

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

BAKALaura DARBS

RĪGA 2020

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**SLĀPEKĻA (II) OKSĪDA METABOLĪTI MULTIPLĀS
SKLEROZES SLIMNIEKU ASINS PLAZMĀ
ATKARĪBĀ NO TERAPIJAS EFEKTIVITĀTES**

BAKALaura DARBS

Autors: **Jevgenijs Bodrenko**

Studenta apliecības Nr.: jb17048

Darba vadītājs: M.Sc. Vitālijs Borisovs

RĪGA 2020

ANOTĀCIJA

Multiplā skleroze (MS) ir kompleksā, neurodeģeneratīvā saslimšana ar izteikto autoimūno komponentu, ar kuru slimo ap 2,2 miljoniem vidēja vecuma cilvēku visā pasaulē. Slimībai progresējot, attīstās fiziskā un garīga nespēja, kas noved pie pacienta nāves, visbiežāk no elpceļu infekcijām, 12-25 gadu laikā pēc klīnisko simptomu atklāšanas.

Mūsdienās pieejamie terapijas veidi dod iespēju palēnināt slimības progresiju, bet neļauj pilnībā to izārstēt. Kamēr nav pieejama efektīva ārstēšanas metode, liela nozīme ir diagnostikas kritēriju un laboratorijas testu izstrādei, kas ļautu noteikt slimības pazīmes pirms vai pēc minimāli izteiktas simptomātikas rašanās. Tas var dot iespēju ātrāk uzsākt uzturošo terapiju, palielinot pacientu dzīves ilgumu un uzlabojot tās kvalitāti. Par vērtīgiem tiek uzskatīti arī kvantitatīvie parametri, kas ļauj novērtēt cik efektīvi izvēlēta terapija spēj apturēt slimības progresiju dažādās pacientu grupās.

Dotā darba mērķis ir salīdzināt slāpekļa (II) oksīda metabolītu (NO_2^- , NO_3^-) koncentrācijas asins plazmā, MS slimnieku un veselu indivīdu grupas, kā arī noteikt pieminēto metabolītu līmeņus slimnieku plazmā atkarībā no pielietotas terapijas veida.

Darba ietvaros tika veikta NO_2^- un NO_3^- kvantificēšana plazmas paraugos no MS slimnieku un kontroles grupām, izmantojot hemiluminiscences detektoru *Sievers NOA 280i*. Pēc iegūto datu apstrādes, tika noteikts ka gan NO_2^- gan NO_3^- koncentrācijas MS slimnieku asins plazmā ir ievērojami paaugstinātas, salīdzinot ar veselo indivīdu grupu ($p < 0,05$).

Rezultāti par dažādiem terapijas veidiem parādīja ka, atšķirības NO_x metabolītu līmeņos starp pacientiem, kas pielieto dažādus terapijas veidus un pacientiem bez terapijas, pārsvarā, nav statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$).

Atslēgvārdi: *Multiplā skleroze; Inducējama slāpekļa (II) oksīda sintāze; Oksidatīvais stress; Peroksinitrīta citotoksicitāte.*

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a complex, neurodegenerative disease that involves a profound autoimmune component and affects 2.2 million young-to-middle age adults world-wide. As the disease progresses, the physical and mental disabilities emerge and intensify, leading to a lethal outcome in 12-25 years after clinical manifestations first appeared, mainly from respiratory infections.

All therapy methods that are currently available only allow to slow the progression of MS. Given the crippling nature of the disease, clinical criteria and laboratory tests for early diagnosis and monitoring of progression present an area of research, that would allow for earlier and more efficient application of disease modifying therapy. This, in turn, would result in a prolonged lifespan and improved quality of life for MS patients.

The aim of the given study is to compare the plasma concentrations of nitric oxide metabolites (NO_2^- , NO_3^-) in MS patients and healthy controls, as well as to evaluate the concentrations of corresponding metabolites in MS patients depending on the type of therapy.

The quantification of NO_2^- and NO_3^- in plasma samples from MS patient group and control group was performed, using the chemiluminescence detector Sievers NOA 280i. Data analysis has shown that NO_2^- and NO_3^- plasma concentrations in MS patients were significantly elevated compared to the control group ($p < 0,05$).

No significant increase of NO_x concentrations in blood plasma was observed in most patient groups, receiving different kinds of therapy, comparing with patients without therapy ($p > 0,05$).

