstveno eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu, bolesti koja ima dosta značajki multiple skleroze) stanje poboljšavaju antagonisti AMPA i kainatnih receptora. U eksperimentalnih životinja dokazano je i bolje preživljenje OG i smanjeno oštećenje aksona primjenom antagonista GluRc. ^(1,22,23,27,57,128,132,133)

Današnja saznanja pokazuju da homeostaza metabolizma glutamata, odnosno njezini poremećaji, igraju značajnu ulogu u patofiziologiji oligodendrocita, a možda i etiologiji demijelinizacijskih bolesti. ⁽⁵⁷⁾

5.3. Značajke demijelinizacijskih lezija u multiploj sklerozi

Izdvojena skupina u grupi demijelinizacijskih bolesti jest bolest nazvana multiplom sklerozom (MS). Nazivom “multipla skleroza” obuhvaćena je heterogena grupa kliničkih entiteta čiji je zajednički nazivnik izrazito smanjena sposobnost remijelinizacije. ^(1,22,23,133) Postoje različiti, više ili manje česti, oblici te bolesti. Današnja klasifikacija najčešće obuhvaća četiri osnovna oblika: relaps- remitirajući oblik, sekundarno progresivni oblik, primarno progresivni oblik i progresivno-relapsirajući oblik. Gotovo 85% bolesnika zadržava kliničke značajke relaps-remitirajućeg oblika bolesti, koja u tom slučaju ima izrazito kroničan karakter. Međutim u 10% bolesnika multipla skleroza od početka ima primarno progresivan tijek i izrazito lošu prognozu već unutar dvije godine od postavljanja dijagnoze, ne pokazujući niti minimalne znakove postojanja reparacijskih, odnosno remijelinizacijskih procesa. ^(1,133,134)

Zanimljivo je nedavno objavljeno istraživanje tijekom kojeg je mjerena razina MPB-a u likvoru bolesnika s MS. Dokazano je naime da se, ukoliko postoji oštećenje CNS-a, odnosno demijelinizacija, pojavljuje MPB ili njegovi peptidi u mjerljivim koncentracijama u likvoru. U spomenutom radu zasebno je proučavana koncentracija MPB-a u likvoru u četiri skupine oboljelih od MS: s relaps-remitirajućim oblikom (posebno u fazi relapsa a posebno u fazi remisije bolesti), sekundarno progresivnim i primarno progresivnim oblikom. Ovo je istraživanje dokazalo da postoje statistički značajne razlike u koncentraciji tog značajnog proteinskog sastojka mijelina u navedenim skupinama bolesnika. Posebno je značajan nalaz izrazito niske koncentracije MPB-a u bolesnika s progresivnim

oblikom bolesti, a dokazana je i negativna korelacija koncentracije MPB-a u likvoru s dužinom trajanja bolesti u svim ispitivanim skupinama. Novija su istraživanja stoga usmjerena i u proučavanja subtipova bolesti, ne smatrajući ih više etiopatogenetski identičnima. ^(10,11,135)

Jasan uzrok demijelinizacije, a pogotovo nedostatka remijelinizacijskih mehanizama u multiploj sklerozi, nije poznat. Danas se zna da patogenetski mehanizam te bolesti zasigurno nije (kao što se ranije mislilo) jedinstven.

^(1,22,23,27,37,38,57,131,132,133,134,135) Ultrastrukturalne analize demijelinizacijskih lezija

(plakova) i eksperimentalni modeli pokazali su da su plakovi heterogeni, žarišnog karaktera, uz prisustvo jasne upalne reakcije, smrti oligodendrocita, te posljedičnog (?) propadanja aksona i stvaranja astrocitnog ožiljka. Jasna autoimuna reakcija prisutna u multiploj sklerozi vjerojatno je ipak samo jedna od karika u lancu događaja, a sasvim sigurno ne primarni etiopatogenetski čimbenik. ⁽¹⁾ Postoje brojni dokazi da jedna od osnovnih imunoloških reakcija, naime aktivacija komplementa,

nije značajka oligodendrocita. ⁽⁵⁷⁾ Izravno miješanje OG i seruma naime neće izazvati lizu oligodendroglije. Vjerojatno su stoga neke druge interakcije receptora

i liganda, posredovane mikrogljom, daleko važnije u patologiji oligodendroglije u MS. ^(1,22,23,27,54,57) Primijećeno je međutim da niska koncentracija antitijela, koja pokriva površinu oligodendrocita i mijelinskog omotača čini te strukture daleko osjetljivijima na oštećenja uzrokovana aktivacijom mikroglije. ^(27,57,135) Jedna (ako

ne i ključna) supstanca koja dovodi do letalnog citotoksičnog signala jest TNFalfa, odnosno njegovo lokalno otpuštanje i vezanje u većim količinama na staničnu površinu. Neka istraživanja (doduše in vitro) upućuju da TNFalfa dovodi do lize oligodendrocita i izravno. Danas postoje i dokazi da ekspresija mRNA TNF-a alfa raste u mononuklearima periferne krvi u bolesnika neposredno prije nastupa relapsa multiple skleroze, a istovremeno pada koncentracija nekih faktora rasta (prvenstveno TGF- β). U nekim istraživanjima pokušalo se primjenom raznih

faktora rasta zaštiti oligodendrocite od imunološke reakcije i lize stanice, što je uspjelo samo djelomično, ali se njihovom primjenom nije uspjelo zaustaviti porast koncentracije intracelularnog kalcija, koji također dovodi do smrti oligodendrocita. Neka istraživanja pokazuju da je autoimuni odgovor usmjeren i na antigen novonastalog (“nezrelog”) mijelina koji se počinje stvarati tijekom reparacijskih procesa što ponovno dovodi do oštećenja pa i eventualno smrti OG. ^(1,22,23,27,57,123,135) Bez obzira na jačinu autoimune reakcije ona je odgovor na već prisutna oštećenja oligodendroglije i aktivacije makroglije. Vrlo vjerojatno nije jedinstvena baš za multiplu sklerozu, budući da se zna da i u nekim drugim patološkim stanjima može doći do migracije i prolaska aktiviranih limfocita kroz HLB i razvoja lokalnog upalnog odgovora. ^(22,23) Ukoliko, međutim, nema odgovarajućeg antigena, dolazi do apoptoze aktiviranih limfocita i zaustavljanja patološkog procesa. ^(1,22,23) Akutna demijelinizacija može tada biti posljedica naglog otpuštanja citokina, međutim to stanje neće izazvati trajne demijelinizacijske plakove budući da će prevladati reparacijski mehanizmi. Kronična demijelinizacijska bolest nastupa kada dođe do akumulacije citokina (prvenstveno TNF-a alfa) unutar CNS-a, aktivacije mikroglije, te povećanja broja i afiniteta njezinih receptora. Ukoliko je tada određena vrsta liganda i/ili antitijela deponirana na površini oligodendrocita ili mijelina, doći će do adhezije i letalnog oštećenja stanica. Očito je da je oštećenje oligodendroglije i nemogućnost remijelinizacije osnovni preduvjet razvoja bolesti, stoga su i današnja istraživanja prvenstveno usmjerena na istraživanja patologije OG i promocije remijelinizacije. ^(123,135)

Dodatno su zanimljiva klinička istraživanja histopatološke podloge plakova u multiploj sklerozi. Danas je dokazano da jasni znakovi aksonalnog oštećenja ne postoje samo unutar plakova već i u okolnoj bijeloj supstanci koja ne djeluje zahvaćena bolešću. ^(37,38,40,41,54) Slikovnim metodama (poglavito magnetskom rezonancom (MR)) dokazano je da je klinički deficit u bolesnika prvenstveno vezan

uz stupanj aksonskog oštećenja, odnosno razvoj kortikalne atrofije. ^(131,132,133) Studije u kojima se pomoću MR- spektroskopije mjerila relativna koncentracija N-acetilaspargata (NAA – pomoćni marker stupnja očuvanosti aksona u odraslom mozgu) također su pokazale da je koncentracija NAA sve niža duljim trajanjem bolesti i da neposredno korelira s težinom kliničke slike. Patohistološke studije jasno su pokazale da u aktivnim demijelinizacijskim lezijama dolazi do transekcije aksona, te da gustoća takvih aksona korelira s obimom upalne aktivnosti u samoj leziji. Moguće je da je upalna reakcija poglavito ona duljeg, kroničnog trajanja, neposredan uzrok progresivnog aksonskog oštećenja. Sasvim je međutim sigurno da je propadanje aksona klinički najznačajnija karakteristika i akutne i kronične faze multiple skleroze, a dokazano je da oštećenja nalazimo ne samo unutar plaka već i difuzno, izvan aktivnih lezija. ^(54,57,131,132,133,134) Neke studije upućuju na značaj Waller-ove degeneracije u procesu propadanja aksona, koji je primarno zahvaćen unutar samog demijelinizacijskog plaka. Upravo u proučavanju ovog fenomena značajna je MR-spektroskopija, odnosno mjerenje NAA. Sama NAA prisutna je isključivo u centralnom živčanom sustavu a produkt je oksidativnog metabolizma mitohondrija. Nalazi se u neuronima, astrocitnim OE2 progenitorima ali i u zrelim oligodendrocitima. Poznata je i dinamika prisustva NAA, naime u slučaju gubitka aksona, NAA je u stalnom padu, dok reverzibilni pad NAA ukazuje na oštećenje metabolizma mitohondrija. Pad koncentracije NAA dokazan je kako u akutnim tako i u kroničnim demijelinizacijskim plakovima, međutim u progresivnih oblika MS dokazan je u velikom omjeru i unutar inače morfološki zdrave bijele tvari. U tim je studijama upravo koncentracija NAA u morfološki zdravoj bijeloj tvari neposredno korelirala s kliničkim statusom u bolesnika. Stupanj oštećenja aksona raste s duljinom trajanja bolesti i jače je izražen u bolesnika s izrazitijom upalnom aktivnošću. Posebno je značajno saznanje o propadanju aksona i unutar naizgled

zdravog tkiva što podržava mišljenje o važnosti Waller-ove degeneracije u patofiziologiji poglavito progresivnih oblika multiple skleroze. ^(131,132,133)

5.4 Uloga faktora apoptoze u multiploj sklerozi

Prije više od trideset godina grupa autora postavila je teoriju o održavanju homeostaze koja prvenstveno ovisi o aktivnom procesu u koji je uključeno i selektivno umiranje stanica koje više (ili uopće) nisu potrebne u organizmu. Takvu staničnu smrt, koju je inducirao sam organizam nazvali su “apoptozom”. ^(1,135) U suprotnosti od nekroze, koja nastupa uslijed vanjskih, nepredviđenih noxi i toksičkih čimbenika, apoptoza je programirana stanična smrt koja nastupa u skladu sa strogim pravilima. ^(1,57,135) Osnovni mehanizam indukcije apoptoze jest putem specifičnih interakcija liganda i receptora koji nakon odgovarajućeg međudjelovanja dovode do apoptotičkog signala. Jedan od značajnih specifičnih liganada jest TNF/NGF obitelj. Apoptozu može međutim inducirati i nedostatak određenih faktora rasta. Osnovna karakteristika apoptotičkih mehanizama jest aktivacija posebne skupine enzima (tzv. caspasa) koja dovodi do aktivacije proteolitičke kaskade zbivanja i konačno degradacije vitalno značajnih proteina. Posljedično dolazi do nestajanja staničnih organela, poglavito mitohondrijske membrane, fragmentiranja ostataka i njihove fagocitoze, odnosno potpunog nestanka stanice. Na taj način organizam aktivno odstranjuje patološke stanice (na primjer one zaražene virusom, ili karcinogeno promijenjene) ali i zaustavlja za sebe nezdrave imunološke procese. Na primjer, već aktivirane T-stanice, u slučaju potrebe, otklonjene su iz organizma apoptotičkom smrću putem specifičnih sistema liganada. Taj mehanizam je posebno aktivan u autoreaktivnim T-stanicama. ⁽¹³⁵⁾

U multiploj sklerozi, bez obzira na kompleksnost etiopatogeneze bolesti, kao i nepoznavanje osnovnog pokretača kaskade zbivanja, aktivacija T-stanica igra važnu ulogu u daljnjem razvoju i tijeku bolesti. Aktivirane T-stanice dovest će do aktivacije sustava mikroglije, kao i ekspresije citokina, poglavito TNFalfa, što dokazano može dovesti do demijelinizacije, odnosno smrti OG. ^(134,135)

Zanimljivost mehanizma apoptoze u demijelinizacijskim bolestima, odnosno posebno multiple skleroze jest u dvojakosti uloge tog fenomena, koji može biti i zaštitni regulator ali i štetan induktor demijelinizacije. ⁽¹³⁵⁾

Poznato je da su T-limfociti štetni jedino ukoliko su aktivirani. U fiziološkim uvjetima, zahvaljujući mehanizmu apoptoze, vrlo brzo dolazi do njihove deaktivacije i supresije. U bolesnika s MS izgleda da je sistem deaktivacije oštećen što rezultira preživljenjem aktiviranih T-limfocita. Moguće je da u bolesnika s MS dolazi do oštećenja posebnog sustava liganda nazvanog CD95 koji regulira apoptozu aktiviranih T-stanica. Izgleda da apoptoza igra ulogu i u zaustavljanju već prisutnog autoimunog odgovora. Naime u fazi početne remisije u eksperimentalnih životinja s EAE uočena je izražena apoptoza T-stanica. U likvoru bolesnika s MS u prvoj razi remisije dokazano su povišene koncentracije TGFβ, koji ima i anitupalna svojstva ali i proapoptičko djelovanje na aktivirane T-limfocite. ^(1,22,23,135)

Nasuprot ovom djelovanju, postoje dokazi i o negativnom utjecaju apoptotičkih mehanizama u multiploj sklerozi. Uočeno je naime da u demijelinizacijskim plakovima postoje i znakovi apoptotičke smrti glija stanica, prvenstveno oligodendrocita. ^(57,134,135) Također, u aktivnim plakovima u bolesnika s MS postoji veća koncentracija TNF-a i povećan broj njegovih receptora, a u likvoru bolesnika vrijednosti koncentracije TNF-a koreliraju s ozbiljnosti bolesti. Već opisano djelovanje TNF-a unutar centralnog živčanog sustava (naime poticanje proliferacije astrocita, aktivacija i poticanje proliferacije makrofaga te aktivacija endotelne stanice) sukladno je indukciji imunološke reakcije. ⁽¹²³⁾ S obzirom na dokazani

utjecaj TNF-a na pokretanje smrti oligodendrocita i direktno i putem upalnih reakcija, smatralo se da je to ključan čimbenik u razvoju demijelinizacijskih lezija. Ipak, saznanje da i u eksperimentalnih životinja koje su uzgojene s deficitom TNF-a dolazi do demijelinizacije i upalne reakcije dovelo je ovu tvrdnju u pitanje. ^(123,135) Dodatna ispitivanja utjecaja tog faktora dovela su do saznanja da vjerojatno postoji nekoliko subtipova multiple skleroze (na što upućuje i različit klinički tijek bolesti). ^(1,22,23,134,135) Posebno su zanimljivi oblici u kojim demijelinizacija prethodi upalnom odgovoru, a neki rezultati sugeriraju da u takvim oblicima lokalna produkcija TNF-a dovodi u stvari do apoptoze oligodendrocita i demijelinizacije čija je osnovna patološka karakteristika oligodendropatija. Današnjim mogućnostima histopatološke i imunopatološke dijagnostike demijelinizacijskih lezija i plakova pokazalo se da su te lezije izrazito heterogene u različitim skupina bolesnika, te da je sam proces vrlo vjerojatno posredovan različitim patofiziološkim mehanizmima. ^(1,22,23,134,135) U nekih bolesnika proces demijelinizacije nastavlja se usprkos očuvanju barem dobrim dijelom zdravih oligodendrocita, dok su u drugih OG osnovna meta patofizioloških procesa, a demijelinizacija je posljedica njihove destrukcije i nestajanja. Vrlo je vjerojatno da reparacijski procesi uvelike ovise i o postojanju jednog ili drugog oblika bolesti. Kod EAE izgleda da ne dolazi do smrti oligodendrocita. Demijelinizacija je posredovana aktiviranim T-stanicama i antitijelima na mijelin pri čemu su makrofazi važne efektorne stanice. Ipak remijelinizacijske sposobnosti su izgleda, barem u većoj mjeri, očuvane. Iako je autoimuna reakcija, a prvenstveno TNF kao moćan posrednik upalnih reakcija koji je na više razina upleten u imunološke reakcije, važan čimbenik razvoja demijelinizacijskih bolesti, novija su ispitivanja pokazala da TNF može izravno utjecati i na apoptozu oligodendrocita, pa i na taj način indirektno na demijelinizaciju u kojoj je upalna reakcija potom posljedica demijelinizacije. Nadalje, izgleda da nije nebitno koja vrsta stanica je izvor TNF. TNF koji potječe

iz astrocita će izazvati demijelinizaciju, dok onaj iz neurona neće. Također će transmembranski TNF izazvati opsežnije demijelinizacijske lezije od slobodnog, topivog TNF-a. Ta promatranja sugeriraju da demijelinizacija posredovana TNF-om zahtijeva postojanje specifičnog međudjelovanja stanica, prvenstveno oligodendrocita i makrofaga. ^(27,57,123,135)