Keywords: Multiple sclerosis; Inducible nitric oxide synthase; Oxidative stress; Peroxynitrite cytotoxicity.

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	8
1. NO BIOĶĪMISKĀS REAKCIJAS UN FIZIOLOĢISKĀ NOZĪME	11
2. IESKATS MULTIPLĀS SKLEROZES PATOĢENĒZĒ.....	15
3. NO LOMA MULTIPLĀS SKLEROZES PATOĢENĒZĒ	20
4. MODIFICĒJOŠĀS TERAPIJAS STRATĒGIJAS PIE MS.....	23
REZULTĀTI	25
NO metabolītu līmeņi MS pacientu un veselo indivīdu asins plazmā.....	25
NO metabolītu līmeņi MS pacientu asins plazmā, atkarībā no terapijas veida	27
Iegūto rezultātu analīze	31
SECINĀJUMI	36
IZMANOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI	39
PIELIKUMI.....	56
1. Pielikums. Hemiluminiscences detektora kalibrēšanas tabula un grafiks, nitrītu kvantificēšanai.....	56
2. Pielikums. Hemiluminiscences detektora kalibrēšanas tabula un grafiks, nitrātu kvantificēšanai	57
3. Pielikums. Pētījumu dati par NO _x koncentrācijām cilvēku serumā.....	58

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ATF – adenozintrifosfāts

α – I tipa kļūdas varbūtība

Ca^{2+} – kalcija jons

CDX+(CDX^{bright}) – imūnšūna, kas satur *Cluster of differentiation* proteīnu numurs X

cNOS – konstitutīvas NOS (nNOS un eNOS)

CNS – centrālā nervu sistēma

CO_2 – oglekļa (IV) oksīds

COX-2 – ciklooksigenāze-2

CSŠ – cerebrospinālais šķidrums

DMT – slimību modificējoša terapija (ang. *Disease modifying therapy*)

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

EAE – eksperimentālais autoimūnais encefalomiēlīts

(ang. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

eNOS (NOS3) – endoteliāla NOS

EtOH – etanols

FasL – *Fas* ligands

GzmB – granzīma B klases serīna proteāze

H^+ – hidroksidjona katjons

H_a – alternatīva hipotēze

H_0 – nulles hipotēze

H_2O_2 – ūdeņraža peroksīds

HEB – hematoencefaliskā barjera

HLA – cilvēka leikocītu antigēns (ang. *Human leukocyte antigen*)

HNO_2 – slāpekļpaskābe

hv – gaismas kvants ar frekvenci ν

I – jodīdjons

IFN – interferons

IL – interleikīns

iNOS (NOS2) – inducējamā NOS

JC vīruss – cilvēka papilomas vīruss 2

MCT1 – monokarboksilāta transportieris 1

MHC-I – I klases galvenais audu saderības komplekss

(ang. *Major Histocompatibility Complex class I*)

MHC-II – II klases galvenais audu saderības komplekss
(ang. *Major Histocompatibility Complex class II*)
mPTP – mitohondriju caurlaidības pārejas pora
(ang. *Mitochondrial permeability transition pore*)
MRA – magnētiskās rezonanses attēldiagnostika
MS – multiplā skleroze (ang. *Multiple sclerosis*)
N₂O₃ – slāpekļa (III) oksīds
Na⁺ – nātrijs jons
NADPH – nikotinamīd-adenīn-dinukleotīd-fosfāta reducētā forma
NCX – nātrijs-kalcija antiporteris
NCX-β2-*knockout* – organismā ir inaktivēts gēns, kas kodē NCX-β2 subvienības proteīnu
NGF – nervu augšanas faktors (ang. *Nerve growth factor*)
NK – naturālo killeru klases šūna
nmol – nanomoli
nNOS (NOS1) – neironāla NOS
NO – slāpekļa (II) oksīds
NO⁺ – nitrozonijs katjons
NO₂⁻ – nitrīts jons
NO₂ – slāpekļa (IV) oksīds
NO₂^{*} – slāpekļa (IV) oksīda uzbudināts enerģētiskais stāvoklis (ang. *Excited state*)
NO₂⁺ – nitronijs katjons
NO₃⁻ – nitrāts jons
NOS – NO sintāze
NO_x – NO oksidēšanas produktu kopīgais apzīmējums (NO₂⁻ un NO₃⁻)
O₂ – molekulārais skābeklis
O₂^{*} – superoksīda anjon-radikāls
O₃ – ozons
ONOO⁻ – peroksinitrīts
ONOOCO₂⁻ – nitrozoperoksikarbonāts
PD-L – programmētās nāves ligands (ang. *Programmed-death ligand*)
PMT – fotoelektronu pavairotais (ang. *Photomultiplier tube*)
PrMS – progresējoša MS
RNOS – reaģētspējīgas slāpekļa oksīda daļiņas
ROS – reaģētspējīgas skābekļa daļiņas
RRMS – remitējoši recidivējoša MS