Zanimljiva su i saznanja vezana uz propadanje aksona što je opservirano u starijim demijelinizacijskim lezijama. Opseg gubitka aksona izravno korelira s jačinom upalne aktivnosti u leziji. ^(131,132,133)

Ipak, u demijelinizaciji kojoj je osnovni patosupstrat oligodendropatija, propadanje neurona nije uočeno u tolikoj mjeri, vjerojatno zbog činjenice da neuroni nisu direktna meta TNF-a već su oštećeni samo posredno, tijekom imunološke reakcije koja nastaje lokalno na mjestu destrukcije oligodendrocita i mijelina.

Jačinu imunološke reakcije donekle određuje i stanje hematolikvorske barijere, odnosno specifično astrocitarna ekspresija TNF-a dovest će do aktivacije endotelnih stanica i oštećenja HLB.

Promatrani zajedno, rezultati ovakvih ispitivanja dovode do zaključka da je, u oblika u kojih je apoptoza oligodendrocita uslijed djelovanja TNF-a primarni i osnovni patološki proces, oštećenje aksona sekundarna pojava ovisna o jačini imunološkog odgovora, odnosno propusnosti HLB. Vjerojatno bi spriječavanje razvoja pojačane propusnosti HLB dovelo i do smanjenja imunološkog odgovora, a time i manjeg opsega oštećenja aksona.

Ova ispitivanja također upućuju i na to da demijelinizaciju ne izaziva nužno autoimuna reakcija, već da je TNF i vrlo djelotvoran i snažan uzročnik apoptoze u OG i primarne demijelinizacije. Uočeno je i da histopatološki izgled demijelinizacijskih lezija u eksperimentalnih životinja u kojih se primarno radi o

oligodendropatiji gotovo identičan izgledu demijelinizacijskih plakova u bolesnika s multiplom sklerozom. ^(1,22,23,27,54,57,131,132,133,135)

6. REMIJELINIZACIJA U EKSPERIMENTALNIM I FIZIOLOŠKIM UVJETIMA

Bez obzira na uzroke i čimbenike demijelinizacijskih procesa, razvoj demijelinizacije sam po sebi ne predstavlja bolest. ^(1,22,23) Istraživanja su dokazala da je demijelinizacija vrlo česta pojava unutar i središnjeg i perifernog živčanog sustava, te relativno čest odgovor na različite nokse. ^(22,23) Bolest nastupa kada zakažu reparacijski mehanizmi, odnosno kada nije moguća efikasna remijelinizacija. Demijelinizirani akson gubi najveći dio svojih funkcionalnih sposobnosti, a često i propada. Adekvatna remijelinizacija dovela bi do restituiranja funkcije glije i neurona i nestanka kliničke simptomatologije. Upravo zbog toga su istraživanja fizioloških mehanizama remijelinizacije i poglavito promocije remijelinizacije danas od posebnog značaja u proučavanju demijelinizacijskih bolesti. U multiploj sklerozi remijelinizacijski procesi u nekih oblika vrlo brzo, a u nekih nakon određenog vremena trajanja bolesti, zakazuju, što predstavlja osnovnu značajku te bolesti. Uzroci demijelinizacije u multiploj sklerozi su dokazano višestruki i teško da će uskoro biti u potpunosti poznati kako bi se na njih moglo djelovati. Ipak, promocijom remijelinizacijskih mehanizama, bez obzira na pokretač demijelinizacijskih procesa, vrlo bi se vjerojatno značajno poboljšala prognoza ishoda same bolesti. ^(1,22,23,27,30,32,40,51,53,108,109,128,134,135,136,137,138,139,140,141,142)

6.1. *Strukturne promjene remijeliniziranog neurona*

U većini bolesti ili eksperimentalno izazvanim stanjima koja dovode do demijelinizacije (a uključuju i EAE, virusima i/ili toksinima izazvanu demijelinizaciju) demijelinizaciju slijedi intenzivna remijelinizacija i kompletno obnavljanje funkcije neurona. Porijeklo stanica koje mogu remijelinizirati aksone je još uvijek predmet istraživanja, odnosno ključno je pitanje da li se radi o oporavljenim “bolesnim” oligodendrocitima ili pak o novonastalim oligodendrocitima iz postojećih progenitorskih stanica. ^(1,22,23136) Morfološka, biokemijska i imunohistokemijska proučavanja novonastalog mijelina govore u prilog činjenici da remijelinizacija u odrasloj dobi prati faze mijelinizacije razdoblja razvoja organizma. Novonastali mijelin je po strukturi praktički identičan ranijem, jedino je uočena nešto manja debljina mijelinskog omotača oko odgovarajućeg aksona. Funkcionalne promjene novomijeliniziranog aksona međutim nisu uočene. ^(22,23) Uočeno je međutim da u kroničnim progresivnim demijelinizacijskim bolestima, kao što je na primjer multipla skleroza, novonastali mijelin u stvari predstavlja antigen na koji imunološki sustav CNS-a reagira upalnom reakcijom, stvaranjem autoantitijela i konačno ponovnim uništavanjem i fagocitozom tog mijelina. ^(27,128,136) Izgleda stoga da novonastali mijelin eksprimira površinska antitijela koja možda nisu identična onima nastalim tijekom razvoja ili je pak pojačanjem propusnosti hemato-likvorske barijere u centralni živčani sustav omogućen prolaz aktiviranih upalnih stanica koje reagiraju na novonastali mijelin. Bez obzira na navedeno, kada pravodobno nastupe remijelinizacijski mehanizmi,

naime u fazi dok još nije došlo i do oštećenja aksona, struktura novonastalog mijelina ne pokazuje razlike u odnosu na normalni mijelin, a ne uočavaju se niti razlike u njegovim funkcijskim mogućnostima odnosno funkciji samog neurona. (1,22,23,51,53,136)

6.2. Remijelinizacija u animalnim modelima

Postojanje različitih animalnih modela demijelinizacije centralnog živčanog sustava omogućava ispitivanja promocije remijelinizacijskih procesa kao i pokušaje otkrivanja zbog čega u multiploj sklerozi u stvari dolazi do zatajenja prirodnih remijelinizacijskih mehanizama. U većini slučajeva tijekom tih ispitivanja ili se pokušava inhibirati imunološku reakciju putem imunosupresije ili stimulirati proliferaciju i diferencijaciju već postojećih oligodendrocita, odnosno njihovih progenitora putem kombinacija raznih faktora rasta ili se pokušava direktno zamijeniti izgubljene oligodendrocite transplantacijom glijalnih stanica. (22,23,27,30,32,40,128)

Imunosupresijski mehanizmi kao terapijska mogućnost već su primijenjivani i u kliničkoj praksi, a sasvim sigurno imaju svoje mjesto u promociji remijelinizacije u slučaju razvoja imunološkog odgovora tijekom multiple skleroze. ^(22,23,134) Ipak taj oblik promocije remijelinizacijskih mehanizama ima najmanje dva limitirajuća faktora. Prvo, terapijski se može djelovati samo u vrlo ranom stadiju bolesti dok i još vlastiti mehanizmi remijelinizacije efikasno djeluju. Stoga je takva terapija potpuno beskorisna u kroničnim oblicima bolesti, kada su razvijene demijelinizacijske lezije, odnosno plakovi u kojih postoje jasni znaci glioze

(odnosno stvaranja astrocitarnog ožiljka i nestanka oligodendrocita). S druge strane, taj oblik terapije ima potencijalno opasne nuspojave, tako da su najnoviji pokušaji u stvari vezani uz primjenu strogo specifičnih imunosupresivnih metoda. (22,23,30,32,40,134,136)

Imunosupresija se prvenstveno proučava na već opisanim demijelinizacijskim animalnim modelima, i to po mogućnosti onima u kojih baš imunološki sustav predstavlja osnovni patogenetski mehanizam, a to su demijelinizacijski procesi izazvani primjenom raznih virusa, a poglavito EAE. Ubrizgavanjem mijelinskog bazičnog proteina (MBP) neposredno pred izbijanje (izazivanje) EAE-a ili MBP-a i galaktocerebrozida nakon indukcije bolesti dovelo je do poboljšanja kliničkog stanja oboljelih životinja i ubrzane remijelinizacije u takvih jedinki. U sličnoj vrsti ispitivanja čak se uspjelo prevenirati izbijanje akutnog EAE-a, što je upućivalo da ubrizgavanje komponenata mijelina inhibira patološki imunološki odgovor bilo odstranjenjem autoreaktivnih stanica bilo indukcijom supresijskog imunološkog odgovora. (22,23,128) Direktan dokaz da imunosupresija može promovirati remijelinizaciju dobiven je nakon primjene određenih imunosupresijskih sredstava u miševa u kojih je demijelinizacija izazvana virusima. U više slučajeva uspjelo se dokazati da se ubrizgavanjem homogenizirane kulture stanica spinalne moždine ili kulture komponenata mijelina može u kronično oboljelih životinja izazvati remijelinizacija. Danas je već u brojnim ispitivanjima dokazano da ubrizgavanje antigena iz samog centralnog živčanog sustava u CNS oboljele životinje može stimulirati humoralni autoimuni odgovor i stimulirati remijelinizacijske mehanizme. (22,23,128) Posljednjih se godina pokušava točnije rasvijetliti uloga imunosupresijskih mehanizama u liječenju demijelinizacijskih bolesti. U tu svrhu pripremljen je niz hibridnih kultura stanica iz splenocita zdravog miša koje su homogenizirane s kulturom stanica spinalne kralježnične moždine. Unutar te kulture otkriveno je jedno monoklonalno antitijelo za koje je ustanovljeno da

promovira remijelinizaciju. To je antitijelo iz grupe IgM-a. Kodirano je imunoglobulinskim genima i ima fenotipske karakteristike prirodnog autoantitijela. Ta skupina antitijela predstavlja brojnu populaciju autoreaktivnih antitijela za koje se pretpostavlja da imaju imunomodulacijsku funkciju. Navedeno IgM antitijelo doista je uspjelo suprimirati upalnu reakciju zaraženog miša. ^(1,22,23)

Ovakvi rezultati pokazali su da selektivna primjena specifičnih antitijela može povoljno djelovati na tijek demijelinizacijskih autoimunih bolesti usprkos do sada uvriježenom mišljenju da humoralni imunološki sustav ima isključivo negativan utjecaj. ^(1,6,7,22,23)

Transplantacija stanica glije je slijedeći (i najnoviji) pokušaj kojim se nastojalo povoljno utjecati na reparacijske mehanizme demijelinizacijskih bolesti. ^(137,138)

Smatra se da ima barem jednu veliku prednost u odnosu na druge eksperimentalne modele stimulacije remijelinizacije u centralnom živčanom sustavu. Teoretski, to je najbolji način remijelinizacije kroničnih demijelinizacijskih lezija, u kojih je već došlo do propadanja i smrti oligodendroglije. Dosadašnja ispitivanja uglavnom su se odnosila na akutne demijelinizacijske modele izazvane toksičkim noksama, a za sada još nema jasnih podataka o efektu takve terapije na kronične demijelinizacijske plakove s već prisutnim gliotičkim promjenama u autoimunog ili virusnog demijelinizacijskog modela. U takvih oblika bolesti postavlja se pitanje da li je samo područje transplantacije pogodni medij za nove stanice. ^(137,138,139)

Osnovni problem takve vrste liječenja predstavlja koji stanični oblik se može i treba transplantirati. Poznato je da oligodendrociti u različitim stadijima svoje razvojne faze mogu proizvesti mijelin. Umrtvljene kulture oligodendrocita su također bile uspješno upotrebljavane u eksperimentalnih životinja. One su međutim vrlo često imale antigena svojstva i imunizirale organizam u koji su bile transplantirane, tako da je za takav oblik terapije često dodatno bilo potrebno upotrebiti neki vid imunosupresije. Pitanje je i vrijednosti astrocitnog staničnog

reda u remijelinizacijskim procesima. Iako su astrociti stanice koje ograničavanjem područja demijelinizacije i stvaranjem gliotičnog ožiljka u stvari djeluju negativno na samu bolest, ipak je poznato da su izvor brojnih faktora rasta ali i citokina, koji u odgovarajućim uvjetima mogu imati i povoljne efekte na remijelinizaciju. Najnovija ispitivanja su pokazala da je nakon odbacivanja presađenih oligodendrocita u animalnih demijelinizacijskih modela putem autoimune reakcije čiji su medijatori dijelom bili i citokini iz astrocita došlo do poticanja remijelinizacijskih mehanizama u preostalih oligodendrocita domaćina. Izgleda stoga da takva reakcija može biti i stimulativna za remijelinizacijske mehanizme, te da u tom svjetlu treba razmatrati i presađivanje određenih staničnih redova. Dodatno, mada u animalnim modelima presađivanje pojedinih ili kombinacija staničnih kultura obično ne predstavlja praktični problem, u humanoj medicini vjerojatno bi i izvor staničnih kultura oligodendrocita pa i njihova kultivacija mogao predstavljati višeznačni (uključivo i etički) problem. ^(137,138,139)

U svakom slučaju već se na eksperimentalnim modelima dokazalo da remijelinizacija, pa makar i vrlo oskudna (pri čemu je novonastali mijelin značajno tanji od normalnog) značajno poboljšava funkciju aksona i smanjuje klinički deficit, te su današnja istraživanja uvelike usmjerena na proučavanje mogućnosti promocije remijelinizacije. Za sada izgleda međutim da su terapijske mogućnost samo s jednim oblikom promocije remijelinizacije slabe, te da će sasvim sigurno biti potrebno primijeniti kombinacije čimbenika koji dovode do remijelinizacije. Kod toga će vjerojatno za način primjene povoljno utjecati i činjenica da je propusnost krvno-moždane barijere povećana, pa će prolazak molekula koje su u ovom slučaju korisne za promociju remijelinizacije biti olakšan. Poseban će doprinos biti dodatna saznanja o mehanizmima koji posreduju redosljedu zbivanja u transdukciji gena i sintezi proteina potrebnih za stvaranje novog mijelina. Poglavitno su značajna i saznanja o adekvatnoj lokalnoj sredini potrebnoj za

remijelinizacijske procese. Upoznavanje navedenih reakcija omogućit će direktan utjecaj na sasvim određene intracelularne mehanizme, što je u stvari konačan cilj terapije. ^(137,138,139,140)

6.3 Faktori rasta i eksperimentalne mogućnosti promocije remijelinizacije

Prema dosadašnjim saznanjima, izgleda da uspjeh liječenja progresivnih demijelinizacijskih bolesti, prvenstveno multiple skleroze, leži u mogućnostima promocije remijelinizacijskih mehanizama, budući da je osnovna karakteristika te bolesti upravo njihovo, u konačnici potpuno, zakazivanje. ^(22,23,140,141,142) Cilj terapije je svakako induciranje odgovarajućeg specifičnog biološkog odgovora (proliferacije OG i sinteze mijelina). U velikom broju animalnih eksperimenata uspelo se dokazati da su u promociji remijelinizacije, poglavito u određenim fazama mijelinizacije posebno značajni faktori rasta, koji svaki za sebe ima izrazito specifičan utjecaj na više staničnih funkcija, u nekoliko vrsta staničnih redova u njihovim različitim razvojnim stadijima. Treba naglasiti da niti jedan faktor rasta nije apsolutno specifičan u svojem djelovanju, oni djeluju zajednički i samo tako postižu konačan učinak. ^(22,23)

Kliničku primjenu faktora rasta započelo se već prije više godina upotrebom faktora rasta u hematologiji, kojima se počelo zamijenjivati bolest koštane srži. Kod primjene faktora rasta u centralnom živčanom sustavu postoji nekoliko novih problema. Možda je osnovni problem definirati koji faktori rasta, u koje vrijeme i u kojim kombinacijama mogu djelovati na promociju remijelinizacijskih procesa. Treba naime naglasiti da su dosadašnja iskustva prvenstveno vezana za animalne

modele koje ne možemo u potpunosti poistovjetiti s mehanizmima remijelinizacije u čovjeka. Osnovna je pretpostavka da se proces remijelinizacije odvija putem istih mehanizama kao i mijelinizacija aksona tijekom razvoja centralnog živčanog sustava. Kao što je već naglašeno, to potvrđuje i činjenica da je novonastali mijelin ultrastrukturno, imunohistokemijski i morfološki identičan onom nastalom tijekom razvoja CNS-a. Značajno je također da zreli oligodendrociti u odraslom organizmu imaju receptore za IGF-I, kao i za neke druge vrste faktora rasta. U eksperimentalnim modelima demijelinizacijskih bolesti, izazvanih virusima ili autoimunim mehanizmima, OG koji su se počeli regenerirati imali su najveći broj receptora za IGF-I. ^(27,30,32,40,136,140,141,142,143) IGF-I je jedan od eksperimentalno najčešće ispitivanih faktora rasta, upravo zbog svojih, ranije nabrojanih, karakteristika i utjecaja na mijelinizacijske procese. Već prije 15 godina, u prvim ispitivanjima, korišten je kao posrednik za regeneraciju OG. U navedenim ispitivanjima stanični redovi oligodendroglije uništavani su primjenom specifičnih antitijela i komplemenata. Nakona otprilike tjedan dana oporavka, došlo je do pojave određenog broja OG u kulturama stanica. Dodavanjem IGF-I pojavili su se OG u većem broju (koji je odgovarao broju stanica prije oštećenja), a njihov je oporavak bio značajno ubrzan. Kasnija ispitivanja provodila je grupa autora na čak tri demijelinizacijska modela: intoksikacija kuprizonom, kriogenim oštećenjem OG i eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu. U sva tri modela demijelinizacija je bila praćena pojačanom ekspresijom IGF-I iz hipertrofičnih astrocita u području demijelinizacijskih lezija, što je dokazano in-situ hibridizacijom za mRNA i imunohistološkim bojenjem na IGF-I proteine. Isti astrociti su ekspimirali i IGFBP (protein na koji se veže IGF). Na oštećenim oligodendrocitima bilo je moguće identificirati povećanu aktivnost receptora za IGF-I koja je bila uočena tijekom čitavog razdoblja remijelinizacije i stvaranja novog mijelinskog omotača. Takva opažanja govore u prilog razmišljanju da je

IGF-I ključan faktor tijekom regeneracije OG kao i remijelinizacije nakon oštećenja mijelina. Uloga IGFBP-a nije još sasvim razjašnjena, međutim taj bi nosač proteina mogao služiti kao prijenosnik IGF-a nastalog iz astrocita do njegovih ciljnih receptora na oligodendrocitima u području demijelinizacijske lezije. ^(128,140,141,142)

Tijekom posljednjih godina, osnovni je cilj bio vidjeti da li dodavanjem IGF-aI dolazi do promocije remijelinizacije u kroničnim demijelinizacijskim lezijama. Najčešće ispitivani model bio je EAE u glodavaca. Dvanaest dana nakon izazivanja EAE-a u štakora, dakle u vrijeme pojave kliničke simptomatologije, životinje su bile podijeljene u parove od kojih je jedan dobivao intravenski određene količine IGF-aI, a drugi nije. Životinja koja je dobivala faktor rasta pokazivala je značajno povećanje broja oligodendrocita kao i količine mRNA u tim oligodendrocitima. Štoviše, životinje liječene IGF-om I imale su manji broj demijelinizacijskih lezija koje su bile i manje veličinom. Ultrastrukturne analize pokazale su da je i broj upalnih stanica u tih životinja unutar lezije značajno manji. Nakon 8 dana liječenja, liječene životinje imale su velik broj aksona na kojima se počeo stvarati tanki novi sloj mijelina, znak remijelinizacije, dok su neliječene životinje imale brojne nemijelinizirane aksone unutar lezija. Razlike su postojale i u kliničkoj simptomatologiji. Liječene životinje imale su i manji gubitak na tjelesnoj težini, manje smetnje motorike i koordinacije. Novija ispitivanja pokazala su da bi IGF-I mogao utjecati i na smanjenje propusnosti hematolikvorske barijere, a i modulirati imunološki odgovor, što bi sve moglo povoljno utjecati na tijek bolesti. ^(22,23,136)

Ti rezultati, in vivo, analogni su rezultatima istraživanja koja su rađena in vitro, na kulturama stanica posebno uzgojenih miševa. ⁽²²⁾

Posebno su značajni podaci o počecima kliničke primjene IGF-a I koji pokazuju da je to tvar koja se dobro podnosi i ne daje značajne nuspojave. Također je

primijećeno (doduše u animalnim modelima) da nema razlike u efikasnosti bez obzira da li se IGF primijenjuje intravenski ili subkutano, što svakako može biti i od kliničkog značaja. ^(22,23,108,109,136)

Ipak, treba ponovno naglasiti da je pokušaj terapije samo jednim faktorom rasta možda previše jednostavan pristup liječenju kroničnih demijelinizacijskih bolesti, te da će se vrlo vjerojatno primjena pravilne kombinacije faktora pokazati kao klinički značajno superiornijom. ^(22,23,109)

Okosnica novijih terapijskih pokušaja (za sada u eksperimentalnoj fazi) jest činjenica da aksonski signalni mehanizmi igraju važnu ulogu u diferencijaciji, proliferaciji i preživljenju oligodendrocitnih prekursora i progenitora, posredno ili neposredno. Tijekom samih mijelinizacijskih procesa očigledna je uloga neurona, odnosno vrlo je vjerojatno postojanje određenog sustava kojim će oligodendrocit prepoznati baš akson kao svoju ciljnu stanicu. Dokazano je postojanje antitijela na još nedefiniranu molekulu aksosome koje snažno inhibira mijelinizaciju (in vitro). I na kraju, dodavanje neurona u staničnu kulturu čistih zrelih oligodendrocita višestruko povećava transkripciju za glavne proteinske gene za mijelin. Ukoliko u kulturi nema aksona proizvedeni mijelin je ultrastrukturalno i biokemijski drugačiji od inače zrelog mijelina, a prisustvo neurotoksina također značajno inhibira mijelinizacijske procese. Upravo zbog činjenice da su neuronski signalni mehanizmi neophodni za mijelinizacijske procese, pokušalo ih se pospješiti neurotrofičkim i neuroprotektivnim molekulama. Nekoliko studija je dokazalo da neke molekule s visokim neuroprotektivnim značajkama povećavaju broj mijeliniziranih segmenata na aksonu bez da utječu na povećanje broja oligodendrocita ili samih neurona. Posebno su značajne molekule čije je djelovanje posredovano delta-receptorima na neuronu (receptori koji su podgrupa opioidnim). Ta skupina receptora eksprimirana je u mozgu kao i u nekim drugim tkivima endokrinološkog i imunološkog sustava. Sadrže specifične ligande, a u mozgu se

nalaze gotovo isključivo na neuronima. Njihova uloga za sada nije sasvim poznata, zna se da su endogeni ligandi za steroidne hormone (prvenstveno za progesteron!), ali im eventualna uloga u procesima mijelinizacije nije dokazana. U radu grupe autora koji su u svojim istraživanjima koristili eliprodil, kompleksnu tvar koja je moćan antagonist delta-receptora, ali je ujedno i antagonist NMDA receptora kao i blokator Ca⁺⁺ kanala, uočena je sposobnost te tvari u promociji remijelinizacijskih mehanizama možda i putem neuroprotektivnog učinka na demijelinizirane aksone. Navedena istraživanja pokazuju da je intaktna funkcija neurona neophodna za mijelinizacijske procese, pa je velika vjerojatnost da barem isto toliko potrebna u remijelinizaciji nakon demijelinizacijskih noksi. ^(1,22,23,27,30,32,128,136,140,141,142)

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je na relevantno velikoj skupini ispitanika u kojih je prema danas prihvaćenim kriterijima dokazana multipla skleroza, odrediti koncentracije HR i IGF-a u likvoru i serumu te ih usporediti s kontrolnom skupinom ispitanika u kojih je učinjena likvorska dijagnostika, a kod kojih niti jednom navedenom metodom nema dokaza o postojanju demijelinizacijske bolesti. Danas prihvaćeni kriteriji dokazivanja odnosno opovrgavanja dijagnoze multiple skleroze korišteni u ovom radu obuhvaćaju kliničke i laboratorijske značajke bolesti, potvrđene neuroslikovnim metodama, odnosno magnetnom rezonancijom mozga.

S obzirom na eksperimentalne dokaze prikazane i u in vitro kao i in vivo studijama o važnosti faktora rasta kao i hormona rasta u remijelinizacijskim procesima u demijelinizacijskim bolestima, (poglavito bolesti tipa multiple skleroze), radna je pretpostavka da promjene u koncentracijama IGF-I i hormona rasta u likvoru bolesnika s MS mogu upućivati na tijek bolesti, pa eventualno biti i prognostički faktor za razvoj pojedinog oblika bolesti. Iz objavljenih literaturnih podataka vidljivo je da se u kliničkim istraživanjima pokušalo određivanje IGF-a u serumu i likvoru oboljelih od multiple skleroze, uz kontroverzne rezultate i na relativno malom broju ispitanika. Dodatno je zanimljivo da je određivanje koncentracije hormona rasta (HR) u likvoru pokušano u svega nekoliko navrata, na vrlo heterogenim i malobrojnim skupinama neuroloških bolesnika. Do danas nisu

određene normale za vrijednosti HR u likvoru, niti je pokušana komparacija vrijednosti HR u likvoru oboljelih od MS i kontrolne skupine.

Temeljem navedenog postavljena je slijedeća **hipoteza** :

Vrijednost koncentracije hormona rasta (HR) u likvoru u skupini bolesnika s dokazanom multiplom sklerozom (MS) je značajno niža od vrijednosti HR u likvoru kontrolne skupine u kojih demijelinizirajuća bolest nije dokazana.

Vrijednosti koncentracija HR u serumu, kao i IGF-I u serumu i likvoru ne razlikuju se značajno u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.

Znanstveni doprinos istraživanja

Za očekivati je da bi rezultati ovog rada doprinijeli slijedećim znanstvenim saznanjima:

- a) vrijednosti koncentracija HR i IGF-a u likvoru (dobivenom lumbalnom punkcijom u standardiziranim uvjetima) na kontrolnoj populaciji predstavljali bi doprinos u određivanju normalnih vrijednosti ovih parametara
- b) komparacija vrijednosti koncentracija HR i IGF-a u likvoru bolesnika s MS-om i kontrolne populacije doprinijela bi novim saznanjima o patofiziologiji bolesti
- c) rezultati komparacije vrijednosti ovih supstancija u likvoru i serumu mogli bi doprinijeti novim saznanjima o funkciji hematolikvorske barijere, a možda i o autonomnoj regulaciji sekrecije navedenih neuralnih faktora rasta unutar CNS-a
- d) daljnjim kliničkim praćenjem ovako obrađenih bolesnika moglo bi se utvrditi da li je razina HR-a i IGF-I na početku bolesti indikativna za dinamiku kliničkih manifestacija bolesti u smislu osnovne dihotomije oblika (relaps-remitirajućeg odnosno primarno progresivnog)
- e) navedeni rezultati mogli bi biti iskoristivi u daljnjoj kliničkoj praksi kako u dijagnostičke tako i u terapijske svrhe.

BOLESNICI I POSTUPCI

Uzorak u ovom istraživanju predstavljale su dvije skupine bolesnika hospitaliziranih i obrađenih u Klinici za neurologiju, Kliničkog bolničkog centra «Rebro». Broj bolesnika u eksperimentalnoj skupini bio je 46, a u kontrolnoj skupini 49.

Kriteriji za uključivanje u eksperimentalnu skupinu bili su slijedeći:

- bolesnici oba spola stariji od 15 godina
- bolesnici u kojih je postavljena dijagnoza multiple skleroze. Dijagnoza multiple skleroze postavljena je prema danas prihvaćenim kliničkim i laboratorijskim kriterijima. Klinički kriteriji su: napadaj bolesti koji se očituje nastupom neurološke simptomatologije, odnosno verificiranjem neurološkog deficita koji je trajao najmanje 24 sata, a ustanovio ga je kompetentan ispitivač, uz prisustvo vjerodostojnih anamnestičkih podataka o prethodno najmanje jednoj epizodi neurološke simptomatologije u ranijoj povijesti bolesti također u trajanju od najmanje 24 sata uz spontani oporavak, a laboratorijski nalaz likvora dobivenog lumbalnom punkcijom koji ukazuje na prisustvo oligoklonskih traka i povećano stvaranje imunoglobulina G, uz

uredan nalaz IgG u serumu bolesnika, kao i patološki nalaz evociranih potencijala uz potvrdu demijelinizacijskih lezija na nalazu magnetne rezonancije (pri čemu nalaz mora sadržavati najmanje tri ili više demijelinizacijskih lezija promjera najmanje 3 mm, koje su smještene periventrikularno uz prisustvo infratentorijske demijelinizacijske lezije).⁽¹⁴³⁾

- bolesnici u kojih je dijagnoza postavljena unatrag najviše mjesec dana
- bolesnici u kojih do sada nije primijenjivana nikakva imunomodulacijska terapija u svrhu liječenja osnovne bolesti
- bolesnici koji ne boluju od druge progresivne neurološke bolesti ili sindroma.