SEM – standartklūda

sGC – šķīstošā guanilciclāze

TGF – audzēju augšanas faktors

Th – T helperu klases limfocīts

TNF – audzēju nekrozes faktors

Tr1 – Tr1, iekaisumu ierobežojošo, limfocītu klase

Treg – Treg, iekaisumu ierobežojošo, limfocītu klase

V³⁺ – vanādija (III) katjons

VCAM-1 – vaskulāro šūnu adhēzijas proteīns 1 (VLA4 receptors)

(ang. *Vascular cell adhesion protein 1*)

VLA4 – specifiski-ekspresēts leikocītu integrīns (ang. *very late antigen-4*) –

– veicina leikocītu nokļūšanu audos no asinsvadiem

VO₂⁺ – dioksovanādija (V) katjons

μL – mikrolitri

μM – mikromoli litrā

IEVADS

Multiplā skleroze (MS) ir kompleksā, neurodeģeneratīvā saslimšana ar izteikto autoimūno komponentu, ar kuru slimo ap 2,2 miljoniem vidēja vecuma cilvēku pasaulē. Slimībai progresējot, attīstās fiziskā un garīga nespēja, kas noved pie pacienta nāves, visbiežāk no elpceļu infekcijām, 12-25 gadu laikā pēc klīnisko simptomu atklāšanas (Alessandro Oksenberg, 2017; Wallin *et al.*, 2019).

Šobrīd MS nevar izārstēt ne ar vienu no pašlaik pieejamiem terapijas veidiem. Izmantojamie farmakoloģiskie līdzekļi darbojas, mazinot simptomus un uzlabojot slimnieku dzīves kvalitāti (Ghasemi, Razavi and Nikzad, 2017; Gitto, 2017).

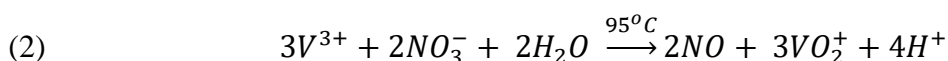
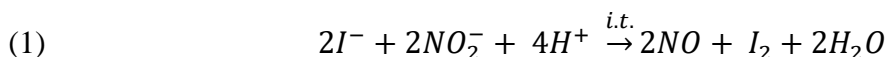
Kamēr nav pieejama efektīva terapija, liela nozīme ir diagnostikas kritērijiem un laboratorijas testiem, kas ļauj noteikt slimības pazīmes pirms vai pēc minimāli izteiktas simptomātikas rašanās (Harris, Tuddenham and Sadiq, 2017). Šāda klīniskā informācija dod iespēju ātrāk uzsākt slimību modificējošas terapijas kursu (ang. *Disease modifying therapy*), palielinot pacientu dzīves ilgumu un uzlabojot tās kvalitāti. Īpaši vērtīgi ir kvantitatīvie parametri, kas ļauj novērtēt pielietotas terapijas efektivitāti slimības progresijas apturēšanā dažādās MS slimnieku apakšpopulācijās (Harris, Tuddenham and Sadiq, 2017; Macaron and Ontaneda, 2019).