Kriteriji za uključivanje u kontrolnu skupinu bili su slijedeći:

- bolesnici oba spola stariji od 15 godina
- bolesnici u kojih je prema danas prihvaćenim kriterijima isključena mogućnost postojanja demijelinizirajuće bolesti
- bolesnici u kojih u posljednjih 24 mjeseca nije primijenjivan niti jedan oblik imunomodulacijske terapije

- bolesnici u kojih je u svrhu rutinske dijagnostičke obrade učinjena analiza likvora dobivenog lumbalnom punkcijom

U obje skupine analizirana je koncentracija hormona rasta i IGF-1 u serumu i likvoru. Objе vrste materijala uzimane su neposredno jedna za drugom, u standardiziranim uvjetima (bolesnik u ležećem položaju, uz poštivanje principa antiseptike). Serum je dobiven iz krvi uzete venepunkcijom kubitalne vene, dok je likvor dobiven lumbalnom punkcijom intervertebralnog prostora na razini L3-L4 ili L4-L5. Materijal je uziman isključivo u jutarnjim satima (između 8 i 9 sati) nakon najmanje 12-satnog razdoblja posta. Materijal u količini od 2-4 ml smrzavan je na -20 st. C neposredno po uzimanju (prema preporuci proizvođača odgovarajućih kitova za izračunavanje koncentracija IGF-I i HR).

Vrijednosti su izračunavane standardiziranim kvantitativnim imunoradiometrijskim (IRMA) testom. Princip testa je upotreba dva poliklonalna antitijela, koja prepoznaju različita vezna mjesta antigena. Jedno je visoko pročišćeno monospecifično radio-ionizirano ovčje IgG antitijelo, a drugo je imobilizirano ovčje antitijelo povezano u paru s antitijelom zeca (kojim je presvučena stijenka epruvete). Tijekom faze inkubacije, oba antitijela reagiraju s traženim molekulama (HR, IGF-1) u uzorku, i oblikuju kompleks takozvanog «tipa sendviča» koji se veže za stijenku epruvete. Nakon dvostrukog ispiranja,

izmjerena radioaktivnost u epruveti direktno je proporcionalna koncentraciji HR/IGF-1 uzorka. Dobivene vrijednosti izražavane su u mIU/l (prema izračunu : $1 \text{ ng/ml} = 2 \text{ mIU/l}$ – standard MRC 66/217). Prije početka izračunavanja uzorci su odmrznuti na sobnu temperaturu i lagano promiješani, te potom pipetirani 25 mikrol standardnog uzorka, referentnog kontrolnog uzorka i uzorka bolesnika u odgovarajuće označene epruvete. U svaku epruvetu potom je dodano 200 mikrolitara 125I hGH odnosno IGF-I otopine označenih antitijela. Sadržaj se izmiješao na vorteksu, te se mješavina održavala 18 sati na sobnoj temperaturi. Po isteku navedenog vremena epruvete su se ispirale s vodenim puferom koji se u potpunosti aspirirao. Vrijednosti su se izračunavale brojanjem u gama brojaču.

Izračunata osjetljivost testa je definirana kao +2 standardne devijacije u odnosu na nulti standard od 0.25 mIU/l. ⁽¹⁴⁴⁾

Dobiveni rezultati opisani su deskriptivnim mjerama i grafički. U analizi se ovisno o prirodi distribucija ispitivanih obilježja (Smirnow-Kolmogorovljev test), primijenio primjereni parametrijski (Studentov t-test za neovisne uzorke), odnosno neparametrijski (Mann-Whitneyev) test usporedbe između ispitanika. Razlike dobivenih vrijednosti između skupina statistički su se analizirale na razini značajnosti od 5%.

Distribucije izmjerenih vrijednosti istraživanih varijabli opisane su deskriptivnim statističkim metodama. Izračunati su parametri distribucija za kvantitativne varijable (dob, hormon rasta u krvi, hormon rasta u cerebrospinalnom likvoru, IGF-I u krvi te IGF-I u cerebrospinalnom likvoru). Za testiranje normalnosti distribucija izmjerenih vrijednosti kvantitativnih varijabli primijenjen je Kolmogorov-Smirnov test.

Razlike u vrijednostima kvantitativnih varijabli između dviju skupina ispitanika testirane su Studentovim t-testom i Mann-Whitney testom, kako zbog veličine uzoraka, tako i zbog toga što distribucije istraživanih varijabli nisu uvijek slijedile normalnu raspodjelu.

Razlike u distribuciji spola u dvije ispitivane skupine testirane su χ^2 -testom.

Za analizu povezanosti kvantitativnih varijabli izračunati su Spearmanovi koeficijenti rang korelacije.

REZULTATI

U istraživanju su ispitivane dvije skupine ispitanika: 46 bolesnika koji boluju od multiple skleroze i 48 kontrolnih ispitanika.

Bolesnici koji boluju od multiple skleroze bili su statistički značajno mlađi od ispitanika kontrolne skupine. Parametri distribucije dobi u dvije ispitivane skupine prikazani su u tablici 1. Premda su distribucije dobi slijedile normalnu raspodjelu u obje skupine ispitanika, budući se radi o manjem uzorku ispitanika, za testiranje razlika primijenjeni su i parametrijski t-test i neparametrijski Mann-Whitney test čiji se rezultati slažu.

Distribucija spola također se prema rezultatu χ^2 -testa statistički značajno razlikuje u dvije ispitivane skupine, što je prikazano u tablici 2. U skupini bolesnika koji boluju od multiple skleroze bio je veći udio žena, dok je u kontrolnoj skupini zabilježen veći udio muškaraca.

Tablica 1.

Parametri distribucije dobi (u godinama) u dvije ispitivane skupine

	BOLESNICI	KONTROLA
N	46	48
\bar{x}	27,09	51,17
St.dev.	5,66	12,79
Minimum	17	37
Maksimum	29	75
Q ₁	23,0	40,5
Medijan	27,0	50,0
Q ₃	32,0	63,0
Kolmogorov-Smirnov	K-S d = 0,091 p>0,20	K-S d = 0,114 p>0,20
t-test	t=-11,71 df=92 p<0,001	
Mann-Whitney test	U=52,000 Z=-7,957 P<0,001	

Tablica 2. Distribucija spola u dvije ispitivane skupine

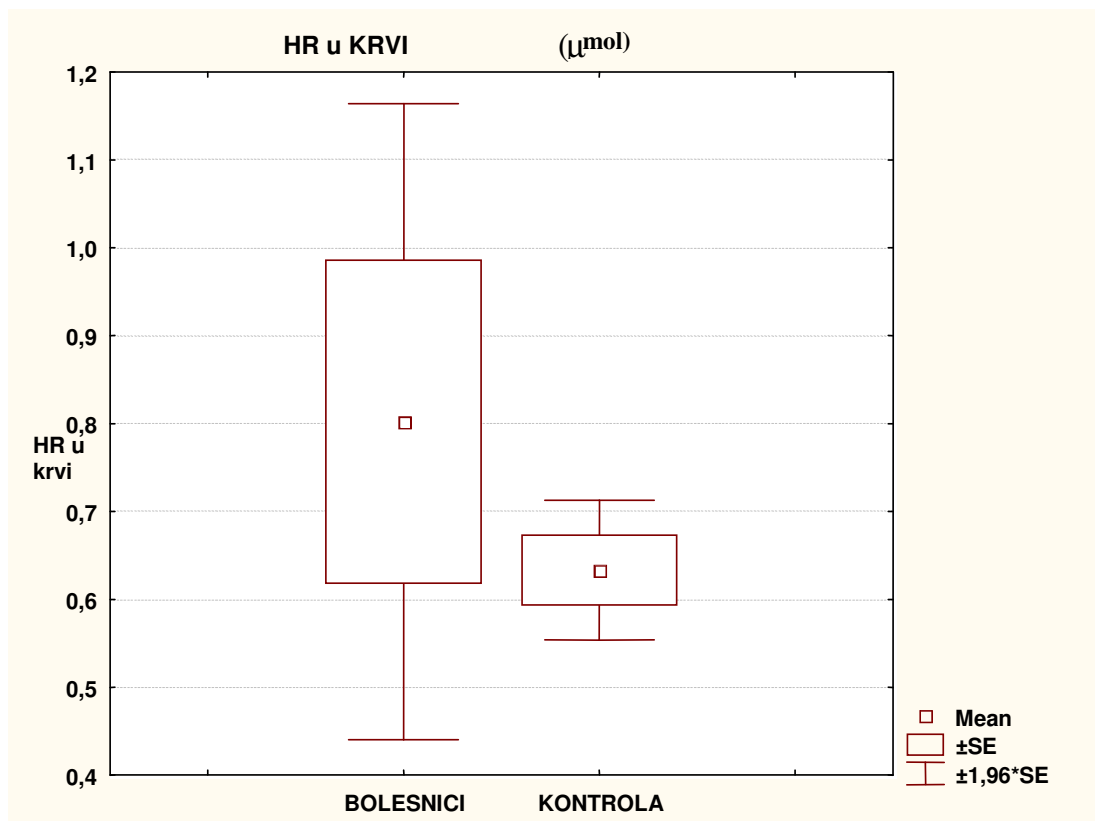
	BOLESNICI	KONTROLA	Ukupno
ŽENE	33 (71,84%)	19 (39,58%)	52
MUŠKARCI	13 (28,26%)	29 (60,42%)	42
Ukupno	46 (100,00%)	48 (100,00%)	94
χ^2 -test	$\chi^2=9,826$ df = 1 p=0,0017		

U tablici 3. prikazani su parametri distribucije vrijednosti hormona rasta u krvi. Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima hormona rasta u krvi izmjerenim u skupini bolesnika koji boluju od multiple skleroze u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Kako distribucija hormona rasta u krvi bolesnika koji boluju od multiple skleroze nije slijedila normalnu raspodjelu za testiranje razlika primijenjeni su i parametrijski t-test i neparametrijski Mann-Whitney test čiji rezultati se slažu. Slika 1. prikazuje distribucije hormona rasta u krvi u skupinama bolesnika koji boluju od multiple skleroze i ispitanika kontrolne skupine.

Tablica 3.

Parametri distribucije vrijednosti hormona rasta u krvi (μmol) u dvije ispitivane skupine

	BOLESNICI	KONTROLA
N	46	48
\bar{x}	0,80	0,63
St.dev.	1,25	0,28
Minimum	0,00	0,00
Maksimum	8,00	1,40
Q ₁	0,40	0,40
Medijan	0,60	0,60
Q ₃	0,80	0,80
Kolmogorov-Smirnov	K-S d = 0,363 P<0,01	K-S d = 0,151 p>0,20
t-test	t=-0,91 df=92 p=0,365	
Mann-Whitney test	U=1042,000 Z=-0,469 P=0,639	



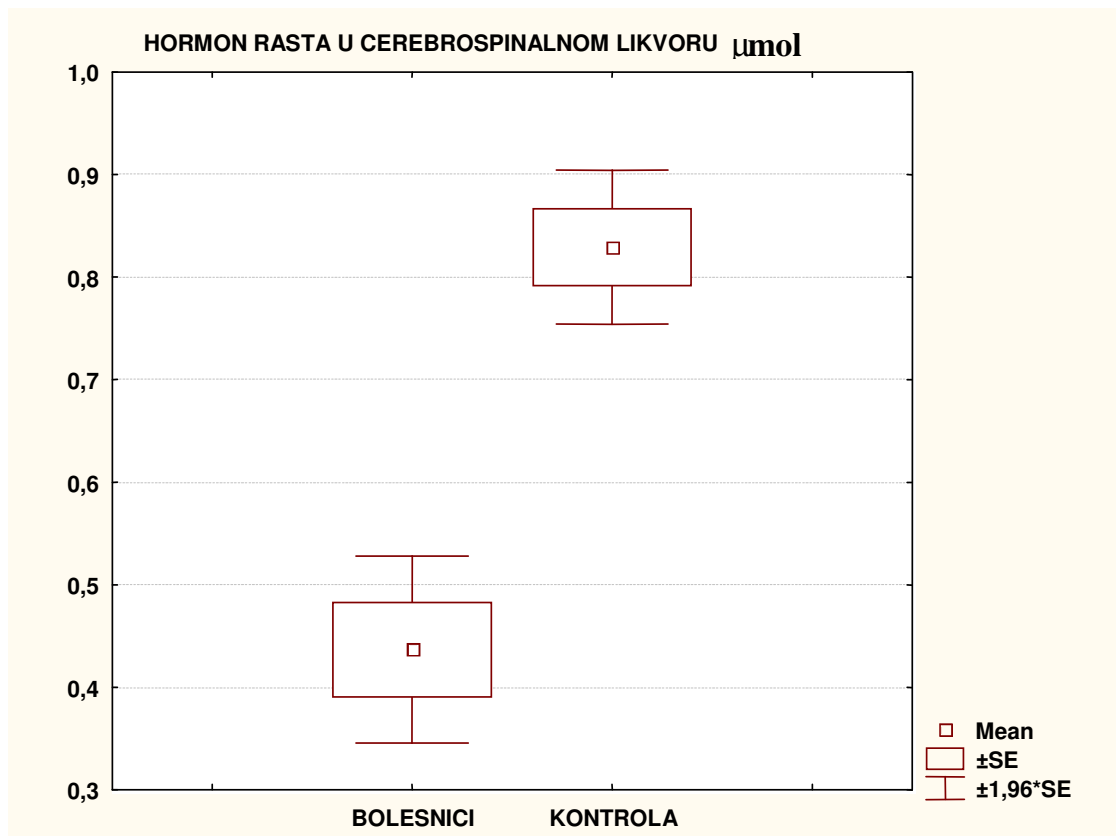
Slika 1. Distribucija hormona rasta u krvi u dvije ispitivane skupine

U tablici 4. prikazani su parametri distribucije vrijednosti hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru. Vrijednosti hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru su statistički značajno niže u skupini bolesnika koji boluju od multiple skleroze u odnosu na vrijednosti hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru u kontrolnoj skupini ispitanika. Premda su distribucije hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru slijedile normalnu raspodjelu, budući se radi o manjem uzorku ispitanika, za testiranje razlika primijenjeni su i parametrijski t-test i neparametrijski Mann-Whitney test čiji rezultati se slažu. Slika 2. prikazuje razlike u distribuciji hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru između bolesnika i ispitanika kontrolne skupine.

Tablica 4.