Literatūras dati liecina ka NO oksidēšanas produktu līmeņi (NO_x) MS pacientu cerebrospinālajā šķidrumā (CSŠ), kā arī serumā, ir ievērojami paaugstināti, salīdzinot ar veseliem indivīdiem (Sellebjerg *et al.*, 2002; Acar *et al.*, 2003; Rejdak *et al.*, 2004; Graber and Dhib-Jalbut, 2011). Pašlaik trūkst datu par NO_x līmeņiem MS slimnieku asins plazmā. Apskatītos pētījumos (Sellebjerg *et al.*, 2002; Acar *et al.*, 2003; Rejdak *et al.*, 2004) NO_x kvantificēšanai tiek pielietota spektrofotometrija, kopā ar NO ķīmisko konversiju par hromoforu pēc Grissa metodes. Dotā metodika neļauj precīzi kvantificēt konkrēto NO_x formu, proti NO_2^- un NO_3^- , koncentrācijas. Metode neļauj tieši noteikt nitrātu koncentrāciju – ir nepieciešama enzimatiskā konversija par nitrītiem, kas nav pilnībā specifiskā – var notikt tālākā NO_2^- reducēšana par NO. Papildus, enzimatiskai reducēšanai ir nepieciešams kofaktors – NADPH, kura pārākums traucē NO_2^- konversijai par hromoforu (diazotēšanai) (Sun *et al.*, 2003; Csonka *et al.*, 2015). Līdz ar to ir nozīme jauno datu iegūšanai un iepriekš iegūto datu aktualizēšanai, izmantojot precīzākas metodes.

Izvirzītas hipotēzes: 1. NO_2^- un NO_3^- koncentrācijas (μM) MS slimnieku asins plazmā ir augstākas nekā veselu indivīdu asins plazmā. 2. Pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības NO_2^- un NO_3^- koncentrācijās (μM) MS slimnieku asins plazmā, atkarībā no slimību modificējošas terapijas veida.

Šī darba ietvaros bija veikta, zinātniskā literatūrā, pieejamās informācijas apkopošana par slāpekļa (II) oksīdu fizioloģisko nozīmi, bioķīmiskām pārvērtībām cilvēku organismā un lomu multiplās sklerozes patoģenēzē. Papildus tika apkopota informācija par multiplās sklerozes patoģenēzes imunoloģiskiem pamatiem un slimību modificējošās terapijas stratēģijām, pieminot konkrēto vielu iedarbības mehānismus un tiem raksturīgas blakusparādības.

Darba ietvaros, tika eksperimentāli noteiktas NO_2^- un NO_3^- koncentrācijas asins plazmā, izmantojot kvantitatīvo ķīmisko konversiju par slāpekļa II oksīdu pēc vienādojumiem (1) un (2) (Bryan and Grisham, 2007):



Izdalītais NO tika laists caur *Sievers NOA 280i* hemiluminiscences detektoru. Detektora reakcijas kamerā NO reaģē ar ozonu pēc vienādojumiem (3) un (4) (Sievers Instruments Inc., 2001):



Gaismas kvants ($h\nu$) tika uztverts un kvantificēts ar fotoelektronu pavairošanas kameras palīdzību (ang. PMT – *photomultiplier tube*). Izmantojot datorprogrammu *NOAnalysis-Liquid*, sprieguma izmaiņas atkarībā no laika tika fiksētas līknes formā, kas ļāva iegūt integrējamo signālu. Laukums zem līknes grafika ir tieši proporcionāls nosakāmās vielas koncentrācijai paraugā (Ionic Instruments, 2009). Pēc iepriekš iegūtā kalibrēšanas taisnes vienādojuma ir iespējams noteikt izvēlētas nosakāmās vielas (NO_2^- vai NO_3^-) koncentrāciju paraugā (Sievers Instruments Inc., 2001).

Pirms analīzes veikšanas plazmas paraugi tika pakļauti proteīnu atdalīšanas procedūrai: 2:1 atšķaidījums (EtOH : plazma) ar 96% etilspirtu; 1,5 mL Ependorfa mēģene ar paraugu tika sakratīta un turēta 30 min -20°C temperatūrā; pēc 30 min tika veikta centrifugēšana (14000 RPM/5 min); supernatants tika pārnesti citā 1,5 mL mēģenē un izmantots analīzē (Sievers Instruments Inc., 2001). Analītu koncentrāciju aprēķinos ņemts vērā atšķaidījums ar etilspirtu: koncentrācija (pēc analīzes datiem) = $1/3 * \text{koncentrācija (analizējamā plazmas paraugā)}$.

Veicot analīzi, tika iestādīts augstās jutības (ang. *High sensitivity*) detektora darba režīms: injicējamais tilpums - $50\mu\text{L}$; minimālais nosakāmais $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ daudzums – $1*10^{-12}$ mol (Sievers Instruments Inc., 2001).

Ņemot vērā ka NO_x^-/NO daudzumu attiecības (mol/mol), pēc reakciju vienādojumiem (1) un (2), ir 1/1, un pieņemot ka, pēc parauga ievadīšanas reakcijas kamerā (ang. *Purge vessel*), NO_x^- izreaģē pilnībā (kas tiek novērots eksperimentāli, piem. (Yang *et al.*, 1996)), var pieņemt ka NO_x^- daudzums paraugā (mol) ir vienāds ar NO daudzumu (mol), kas izdalās, pēc parauga ievadīšanas reakcijas kamerā. Tā kā parauga tilpums ir fiksēts lielums (injicējamais parauga tilpums - $50 \cdot 10^{-6}$ L) un minimālais nosakāmais NO daudzums ir zināms ($1 \cdot 10^{-12}$ mol), var aprēķināt minimālo NO_x^- koncentrāciju šķidra paraugā, kas atbilst minimālam nosakāma gāzveida NO daudzumam: $C_{\text{NO}_x^-} = 1 \cdot 10^{-12} \text{ mol} / 50 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 0,02 \text{ } \mu\text{M}$.

Rupjas mērījumu kļūdas tika konstatētas pēc 2σ kritērija (ang. *Empirical rule*), pie $\alpha = 0,05$. Iegūto rezultātu apstrāde tika veikta, izmantojot *MS Excel Data analysis* datorprogrammu, veicot standartkļūdu aprēķinus kontroles grupai un pētāmai grupai. Izmantojot Stjūdenta t-testus (*one-tailed, unpaired*), ANOVA (*one-way*) un Tukey-Kramera (*Post hoc*) testus, par statistiskā nozīmīguma robežu pieņemot $\alpha = 0,05$, tika noteikts vai atšķirības starp grupām ir statistiski nozīmīgas (Pezzullo, 2013). Standartnovirze (SD) un standartkļūda (SEM) tiek aprēķinātas pēc formulām (5) un (6):

$$(5) \quad SD = \sqrt{\frac{\sum_1^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

$$(6) \quad SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

X_i – i-tā eksperimentāli noteikta vērtība;

\bar{X} – vidējā vērtība;

N – kopējais mērījumu skaits;

Darbs sastāv no ievada, četrām nodaļām, rezultātiem, secinājumiem, izmantotās literatūras saraksta un trīs pielikumiem. Darbā ir 5 attēli un 4 tabulas.

1. NO BIOĶĪMISKĀS REAKCIJAS UN FIZIOLOĢISKĀ NOZĪME

Slāpekļa (II) oksīds (NO) ir brīvais radikālis, kuram piemīt vairākas fizioloģiskās funkcijas. Cilvēku organismā NO tiek sintezēts no aminoskābes L-arginīna, kura tiek pārvērsta par L-citrulīnu un slāpekļa (II) oksīdu. Reakciju katalīzē NO-sintāžu (NOS) grupas enzīmi (Habib and Ali, 2011).

NOS ir sastopamas triju izoformu veidā. Neurotransmisijā piedalās NOS1 jeb neironāla NO-sintāze (nNOS). Iekaisuma šūnās tiek ekspresēta NO-sintāze 2 (iNOS; NOS2). Asinsvadu endotēlijā ir atrodamā NOS3 (eNOS) (Habib and Ali, 2011). Atkarībā no tā, vai izoforma tiek ekspresēta visos vai tikai noteiktā šūnas dzīves momentā, NOS iedala konstitutīvās, jeb Ca^{2+} -atkarīgās (cNOS), un inducējamās, jeb Ca^{2+} -neatkarīgās (iNOS) (Moncada, Palmer and Higgs, 1991). nNOS un eNOS ir konstitutīvās izoformas. Tie nodrošina īslaicīgu NO produkciju, kam ir nepieciešama palielināta Ca^{2+} koncentrācija un papildus aktivācija ar regulatoro proteīnu, kalmodulīnu (Bredt and Snyder, 1992). NOS2 eksistē stabilā kompleksā ar kalmodulīnu, un tās aktivitāte tiek mainīta iekaisuma citokīnu vai lipopolisaharīdu ietekmē, mainoties ekspresijas intensitātei. iNOS galvenokārt tiek ekspresēta makrofāgos, neitrofilos leukocītos un epitēlija šūnās (Gordge, 1998; Wink *et al.*, 1998; Habib and Ali, 2011). Pēc literatūras datiem cNOS producē NO 1,0 μ M koncentrācijā asinsvadu endotēlijā un 5,0 μ M koncentrācijā nervu sistēmā. Savukārt iNOS producē NO ap 10 μ M koncentrācijā (Gordge, 1998).