Parametri distribucije vrijednosti hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru (μmol) u dvije ispitivane skupine

	BOLESNICI	KONTROLA
N	46	48
\bar{x}	0,44	0,83
St.dev.	0,32	0,26
Minimum	0,00	1,00
Maksimum	0,00	1,20
Q ₁	0,30	0,70
Medijan	0,40	0,90
Q ₃	0,70	1,00
Kolmogorov-Smirnov	K-S d = 0,156 P>0,20	K-S d = 0,80 P<0,10
t-test	t=-6,53 df=92 p<0,001	
Mann-Whitney test	U=375,500 Z=-5,510 P<0,001	



Slika 2. Distribucija hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru u dvije ispitivane skupine

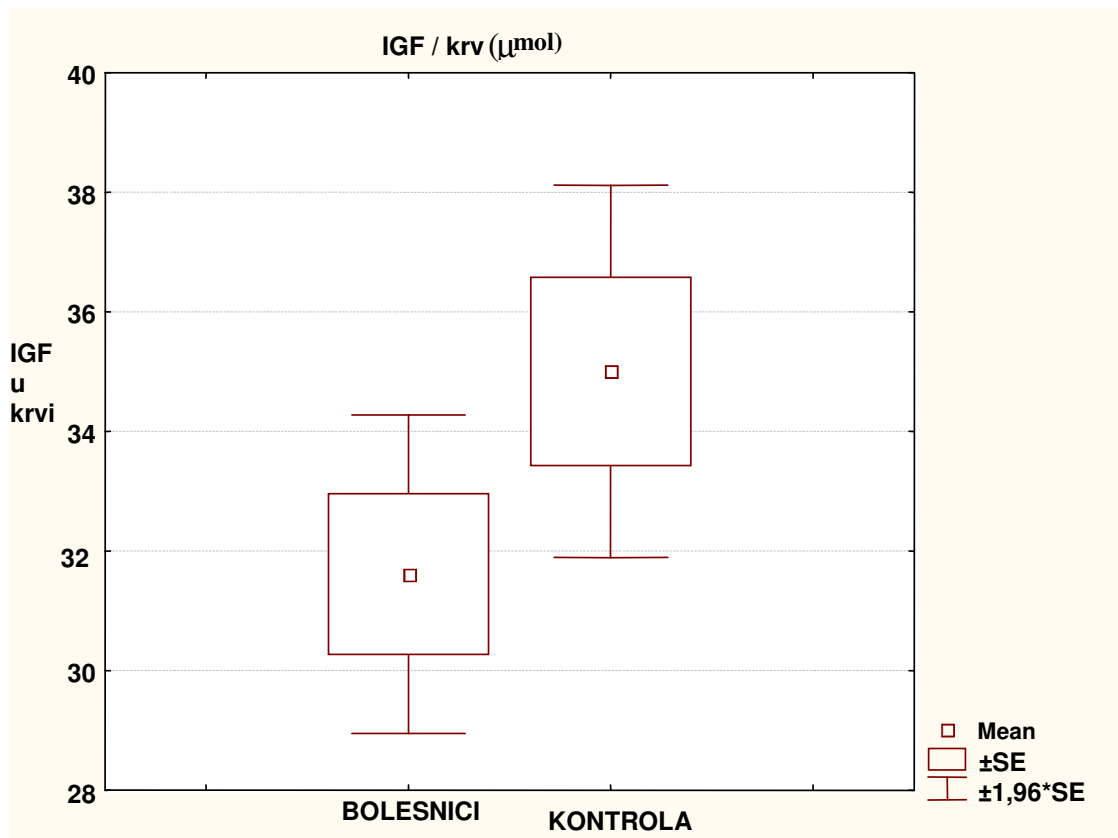
U tablici 5. prikazani su parametri distribucije vrijednosti IGF u krvi. Kako distribucija IGF u krvi bolesnika nije slijedila normalnu raspodjelu za testiranje razlika primijenjeni su i parametrijski t-test i neparametrijski Mann-Whitney test čiji se rezultati razlikuju. Prema rezultatu Mann-Whitney testa vrijednosti IGF u krvi statistički su značajno niže od vrijednosti IGF u krvi ispitanika kontrolne skupine. Prema rezultatu t-testa razlika u vrijednostima IGF-a u krvi između dvije skupine ispitanika nije statistički značajna. Slika 3. prikazuje razlike u distribuciji IGF u krvi između bolesnika i ispitanika kontrolne skupine.

.

Tablica 5.

Parametri distribucije vrijednosti IGF u krvi (μmol) u dvije ispitivane skupine

	BOLESNICI	KONTROLA
N	46	48
\bar{x}	31,62	35,01
St.dev.	9,22	11,01
Minimum	21,00	13,20
Maksimum	64,80	77,60
Q ₁	27,00	27,85
Medijan	29,50	33,55
Q ₃	32,70	39,10
Kolmogorov-Smirnov	K-S d = 0,262 P<0,01	K-S d = 0,155 P<0,20
t-test	t=-1,62 df=92 p=0,109	
Mann-Whitney test	U=780,000 Z=-2,451 P=0,014	



Slika 3. Distribucija IGF u krvi u dvije ispitivane skupine

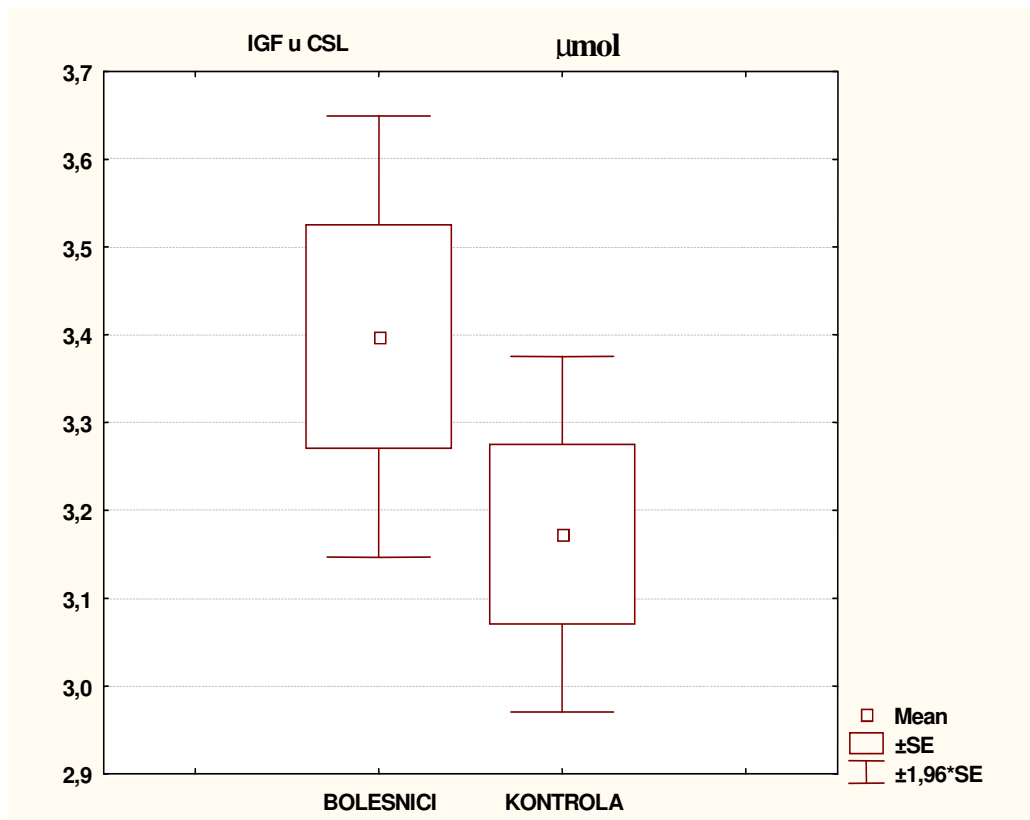
U tablici 6 prikazani su parametri distribucije vrijednosti IGF u cerebrospinalnom likvoru. Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima IGF u cerebrospinalnom likvoru izmjerenim u skupini bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Premda su distribucije IGF u cerebrospinalnom likvoru slijedile normalnu raspodjelu, budući se radi o manjem uzorku ispitanika, za testiranje razlika primijenjeni su i parametrijski t-test i neparametrijski Mann-Whitney test čiji rezultati se slažu.

Tablica 6.

Parametri distribucije vrijednosti IGF u cerebrospinalnom likvoru (μmol) u dvije ispitivane skupine

	BOLESNICI	KONTROLA
N	46	48
\bar{x}	3,40	3,17
St.dev.	0,87	0,71
Minimum	2,00	2,10
Maksimum	5,80	5,70
Q ₁	2,70	2,70
Medijan	3,60	3,00
Q ₃	4,00	3,40
Kolmogorov-Smirnov	K-S d = 0,145 P>0,20	K-S d = 0,193 P<0,10
t-test	t=1,371 df=92 p=0,174	
Mann-Whitney test	U=920,500 Z=1,388 P=0,165	

Slika 4. prikazuje razlike u distribuciji IGF u cerebrospinalnom likvoru između bolesnika koji boluju od multiple skleroze i ispitanika kontrolne skupine.



Slika 4. Distribucija IGF u cerebrospinalnom likvoru u dvije ispitivane skupine

Tablica 7.

Spearmanovi koeficijenti korelacije u skupini bolesnika

	Dob	HR u krvi	HR u CSL	IGF u krvi	IGF u CSL
Dob	1,000000	0,204854	0,032212	0,210628	0,122788
HR u krvi	0,204854	1,000000	0,218565	0,299870*	0,279819
HR u CSL	0,032212	0,218565	1,000000	0,061777	-0,103851
IGF u krvi	0,210628	0,299870*	0,061777	1,000000	-0,074592
IGF u CSL	0,122788	0,279819	-0,103851	-0,074592	1,000000

* p<0,05

Tablica 8.

Spearmanovi koeficijenti korelacije u kontrolnoj skupini

	Dob	HR u krvi	HR u CSL	IGF u krvi	IGF u CSL
Dob	1,000000	-0,167860	- 0,288449*	-0,001440	0,233426
HR u krvi	-0,167860	1,000000	0,168302	-0,114075	0,073403
HR u CSL	- 0,288449*	0,168302	1,000000	0,317699*	0,089276
IGF u krvi	-0,001440	-0,114075	0,317699*	1,000000	-0,027674
IGF u CSL	0,233426	0,073403	0,089276	-0,027674	1,000000

* p<0,05

U tablicama 7 i 8 prikazani su Spearmanovi koeficijenti korelacije između ispitivanih varijabli u dvije skupine ispitanika. U skupini bolesnika nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između hormona rasta u krvi i IGF u krvi. U kontrolnoj skupini nađena je statistički značajna negativna korelacija između hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru i dobi te pozitivna korelacija između hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru i IGF u krvi. Budući negativna korelacija ukazuje na to da kako raste dob tako vrijednost hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru pada možemo zaključiti da to još više potvrđuje razliku u vrijednostima hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru između dvije ispitivane skupine. Naime, kontrolna skupina je statistički značajno starije dobi od skupine bolesnika koji boluju od multiple skleroze. Kako je razina hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru u negativnoj korelaciji s dobi bilo bi za očekivati da su vrijednosti hormona rasta u cerebrospinalnom likvoru u mlađoj skupini, dakle u skupini bolesnika koji boluju od multiple skleroze, veće u odnosu na vrijednosti izmjerene u starijoj, kontrolnoj skupini ispitanika.

Tablica 9.

Statistička značajnost razlika u vrijednostima izmjerenih varijabli između muških i ženskih ispitanika u skupini bolesnika

	U	Z	p-level
Dob	149,000	-1,598	0,110
HR u krvi	158,000	-1,378	0,168
HR u CSL	179,000	-0,866	0,386
IGF u krvi	164,500	-1,220	0,223
IGF u CSL	203,500	-0,268	0,788

Tablica 10.

Statistička značajnost razlika u vrijednostima izmjerenih varijabli između muških i ženskih ispitanika u kontrolnoj skupini

	U	Z	p-level
Dob	197,500	1,644	0,100
HR u krvi	272,500	-0,063	0,950
HR u CSL	243,000	0,685	0,493
IGF u krvi	227,500	1,012	0,312
IGF u CSL	235,500	0,843	0,399

Niti u jednoj od ispitivanih skupina ispitanika nisu nađene za spol vezane razlike u vrijednostima dobi, hormona rasta u krvi i cerebrospinalnom likvoru, kao i IGF u krvi i u cerebrospinalnom likvoru. Budući se radilo o malim uzorcima u kojima neke od varijabli nisu slijedile normalnu raspodjelu značajnosti razlika testirane su neparametrijskim Mann-Whitney testom.

RASPRAVA

Rezultati ovog rada ukazali su na statistički značajnu razliku u koncentracijama hormona rasta u likvoru između dvije ispitivane populacije. Vrijednosti hormona rasta u likvoru bolesnika bile su značajno niže od vrijednosti tog hormona u likvoru kontrolne skupine. Koncentracija hormona rasta u serumu u skupini bolesnika bila je viša od koncentracije HR u serumu kontrolne skupine, međutim ta razlika nije bila statistički značajna. Nadalje, koncentracija IGF-I u likvoru bolesnika bila je viša, a u serumu bolesnika niža od koncentracija kontrolne skupine, međutim te razlike također nisu bile na statistički značajnoj razini.

Ustanovljeni statistički značajan deficit hormona rasta u skupini bolesnika implicira ulogu somatotropinskog sustava u patogenezi demijelinizacijskih bolesti. Porijeklo hormona rasta u likvoru, prema današnjim saznanjima, može biti dvojako. Zaključivanje o pituitarnom ili neurogenom porijeklu hormona rasta prelazi okvire ovog istraživanja, međutim kako najnoviji podaci upućuju na neurogeno porijeklo HR u likvoru, ovi se rezultati mogu interpretirati u svjetlu zatajenja neurogenih mehanizama sekrecije HR. U prilog normalnoj funkciji pituitarne žlijezde ispitivanih skupina govore i vrijednosti HR u serumu koje su unutar normalnih, odnosno u skupini bolesnika se statistički značajno ne razlikuju od vrijednosti kontrolne skupine. Treba naglasiti da su vrijednosti HR u serumu u skupini bolesnika doduše ukupno gledajući više (iako ne do razine statističke značajnosti) ali da je to i očekivano, budući da je ta skupina značajno mlađe životne dobi pa je navedena razlika fiziološka.

Neurogeni HR neophodno je potreban u razvojnoj fazi glija stanica kao i kasnije tijekom mijelinizacije. Manjak HR ustanovljen u skupini bolesnika može stoga biti višestruko značajan.

Jedna od mogućih posljedica deficita hormona rasta jest poremećaj u razvoju oligodendroglije. Budući da hormon rasta izravno utječe na diferencijaciju prekursora glija stanica u zreli oligodendrocit, manjak HR bi već u toj fazi mogao dovesti do razvoja patomorfološki nesavršenog odnosno manjkavog oligodendrocita. Takva stanica predstavlja opasnost za centralni živčani sustav u više aspekata. Prvenstveno može biti nesposobna za kodiranje odgovarajućeg proteinskog genoma tijekom mijelinizacije, te “proizvoditi” neadekvatan mijelin. Ultrastrukturno promijenjeni mijelin (kao prvenstveno proteinska supstanca) može lako biti pokretač autoimunog odgovora. Nadalje, takav slabije ili nedovoljno diferencirani oligodendrocit, kao prirodni nosioc GalC-antitijela, lako i sam predstavlja autoantigen čime također može izazvati autoimunu reakciju unutar centralnog živčanog sustava uz još potpuno intaktnu hematoliquorsku barijeru. Nije isključena niti indukcija apoptotičke aktivnosti takvog nesavršenog oligodendrocita, kojeg organizam prepoznaje kao funkcionalno neupotrebljivog. Moguće je da kod značajnijeg manjka hormona rasta djeluju sva tri nabrojena mehanizma, te dovode do klinički najtežih oblika bolesti. U svakom slučaju, opisani bi mehanizmi mogli biti kodačić u mehanizmu indukcije inicijalnih demijelinizacijskih noksi, a i odgovorni za progresivan gubitak oligodendroglije čime je remijelinizacija praktički onemogućena. Uočene patohistološke promjene unutar plakova (ali i u udaljenim područjima, gdje još nema nikakvih znakova demijelinizacije!) koje ukazuju na oligodendropatiju kod nekih oblika bolesti, mogle bi se, barem djelomično, objasniti i na ovaj način.