Slāpekļa monoksīds reaģē ar tām molekulām, kuram ir nesapāroti elektroni, piemēram citiem brīviem radikāļiem un, enzīmu aktīvos centros esošiem, pārejas metālu joniem (Padmaja and Huie, 1993). NO reaģētspēju nosaka mazs izmērs, augsts difūzijas ātrums un lipofilitāte. Slāpekļa (II) oksīda reakciju produkti arī spēj reaģēt ar bioloģiskām molekulām, kas ir asociēti ar NO toksicitāti (Hughes, 2008). Slāpekļa monoksīda reakcijas šūnu līmenī iedala trijos posmos (Tamir, Burney and Tannenbaum, 1996): difūzija; NO reakcijas intracelulārā vidē; sekundāras jeb NO biotransformācijas produktu reakcijas.

Difūzijas stadijā slāpekļa monoksīds iziet caur šūnas membrānu (neatvieglota difūzija) un reaģē ar šūnas struktūrelementiem (Kwon, Stuehr and Nathan, 1991; Roy *et al.*, 1995; Habib and Ali, 2011). Intracelulārā vidē var notikt NO autooksidācija par N_2O_3 . Ūdenī N_2O_3 sadalās, veidojot HNO_2 (Habib and Ali, 2011). Papildus var notikt NO oksidēšana ar O_2 , veidojot NO_2 , kas tālāk reaģē ar ūdeni, disproportionējot par NO^- un NO_3^- (Hughes, Nicklin and Sackrulle, 1971).

Reakcijā ar superoksīdanjonu ($O_2^{\cdot-}$) notiek peroksinitrīta veidošanās. Peroksinitrīts ($ONOO^-$) ir stiprs oksidētājs, kas spēj reaģēt ar daudzām biomolekulām (Pfeiffer, Mayer and Hemmens, 1999). $ONOO^-$ inaktivācija var notikt arī reakcijā ar CO_2 , kurā veidojas nitrozoperoksikarbonāts ($ONOOOCO_2^-$), kas sadalās par NO_3^- un CO_2 (Uppu, Squadrito and Pryor, 1996).

Atkarībā no NO koncentrācijas, kinētiskais faktors (reakcijas ātrums) tiek izmantots lai atdalītu reakcijas, kas tiek uzskatītas par svarīgām *in vivo* (Wink and Mitchell, 1998). Piemēram, *in vivo* sastopamās koncentrācijās, NO pietiekāmi ātri reaģē ar metālu kompleksiem, veidojot nitrozokompleksus. Daudziem no tiem, piemēram, Fe-NO kompleksiem, piemīt izteikta stabilitāte. Papildus, slāpekļa monoksīds var reaģēt ar metālu oksokompleksiem (metāls ir koordinēts ar $O_2^{\cdot-}$) un metaloksokompleksiem (O ir bidentāts ligands, kas ir saistīts ar vienu vai diviem kompleksveidotāja atomiem) (Wink and Mitchell, 1998). Vēl NO spēj saistīties ar hipervalentiem metālu- H_2O_2 kompleksiem, un tos reducēt (Puppo and Halliwell, 1988). NO, reaģējot ar, enzīmu aktīvā centrā esošiem, pārejas metālu joniem un, brīvo radikāļu tipa, katalītiskā cikla starpproduktiem, spēj darboties kā atgriezeniskais inhibitors (Beckman and Koppenol, 1996). Visbeidzot, tika atklāts ka NO var piedalīties nukleofilo centru nitrozēšanā, kas noved pie S-nitrozotolu veidošanās (Mohr, Stamler and Brüne, 1994).

Sekundāro NO efektu pamatā ir oksidēšanas un nitrozēšanas reakcijas. Nitrozēšanas procesā reaģētspējīgas slāpekļa oksīda daļiņas (RNOS) darbojas kā NO donors attiecībā pret nukleofilām grupām (piem. tioliem un amīniem) (Habib and Ali, 2011). Nitrozēšanas reakciju kopumu definē kā nitrozatīvo stresu. Pie oksidēšanas reakcijām ir pieskaitāma hidroksilēšana un tieša elektronu atņemšana no bioloģiskiem substrātiem (Watanabe *et al.*, 2001). Peroksinitrīts ir pamata NO bioķīmiskās konversijas produkts, kuram piemīt citotoksiskā iedarbība. Intracelulāri $ONOO^-$ veidojas mitohondrijos, kur notiek intensīvāka superoksīdanjona ($O_2^{\cdot-}$) veidošanās. NO ir lipofils un koncentrējas mitohondriju lipīdu membrānā. Līdz ar to, membrānas tuvumā, realizējās peroksinitrīta veidošanās (Wink and Mitchell, 1998).

Ir trīs pamata mehānismi, kas skaidro NO/peroksinitrīta izraisītus DNS bojājumus: aminogrupu nitrozēšana; DNS reparācijas enzīmu inhibēšana; tieša DNS modifikācija reakcijās ar NO oksidēšanas produktiem (Wink *et al.*, 1998). Gan prokariotu gan eikariotu šūnām nonākot kontaktā ar NO, notiek nukleotīdu deaminēšana caur N-nitrozēšanas starpposmu. NO-atkarīgas deaminēšanas piemēri ir citozīna pārvēršana par uracilu, guanīna pārvēršana par ksantīnu, adenīna konversija par hipoksantīnu un metilcitozīna konversija par timīnu. DNS bojājumi ir tieši saistīti ar $ONOO^-$ veidošanu (Merchant *et al.*, 1996; Wink *et al.*, 1997).

Slāpekļa (II) oksīda vielmaiņas produkti spēj reaģēt arī ar aminoskābēm, ietekmējot signālproteīnu un enzīmu funkcijas (Pfeiffer, Mayer and Hemmens, 1999). Šī parādības pamatā ir aromātisko aminoskābju, piemēram L-tirozīna, *meta*-nitrēšana. Nitrēšanas reakcijas notiek ar peroksinitrītu, slāpekļa (IV) oksīdu, HNO₂ un citiem nitronija jona (NO₂⁺) donoriem (Beckman, 1996). Fosforilāzes (proteīn-kināzes) un fosfatāzes, kas nodrošina intracelulāro signālu pārneši katalizējot aminoskābju fosforilēšanas un defosforilēšanas reakcijas, tiek inaktivētas pēc tirozīna nitrēšanas. Nitrotirozīnu saturošie proteīni kalpo par audu bojājumu indikatoru nitrozatīva stresa ietekmē (Sampson *et al.*, 1998).

Fizioloģiskos apstākļos slāpekļa monoksīdam piemīt izteikts kardioprotektīvais efekts. Spēja mazināt sirds un asinsvadu slimību progresiju pamatojas uz asins spiediena un asinsvadu tonusa regulāciju, trombocītu agregācijas un limfocītu adhēzijas inhibēšanu. Papildus novēro antiproliferatīvo iedarbību uz asinsvadu glūdas muskulatūras šūnām (Naseem, 2005). NO darbojas kā signālmolekula leiomiocītos un neironos, aktivējot šķīstošo guanil-ciklāzi (sGC). sGC katalizē 3'-5' guanozīna monofosfāta (cGMP) veidošanu no guanozīna-5'-trifosfāta (GTP). Tas ir starpposms starp NO un proteīn-kināžu, fosfodiezterāžu, jonu kanālu un citu celulāras atbildes komponentu aktivāciju (Pfeiffer, Mayer and Hemmens, 1999). Zemā koncentrācijā NO darbojas citoprotektīvi, piemēram, aizsargājot audus no peroksidācijas, inaktivējot enzīmu aktīvus centrus - metālu oksokompleksus (Kanner, Harel and Rina, 1991). Papildus tika parādīts ka slāpekļa monoksīds darbojas kā lipīdu oksigenāžu inhibitors (Kanner, Harel and Granit, 1992). Tika noteikts ka NO spēj tieši saistīties ar brīviem radikāļiem, veicinot to detoksifikāciju (Wink and Ford, 1995).