Ukoliko i zanemarimo opisanu mogućnost razvoja patogenetskih mehanizama za inicijalnu demijelinizaciju i pretpostavimo neki drugačiji način, ustanovljeni manjak hormona rasta sasvim će sigurno imati izravnu implikaciju u nedovoljnoj remijelinizaciji. Dokazano je naime da sama demijelinizacija nije osnovni čimbenik razvoja bolesti. Bolest, odnosno klinički deficit, razvija se uslijed izostanka

adekvatnih remijelinizacijskih mehanizama. Hormon rasta pospješuje mijelinizaciju izravno i putem indukcije sekrecije IGF-I, a djeluje i antiapoptotički u smislu sprečavanja apoptoze glijalnog i neuralnog staničnog reda. Nedostatna remijelinizacija kao i ubrzani proces apoptoze oligodendrocita mogu dovesti do poremećaja homeostaze u demijeliniziranom području. Inače uravnotežen odnos pro- i antiapoptotičkih čimbenika koji rezultira isključivo ograničavanjem demijelinizacijskog područja do sanacije, sada je poremećen u korist stvaranja ireverzibilnog ožiljka. Osnovni stanični elementi koji se nalaze unutar ožiljka su hipertrofični astrociti. Poznato je da oni luče i medijatore upale odnosno citokine. Moguće je stoga da takav hipertrofični astrocit ne samo da onemogućava remijelinizaciju na području koje zauzima, već dovodi i do razvoja patoloških mehanizama koji dokazano mogu širiti područja demijelinizacije.

Korelat kliničkog deficita u multiploj sklerozi jest veličina područja dokazanog manjka neurona. Kako je uočeno da neuroni u demijelinizacijskim noksama umiru apoptotičkom smrću, nameće se pitanje da li je to umiranje posljedica deafferentacije ili nedostatka antiapoptotičkih čimbenika. Ukoliko se dokaže druga pretpostavka, u ovom radu uočeni manjak neurogenog hormona rasta mogao bi također biti jedan od etiopatogenetskih mehanizama neuronalne smrti. Treba napomenuti da su naši bolesnici bili likvorski obrađeni u ranoj fazi bolesti, kada još ne postoji ekscesivni gubitak aksona, pa samim time ni denervacijskim mehanizmom pokrenuta programirana stanična smrt neurona.

Već je spomenuto da je dokazano djelovanje hormona rasta kako na razvojne procese glije, tako i na mijelinizacijske mehanizme izravno, ali i neizravno putem indukcije sekrecije somatomedina. Poglavitno se to odnosi na IGF-I čiji je glavni postnatalni regulator upravo hormon rasta. Zanimljiva je činjenica da su receptori ta dva sustava identični. Kako je, zbog važnosti procesa koje somatotropinsko-somatomedinski sustav regulira, malo vjerojatno da je način djelovanja na

zajednički receptor kompetitivan, nameće se mogućnost postojanja dvije različite podjedinice na navedenom receptoru. Moguće je da putem jedne hormon rasta djeluje izravno, dok je druga namijenjena djelovanju IGF-I u istim procesima, što govori u prilog logičnom sinergističkom djelovanju ovih sustava. Nadalje, zanimljiv je i neuroanatomski aspekt pojavnosti navedenih receptora. Poznato je da ih je najveći broj u području pleksusa korioideusa, a isto tako da ih je brojčano značajno više u žena. Kako znamo da su demijelinizacijske lezije prvenstveno smještene periventrikularno, a isto tako da je klinička manifestacija bolesti značajno češća u žena, teško da je povezanost ovih pojava slučajna. Smatra se da povećani broj receptora u području pleksusa korioideusa služi aktivnom transportu HR i IGF-I iz likvorskih prostora u slučaju potrebe. Ukoliko likvor možemo smatrati “spremnikom” raspadnih produkata CNS-a, ali i neophodnih tvari za centralni živčani sustav u slučaju nužde, moguće je da u slučaju hitne potrebe za hormonom i faktorima rasta povećani broj receptora u pleksusu korioideusu služi prijenosu “rezervi” dok se autogenom regulacijom ne proizvedu dovoljne količine supstancije koja manjka. Ukoliko su te rezerve nedostatne zbog primarno oslabljene neurogene apokrine sekrecije HR a time i IGFa-I, moguće je da su to ujedno i najvulnerabilnija mjesta za razvoj konačnih demijelinizacijskih plakova.

Naravno da je ovakovo razmišljanje spekulativno, te da ne može u potpunosti objasniti problem. Opisana neuroanatomska i spolno ovisna raspodjela receptora stoga predstavlja izazov za daljnja istraživanja.

Poznato je da, ukoliko sam centralni živčani sustav ne može osigurati dovoljne količine potrebne tvari, poseže za somatskim rezervama. Ovo bi pravilo donekle moglo protumačiti uočene razlike u koncentracijama u IGFu-I u serumu i likvoru ispitivanih skupina. Treba naglasiti da niti u dosadašnjim ispitivanjima u literaturi nije dokazana statistički značajna razlika u koncentracijama ovog faktora rasta u serumu i/ili likvoru između ispitivanih skupina. U ovom radu ta razlika također nije

na statistički značajnoj razini, ali je ipak očigledna. Vrijednosti IGF-I u serumu bolesnika su naime niže (31,62 +/- 9,22) od vrijednosti IGF-I u serumu kontrolne skupine (35,01 +/- 11,01). Nasuprot tome u likvoru je upravo obratno (3,40 +/- 0,87 prema 3,17 +/- 0,71). Iako nepostojanje statističke značajnosti razlika ne dopušta donošenje zaključaka na temelju ovih rezultata, ipak je moguće iznijeti određene pretpostavke. Najintrigantnija je možda ona da je uzrok ovim razlikama upravo dokazani deficit neurogenog hormona rasta u skupini bolesnika. Naime u trenutku pojačane potrebe za djelovanjem somatotropinsko-somatomedinskog sustava (razvoj demijelinizacije) dolazi do pokušaja mobilizacije somatskih rezervi, u ovom slučaju IGFa-I. Moguće je da se tada potencira aktivni transport te molekule kroz hematolikovsku membranu. Koncentracija IGFa-I u serumu u tom slučaju pada, dok istovremeno koncentracija IGFa-I u likvoru raste. Taj porast ipak nije dovoljan za normalno funkcioniranje remijelinizacijskih i antiapoptotičkih mehanizama, ali može predstavljati pokušaj djelovanja kompenzatornih mehanizama. Navedene razlike možda nisu statistički značajne upravo zbog toga što ovi kompenzatorni mehanizmi nisu dovoljni. Druga mogućnost je naravno i relativno mali broj ispitanika, iako se ne smije isključiti niti vjerojatnost da je ovaj rezultat slučajan.

Dokazano niža koncentracija HR u likvoru bolesnika zasigurno je jedan od kamenčića u mozaiku saznanja o etiopatogenezi demijelinizacijskih bolesti. Mišljenje da se u različitim kliničkim oblicima bolesti do sada nazvanih jednim imenom, tj. "multipla skleroza", u stvari radi o etiopatogenetski različitim entitetima danas prevladava sve više. Iako je početna noksa, naime nastala demijelinizacija, zajednički nazivnik svih oblika bolesti, razvoj bolesti je uvelike drugačiji. U osnovi možemo razlikovati dvije glavne skupine – skupinu oboljelih kod kojih gotovo da i nema mogućnosti remijelinizacije i skupinu kod kojih su remijelinizacijski mehanizmi u većoj ili manjoj mjeri ipak očuvani.

Dokazani deficit hormona rasta u ovom radu rađen je na skupini oboljelih kod kojih u ispitivanoj fazi bolesti još nije bilo dovoljno kliničkih podataka da bi se mogao definirati oblik bolesti svakog pojedinog bolesnika. Nadalje, brojčano je ispitivana skupina premala, da bi podjela na podskupine mogla rezultirati statistički značajnim podacima. Ipak, dokazani deficit hormona rasta podloga je daljnjem praćenju svakog pojedinog bolesnika te omogućava eventualnu usporedbu vrijednosti HR u početku bolesti i pojedinih kliničkih oblika bolesti.

U svjetlu dosadašnjih spoznaja moguće je pretpostaviti da klinički najprogresivniji oblici imaju i najizraženiji deficit hormona rasta, vjerojatno prisutan već u prenatalnom razdoblju, odnosno razdoblju razvoja glija stanica. Kao što je već ranije objašnjeno, tada bi unutar CNS-a bila raširena područja “manje vrijednih” oligodendrocita (što se poklapa s histopatološkim nalazom oligodendropatskih promjena unutar bijele tvari) čime je remijelinizacija od samog početka praktički nemoguća. Područja demijelinizacije se tako mogu ubrzano širiti zahvaljujući začaranom krugu autoimunih, proapoptičkih i ožiljnih reakcija, bez prisustva prirodnih obrambenih mehanizama somatotropinsko-somatomedinskog sustava. Koliko su takvi oblici bolesti genetski determinirani (čemu u prilog govore i epidemiološke studije) potrebno je još dodatno istražiti.

U skupini bolesnika u kojih su remijelinizacijski mehanizmi donekle sačuvani i bolest ima sasvim drugačiji tijek. U većine bolesnika iz ove skupine u početku bolesti već vrlo brzo nastupa gotovo potpuna regresija simptomatologije i bez primjene ikakve terapije. Zbog toga bolest u svojoj početnoj fazi često nije niti prepoznata. Manjak hormona i faktora rasta u toj skupini mogao bi dovesti kasnije do postupne progresije kliničke slike, ali je djelovanje navedenog sustava ipak, u velikom broja bolesnika dovoljno za održavanje barem djelomičnih remijelinizacijskih mehanizama. U velikom broju bolesnika zadovoljavajući remijelinizacijski mehanizmi funkcioniraju dugi niz godina. U tom svjetlu je

zanimljiv i pad vrijednosti koncentracije hormona rasta u serumu i likvoru u odnosu na višu životnu dob. Fiziološka je činjenica da je koncentracija HR u serumu niža što je osoba starija. U ovom je radu uočen pad koncentracije hormona rasta i u likvoru usporedo s porastom životne dobi u obje ispitivane populacije. U skupini oboljelih, dakle osoba s mogućim prirođenim manjkom hormona rasta, taj bi pad mogao dovesti do onih kritičnih vrijednosti kada remijelinizacijski mehanizmi počinju zatajivati što bi moglo objasniti sekundarnu progresiju bolesti. Činjenica da je u ovom radu dokazana statistički značajna razlika u koncentracijama hormona rasta u likvoru između dvije ispitivane populacije mogla bi imati i prognostički značaj. Posebno bi zanimljivo bilo dodatno praćenje skupina bolesnika kroz određeno vremensko razdoblje koje bi bilo dovoljno za definiranje kliničkog oblika njihove bolesti. Vrijednosti hormona rasta u tih bolesnika tada bi se trebale promatrati odvojeno između skupina s različitim kliničkim oblicima bolesti. Moguće je da bi rezultati ukazivali na značajne razlike u vrijednostima koncentracija HR u likvoru između skupina. Takav bi nalaz mogao biti još jedan od dokaza da pojedini klinički oblici nisu podtipovi multiple skleroze već da su etiopatogenetski različite vrste demijelinizacijskih bolesti. U tom bi slučaju, u samom početku bolesti izmjerene vrijednosti koncentracija HR u likvoru mogle imati dijagnostičku vrijednost koja bi upućivala na određeni oblik bolesti. Takav bi nalaz imao i prediktivni značaj glede prognoze za svakog pojedinog bolesnika. Podaci o vrijednostima hormona rasta u likvoru kontrolne skupine predstavljaju dodatne podatke za eventualno određivanje normala. Dosadašnja saznanja o koncentraciji hormona rasta u likvoru vrlo su oskudna i temelje se na relativno malom broju bolesnika heterogenih neuroloških dijagnoza. Zajednička karakteristika navedenih skupina u dosadašnjim istraživanjima bila je činjenica da se radi o bolesnicima u kojih nije bilo kliničkih, radioloških niti seroloških znakova bolesti pituitarne žlijezde. Vrijednosti HR u tih bolesnika kretale su se između 0,35

i 0,43 ng/ml. Prema rezultatima ovog rada srednja vrijednost koncentracija HR u likvoru iznosi 0,83 (+/- 0,26). Te su vrijednosti nešto više od onih u serumu (0,63 +/- 0,28) iako ta razlika nije statistički značajna. Materijal za analizu u ovom je radu uziman u standardiziranim uvjetima, u isto doba dana za svakog bolesnika, čime su se pokušale izbjeći eventualne dnevne oscilacije u vrijednostima koje bi mogle utjecati na konačni rezultat. Vrijednosti HR u serumu dobivene u ovom radu odgovaraju prihvaćenim normalnim vrijednostima.

Činjenica je da je nekoliko bolesnika iz obje skupine imalo nemjerljive vrijednosti HR u serumu što nije neuobičajeno ukoliko se isti određuje bez nekih od metoda provokacije (hiperinzulinska hipoglikemija, pojačana fizička aktivnost,...). Međutim u tih istih ispitanika vrijednosti HR u likvoru bile su detektibilne. Ovakav nalaz nameće i razmišljanje o eventualnim fluktuacijama koncentracija hormona rasta u likvoru. Postavlja se pitanje da li su vrijednosti HR u likvoru jednako podložne dnevnom bioritmu, odnosno da li se “pikovi” povišenih vrijednosti uočeni tijekom 24 sata u serumu mogu očekivati i u likvoru? Poznavajući principe održavanja homeostaze u fiziološkim uvjetima unutar centralnog živčanog sustava može se pretpostaviti da velike varijacije u koncentracijama hormona rasta u likvoru nisu izvjesne. Moguće je da je razina HR u likvoru daleko stabilnija i manje podložna utjecajima drugih hormonskih sustava nego što je to razina HR u serumu. Deficit somatotropinskog sustava, odnosno dokazani manjak hormona rasta u likvoru u skupini bolesnika nameće i dodatne terapijske mogućnosti. U slučaju daljnje potvrde ovog rezultata, postavlja se naime pitanje korisnosti terapijske primjene hormona rasta. Preparati HR već su više godina u kliničkoj primjeni što otvara mogućnost ispitivanja njihove primjene i u ovoj indikaciji. U nekim je radovima dokazano da subkutano davanje hormona rasta dovodi i do njegovog višestrukog porasta u likvoru. Stoga bi takva već uvriježena primjena hormona rasta mogla biti korisna i u bolesnika s demijelinizacijskim bolestima. Naravno da

su za konačnu odluku o terapijskoj primjeni hormona rasta u tih bolesnika potrebna dodatna saznanja o ulozi somatotropinsko-somatomedinskog sustava u patofiziologiji demijelinizacijskih bolesti.

ZAKLJUČCI

1. Ispitivanje vrijednosti koncentracija HR i IGF-I u serumu i likvoru oboljelih od demijelinizacijske bolesti tipa multiple skleroze i kontrolne skupine ispitanika ukazalo je da između te dvije populacije postoje značajne razlike ispitivanih parametara.
2. Vrijednosti IGF-I u serumu oboljelih su niže (srednja vrijednosti 31,62 +/- 9,22 mlU/l) od vrijednosti IGF-I u serumu kontrolne skupine (srednja vrijednost 35,01 +/- 11,01 mlU/l) ali te razlike nisu statistički značajne. Vrijednosti IGF-I u likvoru oboljelih su više (srednja vrijednosti 3,40 +/- 0,87 mlU/l) od vrijednosti IGF-I kontrolne skupine (srednja vrijednost 3,17 +/- 0,71 mlU/l) iako ni te razlike nisu dosegle razinu statističke značajnosti.
3. Vrijednosti hormona rasta u serumu oboljelih su više (srednja vrijednosti 0,80 +/- 1,25 mlU/l) od vrijednosti u serumu kontrolne skupine (srednja vrijednosti 0,63 +/- 0,28 mlU/l) ali ne do razine statističke značajnosti. Međutim, vrijednosti hormona rasta u likvoru bile su **statistički značajno** niže (srednja vrijednosti 0,44 +/- 0,32 mlU/l) od vrijednosti hormona rasta u likvoru kontrolne skupine (0,83 +/- 0,26 mlU/l)
4. Ustanovljene vrijednosti hormona rasta u likvoru (srednja vrijednost 0,83 +/- 0,26 mlU/l) kontrolne skupine predstavljaju doprinos određivanju normalnih vrijednosti hormona rasta u likvoru, standardiziranju uzimanja materijala kao

i saznanjima o patofiziologiji hormona rasta unutar centralnog živčanog sustava.

5. Ustanovljene razlike, a poglavito statistički značajna razlika između koncentracija hormona rasta u likvoru između ispitivanih populacija, ukazuje na postojanje dinamike ovih parametara u demijelinizacijskim bolestima. Uočeni manjak hormona rasta prvenstveno upućuje na insuficijenciju somatotropinsko-somatomedinskog sustava. Kako su djelatni mehanizmi u demijelinizacijskim bolestima, uz autoimunu inflamaciju, s jedne strane sposobnost remijelinizacije, a s druge apoptotički mehanizmi, saznanje o insuficijenciji sustava koji je u fiziološkim uvjetima suprotstavljen mehanizmima apoptoze i promotor remijelinizacije značajno je za rasvjetljavanje etiopatogeneze demijelinizacijskih bolesti.
6. Navedene razlike koncentracija hormona rasta u likvoru između populacija mogu imati dijagnostičku vrijednost u početku bolesti, dok intraindividualno praćenje vrijednosti hormona rasta i kliničke slike može imati i prognostičku vrijednost u odnosu na pojedini oblik bolesti.
7. Potvrda ovih rezultata u daljnjim istraživanjima mogla bi imati utjecaj i na promjenu u pristupu terapiji demijelinizacijskih bolesti.

SAŽETAK

Demijelinizacijska bolest tipa multiple skleroze najznačajniji je predstavnik te skupine oboljenja. Osnovna klinička karakteristika multiple skleroze jest više ili manje izražena nemogućnost remijelinizacije zbog čega bolest u najvećem broju slučajeva poprima progresivan tijek. Faktori rasta, a prvenstveno somatomedini, su, uz intaktnu funkciju oligodendrocita, osnovni pokretač remijelinizacijskih procesa istovremeno djelujući i antiapoptotički. Budući da je poznato da je hormon rasta najznačajniji postnatalni regulator lučenja somatomedina, a uočeno je i njegovo direktno djelovanje na promociju remijelinizacijskih mehanizama, za pretpostaviti je da će vrijednosti hormona rasta u bolesnika oboljelih od multiple skleroze biti značajno različite od vrijednosti bolesnika koji ne boluju od demijelinizacijskih bolesti. Ispitivanje vrijednosti koncentracija HR i IGF-I u serumu i likvoru oboljelih od demijelinizacijske bolesti tipa multiple skleroze i kontrolne skupine ispitanika u ovom radu, ukazalo je da između te dvije populacije postoje značajne razlike ispitivanih parametara. Ustanovljene razlike, a poglavito statistički značajna razlika između koncentracija hormona rasta u likvoru između ispitivanih populacija, ukazuje na postojanje dinamike ovih parametara u demijelinizacijskim bolestima. Uočeni manjak hormona rasta prvenstveno upućuje na insuficijenciju somatotropinsko-somatomedinskog sustava. Kako su djelatni mehanizmi u demijelinizacijskim bolestima, uz autoimunu inflamaciju, s jedne strane sposobnost remijelinizacije, a s druge apoptotički mehanizmi, saznanje o insuficijenciji sustava koji je u fiziološkim uvjetima suprotstavljen mehanizmima apoptoze i promotor remijelinizacije značajno je za rasvjetljavanje etiopatogeneze demijelinizacijskih bolesti.

SUMMARY

Multiple sclerosis is one of the most important illness in the demyelinating diseases group. Crucial clinical feature of MS is loss of capability of physiological mechanisms to remyelinate. The illness is therefore in nearly all of the cases finally progressive.

Growth factors, especially somatomedines, are together with normal functioning of oligodendrocytes, the most important trigger for remyelination having at the same time an important antiapoptotic acting.

Postnatally, growth hormone is the most important regulator of the somatomedines and has also direct influence on the promotion of the remyelination mechanisms. It can therefore be assumed that the level of GH in patients with MS significantly differences than in the subjects who have no signs of demyelinating disease.

In this work the concentrations of GH and IGF-I in serum and cerebrospinal fluid in patients with MS and controls were investigated. The results of this work showed significantly lower concentration of GH in CSF in the group of patients comparing it with the control group.

This result points out to the insufficiency of the somatotrophic-somatomedine system, which can significantly influence the remyelinating mechanisms. Established deficite of growth hormone can also be an imporant contribution for revealing the ethiopathogenesis of multiple sclerosis.

LITERATURA

1. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H. Neurobiology of multiple sclerosis. u: McAlpine's Multiple Sclerosis, Churchill Livingstone Ed. 1999; 283-316
2. Mature oligodendrocytes: division following demyelination in adult animals, Arenella LS, Herndon RM (1984), Arch. Neurol. 41: 1162-1165
3. Norton WT, Cammer W. Chemical Pathology of diseases involving myelin. U: Morrel P Myelin. New York, Plenum Press, 1984; 369-404
4. Ranscht B, Clapshaw PA, Price J, Noble M, Seifert W. Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with monoclonal antibody against galactocerebroside. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1982; 79: 2709-2713
5. Zalc B, Monge M, Dupouey P, Haww JJ, Barman NA. The localisation of galactosyl and sulfogalactosyl ceramide in the brain of the 30 day old mouse. Brain Research, 1981; 211: 341-354
6. Raff MC, Williams BP, Miller RH. The in vitro differentiation of a bipotential glial progenitor cell. EMBO Journal 1979; 3:1857-1864
7. Linington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating

- activity with antibody titer to myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG).
Journal of Neuroimmunology, 1987; 17:61-70
8. Linington C, Webb M, Woodhams PL. A novel myelin associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. Journal of Neuroimmunology, 1984; 6: 387-396
 9. Linington C, Bradl M, Lassman H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. American Journal of Pathology, 1988; 130: 443-454
 10. Kalistova H, Havrdova E, Uhrova J, Zeman D, Tablova M, Mrazova K. Myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological disorders. J Neurol 2003;250(7):874-5.
 11. Cohen SR, Brooks BR, Herndon RM, Inbelts B, McKhann GM. A diagnostic index of active demyelination: myelin basic protein in CSF. Ann Neurol 1980;8:25-31.
 12. Laman JD, Thompson EJ, Kappos L. Body fluid markers to monitor multiple sclerosis: the assays and the challenges. Mult Scler 1998;4:266-9.
 13. Lamers KJB i sur. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. Acta Neurol Scand 1995;92:247-51.

14. Lamers KJB, Uitdehag BMJ. The short-term effect of an immunosuppressive treatment on CSF myelin basic protein in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:1334-7.
15. Martin-Mondiere C i sur. Cerebrospinal myelin basic protein in MS. Identification of two groups of patients with acute exacerbation. *Arch Neurol* 1987;44:276-8.
16. Ohta M i sur. Clinical and analytical evaluation of an enzyme immunoassay for myelin basic protein in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2000;46(9):1326-30.
17. Whitaker JN. Myelin basic protein in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Mult Scler* 1998;4:16-21.
18. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H. Pathology of multiple sclerosis. u: McAlpine's Multiple Sclerosis, Churchill Livingstone Ed. 1999; 323-357
19. Newcombe J. Havkins CP, Henderson CL. Histopathology of multiple sclerosis lesions detected by magnetic resonance imaging in unfixed postmortem central nervous system tissue. *Brain*, 1991; 114: 1013-1023
20. Newcombe J. Li H, Cuzner ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implication for pathogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1994; 20: 152-162

21. Sprinkle T, Wells M, Garver F, Smith D. Studies on Wolfgram high molecular weight CNS proteins: relationship to 2'-3'cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. *Journal of Neurochemistry* 1980; 35: 1200-1208
22. McMorris FA, McKinnon RD. Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol* 1997;6(3):313-29.
23. Miller DJ, Asakura K, Rodriguez M. Central nervous system remyelination clinical application of basic neuroscience principles. *Brain Pathol* 1997;6(3):331-44.
24. Almazan G, Honegger P, Matthieu JM. Triiodothyronine stimulation of oligodendroglial differentiation and myelination. *Develop Neurosci* 1985;7:45-54.
25. Yao DL, Webster HdeF, Hudson LD. Concentric sclerosis (Balo); morphometric and in situ hybridization study of lesions in six patients. *Annals of Neurology*, 1994; 35:18-30
26. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insuline-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75:73-82.
27. Dubois-Dalcq M. Regeneration of oligodendrocytes and myelin. *Research News* 1995;18(7):289-91.

- 28.Engleka M, Folli F, Winnay J, Kahn CR, McMorris FA. Insulin-receptor substrate-1 is required for normal myelination. *J Neurochem* 1996;20-1.
- 29.Dubois-Dalcq M, Armstrong R. The cellular and molecular events of central nervous system remyelination. *BioEssays* 1990;12:569-76.
- 30.Armstrong R, Friedrich VL, Holmes KV, Dubois-Dalcq M. In vitro analysis of the oligodendrocyte lineage in mice during demyelination and remyelination. *J Cell Biol* 1990;111:1183-95.
- 31.Burgess WH, Maciag T. The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575-606
- 32.Johnson ES, Ludwin SK. The demonstration of recurrent demyelination and remyelination of axons in the central nervous system. *Acta Neuropathol* 1998; 53: 93-98, 1998
- 33.Tourbah A, Baron van Evercooren A, Oliver L, Raulais D, Jeanny JC, Gumpel M. Endogenous aFGF expression and cellular changes after a demyelinating lesion in the spinal cord of adult normal mice: immunohistochemical study. *J Neurosci Res* 1992; 33:47-59.
- 34.Prineas JW, Kwon EE, Goldenberg PZ, Cho ES, Sharer LR. Interaction of astrocyte and newly formed oligodendrocytes in resolving multiple sclerosis lesion. *Lab Invest* 1990; 63: 624-636

35. Vick RS, DeVries GH. Mitotic potential of adult rat oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res* 1992; 33:68-74.
36. Wood PM, Bunge RP. Evidence that axons are mitogenic for oligodendrocytes isolated from adult animals. *Nature* 1986; 320:756-8.
37. Waxman SG, Kocsis JD, Black JA. pathophysiology of demyelinated axons. U: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK, ur. *The Axon. Structure, Function, and Pathophysiology*. New York: Oxford University press 1995; str. 438-61.
38. Wolburg H. Myelination and remyelination in the regenerating visual system of the goldfish. *Exp Brain Res* 1981; 43:199-206.
39. Yajima K, Suzuki K. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab Invest* 1979; 41:385-92.
40. Demerens C, Stankoff B, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9887-92.
41. Macklin WB, Weill CL, Deininger PL. Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in culture cells. *J Neurosci Res* 1986;16:203-17.
42. Notterpek LM, Rome LH. Functional evidence for the role of axolemma in CNS myelination. *Neuron* 1994; 13:473-85.

43. Lubetzki C, Demerens C, Zalc B. Signaux axonaux de myélinisation dans le système nerveux central. *Medicine/Sciences* 1997; 13:1097-1105.
44. Wisniewski HM, Oppenheimer D, McDonald WI. Relation between myelination and function in MS and EAE. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1976; 35: 327-334
45. Solly S, Thomas JL, Monge M. Myelin/Oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 1996; 18:39-48.
46. Driscoll BF, Kies MW, Alvord EC. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in guinea pigs with homologous myelin basic protein. *J Immunol* 1974; 112:392-7.
47. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu rev Immunol* 1992; 10:153-87.
48. Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Bruck W, Budka H, Jellinger K. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 1994; 117:1311-22.
49. Prineas JW, Kwon EE, Goldenberg PZ, Ilayas AA, Quarles RH, Benjamins JA, Sprinkle TJ. Multiple sclerosis: oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. *Lab Invest* 1989; 61:489-503.
50. Newcombe J, Hawkins CP, Henderson CL, Patel HA, Woodroffe MN, Hayes GM. Histopathology of multiple sclerosis lesions detected by magnetic

resonance imaging in unfixed postmortem central nervous system tissue. *Brain* 1991; 114:1013-23.

51.Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain* 1993; 116:681-93.

52.Raine CS, Scheinberg LC, Waltz JM. Multiple sclerosis: oligodendrocyte survival and proliferation in an active, established lesion. *Lab Invest* 1981; 45:534-46.

53.Rodriguez M, Scheithauer B. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 1994; 18:3-13.

54.Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samarta A, Sanchez-Galmez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 2001; 24(4):224-30.

55.Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* 1988; 1:623-34.

56.Matute C i sur. Glutamate receptor mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:8830-35

57.Akassoglou K,Bauer J,Kassiotis G,Pasparakis M,Lassmann H,Kollias G,Probert L. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic

- mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy. *Am J Pathol* 1998; 153(3):801-13.
58. Brosnan CF, Raine CS. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 1996; 6:243-57.
59. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989; 170:607-12.
60. Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines: a primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; 144:129-35.
61. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 1996; 19:331-8.
62. Gogate N, Verma L, Zhou JM, Milward E, Rusten R, O'Connor M, Kufta C, Kim J, Hudson L, Dubois-Dalcq M. Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 1994; 14(8): 4571-87.
63. Armstrong R, Harvath L, Dubois-Dalcq M. Astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J Neurosci Res* 1990; 2:400-407.
64. Armstrong R, Dorn HH, Kufta CV, Friedman E, Dubois-Dalcq ME: Preoligodendrocyte-type-2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J. Neurosci Res* 1992; 2:400-407

65. Barres BA, Kart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; 70:31-46
66. Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M: Cooperation between two growth factors promotes extended self renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2-astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6368-6372
67. Armstrong CR, Dorn HD, Kufta CV, Friedman E, Dubois-Dalcq ME. Pre-Oligodendrocytes from adult human CNS. *The Journal of Neuroscience*, 1992; 12(4): 1538-1547
68. Hunter SF, Bottenstein JE. O-2A glial progenitors from mature brain respond to CNS neuronal cell line-derived growth factors. *J. Neurosci. Res.* 1991; 28: 574-582
69. Trotter J, Schachner M. Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Dev Brain Res* 1989; 46: 115-122
70. Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*, 2000; 289: 1754-1757

71. Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro an astrocyte or an oligodendrocyte depending upon culture medium. *Nature* 1983; 303: 309-396
72. Wood PM, Bunge RP. The origin of remyelinating cells in the adult central nervous system: the role of the mature oligodendrocyte. *Glia* 1991; 4: 225-232
73. Cameron RS, Rakic P: Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 1991; 4:124-137
74. Wood PM, Bunge RP: The origin of remyelinating cells in the adult central nervous system: role of the mature oligodendrocyte . *Glia* 1991; 4:225-232
75. Levison SW, Goldman JE: Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 1993; 2:201-212
76. Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 1988; 333:560-565
77. Richardson WD, Raff M, Noble M. The oligodendrocyte-type-2-astrocyte lineage. *Semin Neurosci* 1990; 2:445-454
78. McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron*, 1990; 5: 603-614

79. Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. Insulin-like growth factor I increases grain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron*, 1993; 10: 729-740
80. Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M. Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6368-6372
81. Ohe Y, Ishikawa K, Itoh Z, Tatemoto K: Cultured leptomeningeal cells secrete cerebrospinal fluid proteins. *Journal of Neurochemistry*, 1996; 67: 964-971
82. Cserr HF. Convection of brain spinal fluid. U: Shapiro K, Marmarou A, Protnoy H (eds) *Hydrocephalus*. New York, Raven Press. 1992; 59-68
83. Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Wilkin GP. Use of antibodies to GD3 ganglioside, galactocerebroside and glial fibrillary acidic protein to follow the development of macroglial cells in rat cerebellum. *J. Neurocytol* 1987; 17: 43-54
84. Ranscht B, Clapshaw PA, Price J, Noble M, Seifert W. Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 2709-2713
85. Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1979; 5: 22-31

86. Raine CS, Moore GR, Hintzen R, Traugott U. Induction of oligodendrocyte proliferation and remyelination after chronic demyelination. Relevance to multiple sclerosis. *Lab Invest* 1988; 59: 467-476
87. Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois-Dalcq M. A Role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 1988; 53 (2):309-19
88. Korsching S. The role of nerve growth factor in the CNS. *Trends Neurosci* 1986; 9: 570-574
89. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46: 155-169
90. Bressler JP, Grotendorst GR, Levitov C, Hjemeland LM. Chemotaxis of rat brain astrocytes to platelet derived growth factor. *Brain Res.* 1985; 344: 249-254
91. Heldin CH, Westermark B, Wasterson A. Demonstration of an antibody against platelet-derived growth factor. *Exp. Cell Res.* 1981; 136: 255-261
92. Heldin CH, Westermark B, Wasterson A. Platelet-derived growth factor. Isolation by a large scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem. J.* 1981; 193: 907-913
93. Eccleston PA, Silberberg DH. Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes in vitro. *Dev. Brain. Res.* 1985; 21: 315-318

94. Abney ER, Bartlett PF, Raff MC. Astrocytes, ependymal cells and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Dev. Biol.* 1981; 83:301-310
95. Noble M, Murray K. Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J.* 1984; 3: 2243-2247
96. Nister M, Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. A glioma-derived analog to platelet-derived growth factor: demonstration of receptor competing activity and immunological crossreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 926-930
97. Dubois-Dalcq M, Murray K. Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol. Biol (Paris)*, 2000; 48: 80-86
98. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968; 161: 370-371
99. Ranke MB, Osterziel KJ, Schweizer R, Schuett B, Weber, Krabbel P, Vornwald A, Blumenstock G, Elmlinger MW. Reference levels of insulin-like growth factor I in the serum of healthy adults: comparison of four immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1329-34

100. McMorris FA, Smith TM, DeSalco S, Furlanetto RW. Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 822-826
101. Ballotti R, Nielsen FC, Pringle N, Kowalski A, Richardson WD, Van Obberghen E, Gammeltoft S. Insulin-like growth factor I in cultured rat astrocytes: expression of the gene, and receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 1987; 6:3633-3639
102. Gammeltoft S, Ballotti R, Nielsen FC, Kowalski A, Van Obberghen E. Two types of receptor for insulin-like growth factors are expressed on normal and malignant cells from mammalian brain. U: *Insulin, Insulin-like Growth Factors and their receptors in the Central Nervous System.* MK Raizada, MI Phillips, D. Le Roith eds. (New York Plenum) pp 205-230.
103. LeRoith D, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors. *Ann NY Acad Sci* 1993; 692:1-9
104. Blum WF, Albertsson WK, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol Metab* 1993; 76:1610-1616
105. Lee PD, Wilson DM, Rountree L, Hintz RL, Rosenfeld RG. Efficacy of insulin-like growth factor I levels in predicting the response to provocative growth hormone testing. *Pediatr Res* 1990; 27:45-51

106. Barkan AL, Beitins IZ, Kelch RP. Plasma insulin-like growth factor-I/somatomedin-C in acromegaly: correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. *J. Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:69-73
107. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J. Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E967-E976
108. Laron Z. The essential role of IGF-I: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. *J. Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4397-4404
109. Chen L, Lund PK, Burgess SB, Rudisch BE, McIlwain DL. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and motoneuron size. *J. Neurobiol* 1997; 32: 202-212
110. Harvey S, Hull K. Neural growth hormone: an update *J. Mol Neurosci.* 2003; 20:1-14
111. Demerens C, Stankoff B, Zalc B, Lubetzki C. Eliprotil stimulates CNS myelination: new prospects for multiple sclerosis? *Neurology*, 1999; 52:346-50
112. Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2003; 144: 967-74

113. Burman P, Hetta J, Wide L, MÅÅnsson JE, Ekman R, Karlsson FA. Growth hormone treatment affects brain neurotransmitters and thyroxine. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1996; 44: 319-24
114. Nicolini A, Buonaguidi R, Ferdeghini M, Carpi A. Relationship between the circulating levels of adenohipophyseal hormones in blood and in cerebrospinal fluid. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1984; 47:710-4
115. Root AW, Diamond FB. Regulation and clinical assessment of growth hormone secretion. *Endocrine*, 2000; 12:137-45
116. Johansson JO, Larson G, Andersson M, Elmgren A, HynsjÅ¶ L, Lindahl A, Lundberg PA, Isaksson OG, Lindstedt S, Bengtsson BA. Treatment of growth hormone-deficient adults with recombinant human growth hormone increases the concentration of growth hormone in the cerebrospinal fluid and affects neurotransmitters. *Neuroendocrinology*, 1995; 61:57-66
117. Verhelst J, Abs R, Vandeweghe M, Mockel J, Legros JJ, Copinschi G, Mahler C, Velkeniers B, Vanhaelst L, Van Aelst A, De Rijdt D, Stevenaert A, Beckers A. Two years of replacement therapy in adults with growth hormone deficiency. *Neurology*, 1997; 47: 485-494

118. Linfoot JA, Garcia JF, Wei W, Fink R, Sarin R, Born JL, Lawrence JH. Human growth hormone levels in cerebrospinal fluid. *J. Clin Endocrinol Metab*, 1970; 31: 230-2
119. Rubinek T, Yu R, Hadani M, Barkai G, Nass D, Melmed S, Shimon I. The cell adhesion molecules N-cadherin and neural cell adhesion molecule regulate human growth hormone: a novel mechanism for regulating pituitary hormone secretion. *J. Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 3724-30
120. Barreca T, Franceschini R, Siani C, Perra C, Francaviglia N, Cataldi A, Rolandi E. Diurnal changes of plasma and cerebrospinal fluid somatostatin and 24-h growth hormone secretory pattern in man. A study in hydrocephalic patients. *Acta Endocrinol* 1988;117(1): 130-134
121. Schaub C, Bluet-Pajot MT, Szickla G, Lornet C, Talairach J. Distribution of growth hormone and thyroid-stimulation hormone in cerebrospinal fluid and pathological compartments of the central nervous system. *J. Neurol Sci* 1977; 31(1): 123-131
122. Schneider HJ, Pagotto U, Stalla GK. Central effects of the somatotropic system. *Eur J. Endocrinol*, 2003; 149(5): 377-392
123. Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced injury. *Endocrinology*, 1999; 140(7): 3063-3072

124. Nyberg F, Burman P. Growth hormone and its receptors in the central nervous system-location and functional significance. *Horm Res* 1996; 45: 18-22
125. Garcia-Aragon J, Lobie PE, Muscat GE, Gobius KS, Norstedt G, Waters MJ. Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development? *Development* 1998; 114: 869-876.
126. Mathews LS, Enberg B, Norstedt G. Regulation of growth hormone receptor gene expression. *J. Biol Chem* 1989; 264:9905-9910
127. Zamenhof S, Mosley J, Schuller E. Stimulation of the proliferation of cortical neurons by prenatal treatment with growth hormone. *Science* 1966; 152: 1396-1397
128. Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sánchez-Franco F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology*, 2003; 144:1086-97
129. Brinar V, Franjić S, Podobnik-Šarkanji S, Petelin Ž. Recommendations for the diagnosis and treatment of patients with multiple sclerosis. *Neurol. Croat.* 2003; 52(1):9-33
130. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr. Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of

- Neurology and the MS Council for Clinical practice guidelines. Disease modifying therapies in multiple sclerosis. *Neurology*, 2002; 58: 169-178
131. Ciccarelli O, Werring DJ, Barker GJ, Griffin CM, Wheeler-Kingshott CA, Miller DH, Thompson AJ. A study of the mechanisms of normal-appearing white matter damage in multiple sclerosis using diffusion tensor imaging--evidence of Wallerian degeneration. *J. Neurol*, 2003; 250: 287-92
 132. DJ Werring, GJ Griffin, CA Miller. Evidence of Wallerian degeneration in normal appearing white matter in the early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis. A 'HMRS study. *J. of Neurology*, 250 (1): 22-28, 2003.
 133. 133 Parry A, Corkill R, Blamire AM, Palace J, Narayanan S, Arnold D, Styles P, Matthews PM, Beta-Interferon treatment does not always slow the progression of axonal injury in multiple sclerosis. *J. Neurol*, 2003; 250: 171-8
 134. Donald E Goodkin. Interferon β therapy for multiple sclerosis. *The Lancet*, 1998; 352: 1486-1487
 135. O. Aktas, U. Wendling, R. Zschenderlein, F. Zipp. Apoptose bei multipler Sklerose. *Nervenarzt*, 2000; 71: 767-773
 136. Blakemore WF. Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding Cuprizone. *J. Neurol. Sci* 1973; 20: 73-83

137. Blakemore WF. Transplanted type-1 astrocytes can be used to reconstitute the glial limitans of the CNS: the structure which prevents Schwann cells from myelinating CNS axons. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992; 18: 460-466
138. Blakemore WF, Franklin RJM. Transplantation of glial cells into the CNS. *Trends Neurosci* 1991; 14: 323-327
139. Smith KJ, Blakemore WF, Mc Donald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nature* 1979; 280:395-396
140. Ozawa K, Suchanek G, Breischoff H. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 1994; 117:1311-1322
141. Raine CS, Scheiberg L, Waltz JM. Multiple sclerosis: oligodendroglia survival and proliferation in an active established lesion. *Lab Invest* 1981; 45:534-546
142. Prineas JW, Barnard RO, Kwon LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993; 33:137-150
143. Poser Ch.M, Brinar B. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurologia Croatica*, 2000; 49: 21-42
144. Jacoby LS. *Endocrine diagnosis: Clinical and Laboratory Approach*. Little Brown and Company. 1983; Boston MA: 15-51

POPIS KRATICA

Ca	kalcij
CAM	cell adhesion molecule, molekule stanične adhezije
CPAP	maska za forsirani udisaj kisika
CNP-aza	2'3'-ciklička-nukleotidna 3'-fosfohidrolaza
CNS	centralni živčani sustav
CPAP	maska za forsirani udisaj kisika
DNA	deoksinukleinska kiselina
EAE	autoimuni alergijski encefalomijelitis
FGF	fibrocitički faktor rasta
GalC	galaktolipidi
GC	galaktocerebrozid
GHBP	growth hormone binding protein, transportni protein hormona rasta
GHRH	growth-hormone releasing factor, faktor koji stimulira sekreciju hormona rasta
HLB	hematolikovska barijera
HR	hormon rasta
Ig	imunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor, inzulinu sličan faktor rasta
IGFBP	transportni protein inzulinu-sličnog faktora rasta
IL	interleukin
IRS	inzulinski receptorski supstrat
MBP	mijelin-bazični protein
MAG	mijelinski glikoprotein
MOG	mijelin-oligodendrocitni glikoproteini
mRNA	messenger-ribonukleinska kiselina
MS	multipla skleroza
Na ⁺	ion natrija
NAA	N-acetilaspargat
NGF	nekrotički faktor rasta
OG	oligodendrocit
PDGF	platelet-derived growth faktor, trombocitički faktor rasta
PLP	proteolipidni protein
PNS	periferni živčani sustav
RNA	ribonukleinska kiselina
TGFβ	tumorski faktor beta
TGFβ	transformirajući faktor rasta beta
T3 i 4	tiroidni hormon (3 i 4)
TNFalfa	tumorski nekrotički faktor alfa
W (1 i 2)	Wolfgramovi proteini (1 i 2)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 4. prosinca 1963. godine gdje sam završila i osnovnu i srednju školu. U jesen 1982. godine upisala sam Medinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a u proljeće 1988. godine diplomirala. U lipnju iste godine započinjem obavezni liječnički staž u trajanju od godinu dana u D.Z. «Trnje», te polažem stručni ispit. Po polaganju ispita radim u Centru za cerebrovaskularne bolesti D.Z. «Trnje» sve do lipnja 1990. godine kada počinjem raditi u Zavodu za neuropatologiju, Klinike za neurologiju, KBC «Rebro», kao znanstveni pripravnik. Tijekom pripravničkog staža završavam postdiplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, smjer «Biologija», te u srpnju 1991. god. branim magistarski rad pod naslovom «Korelativna patologija subduralnog hematoma i kompjuterizirane tomografije mozga» (mentor prof. dr D. Jadro-Šantel). Tijekom 1991. i 1992. godine dobrovoljno sudjelujem u radu Medicinske ekipe Hrvatske vojske na razdiobi i dodijeli medicinskog materijala za potrebe domovinskog rata, te sam i nosioc Zahvalnice HV-a. U svibnju 1992. godine započinjem specijalizaciju iz neurologije na Klinici za neurologiju, KBC «Rebro». Specijalistički ispit polažem u lipnju 1995. godine. U studenom iste godine odlazim u Veliku Britaniju gdje radim u «Memory Assesment Clinics» (Bradford) kao istraživač u provođenju kliničkih pokusa iz područja neurofarmakologije. Od svibnja 1996. godine zaposlena sam na Klinici za neurologiju KBC «Rebro» gdje radim na radnom mjestu liječnika-specijaliste u Referalnom centru za epilepsiju Ministarstva zdravstva RH i kao odjelni liječnik Odjela za epilepsije i paroksizmalne bolesti Klinike za neurologiju.

Od 1997. godine stičem zvanje naslovnog asistenta na Katedri za neurologiju, a od 2002. godine sam i Tajnik Katedre. U razdoblju od 1996. godine do danas sudjelujem u radu sa studentima dodiplomske nastave iz neurologije i polaznicima postdiplomske nastave iz predmeta Neurologije i Oftalmologije, kojima držim vježbe i seminare.

Objavila sam 5 znanstvenih i stručnih radova, te više kongresnih saopćenja. Aktivni sam sudionik i pozvani predavač na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima iz epileptologije. Voditelj sam ili suradnik u projektima i kliničkim ispitivanjima iz područja neurofarmakologije poglavito u epileptologiji.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, HLK, Hrvatskog društva za neurologiju, Hrvatskog društva za EEG i kliničku neurofiziologiju, Hrvatskog društva za reanimatologiju (čiji sam i Tajnik), Međunarodnog društva za neuromodulaciju i Međunarodnog društva za kliničku neurofiziologiju. Međunarodni sam kandidat za instruktora u ERC-u (European Resuscitation Council).

Aktivno govorim engleski, njemački i francuski.