iNOS tiek ekspresēta aktivētos makrofāgos, kas nosaka intensīvo NO un RNOS produkciju *in vivo*. Rezultātā, hroniskā iekaisuma apstākļos ir detektējami aminu nitrozēšanas produkti (Marletta, 1988; Miles *et al.*, 1995). Augstās koncentrācijās slāpekļa (II) oksīdam piemīt citotoksiskās īpašības – tas ir iesaistīts audzēju attīstībā un angiogēnēzē (Paradise *et al.*, 2010). Tika eksperimentāli noteikts ka lielas NO koncentrācijas ir asociētas ar glutamātu-induceto neirotoksicitāti kortikālo un striatālo neironu kultūrās (Dawson *et al.*, 1991). Citā *in vitro* modelī tika parādīts, ka NO spēj izsaukt šūnu apoptozi (Albina *et al.*, 1993). Ciklooksigenāze, hemoproteīns, kas ir nepieciešams prostaglandīnu sintēzei no arahidonskābes, tiek aktivēts NO un hema dzelzs atoma mijiedarbības rezultātā, veicinot iekaisuma procesa intensitātes pieaugumu (Cuzzocrea and Salvemini, 2007). Vēl NO spēj reaģēt ar oksihemoglobīnu (Fe³⁺), reducējot to par methemoglobīnu (Fe²⁺), traucējot O₂ piegādi audiem (Habib and Ali, 2011). Līdzsvars starp oksidatīvo stresu veicinošo un mazinošo ietekmi ir atkarīgs no NO un superoksīdanjona produkcijas intensitāšu attiecības (Darley-Usmar, Wiseman and Halliwell, 1995).

Kopumā, var secināt ka NO piemīt svarīgā loma gan fizioloģiskos gan patofizioloģiskos procesos, kas notiek cilvēku organismā. Tās efektu pamatā ir sarežģīts ķīmisko pārvērtību kopums, kur bioloģisko aktivitāti noteicošais faktors ir NO un tās biotransformācijas produktu koncentrācija. Endogēnā NO produkcija tiek regulēta gan šūnu signālceļu intermediātiem (piem. Ca^{2+}) mainot NOS (cNOS) aktivitāti, gan regulējot NOS ekspresiju (iNOS).

2. IESKATS MULTIPLĀS SKLEROZES PATOĢENĒZĒ

Multiplā skleroze (MS) ir kompleksā saslimšana ar izteikto autoimūno komponentu. Uzskata ka tā tiek iniciēta, noteiktiem vides faktoriem iedarbojoties uz ģenētiski-predisponēto indivīdu (Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). Izšķir trīs MS stadijas: preklīniskā, kad slimības pazīmes ir detektējamas tikai veicot MRA izmeklējumu; remitējoši-recidivējoša forma, kas raksturojas ar neiroloģiskās disfunkcijas epizodēm un remisijas periodiem; progresējoša MS, kas parasti attīstās no recidivējošas formas, un pie kuras novēro fiziskās un garīgās mazspējas vienmērīgu progresiju (Ghasemi, Razavi and Nikzad, 2017; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). PrMS var sākties arī kā primārā progresējoša MS, bet no MRA izmeklējumu datiem ir zināms ka, vairumā gadījumu, primāra PrMS attīstās kā sekundāra patoloģija RRMS slimniekiem, kuriem recidivējoša forma progresēja bez klīniski detektējamiem recidīvu gadījumiem (Uitdehaag *et al.*, 2011; Lublin *et al.*, 2014).

Uzskata ka MS patoģenēzes pamatā ir imūno šūnu infiltrācija no perifēriskām asinīm, cauri hematoencefālisko barjeru, uz CNS. IFN γ un IL-17 producējošas, CD4+ T-šūnas tiek uzskatītas par MS iniciatoriem (Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). Peļu EAE modeļos IL-17 ir asociēts ar autoimūnām reakcijām, kamēr IFN γ piemīt protektīvais efekts. Cilvēkiem gan IFN γ gan IL-17 pastiprināta ekspresija ir asociēta ar MS (Lock *et al.*, 2002; Berghmans, Dillen and Heremans, 2006). Šo ideju sauc par “*outside-in*” hipotēzi, pretī “*inside-out*” hipotēzei, pēc kuras MS sākas no CNS (Malpass, 2012). Kad autoreaktīvie CD4+ T-limfocīti iekļūst CNS, tie mijiedarbojas ar antigēn-prezentējošām šūnām (piem. mikrogliju). Tam seko citokīnu sekrēcija, kas veicina papildus citotoksisko un antigēn-prezentējošo šūnu (piem. CD8+ T-limfocītu, vēlāk arī makrofāgu) piesaisti no perifēriskām asinīm, kas noved pie CNS bojājumu progresijas (Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018).

Tomēr ir svarīgi atzīmēt ka CD4+ T-šūnu klase ietver arī Treg un Tr1 jeb regulējošas T-šūnu populācijas, kas darbojas, ierobežojot iekaisuma procesa norisi un palēninot slimības attīstību. Tr1 un Treg tiek aktivēti ar normāliem organisma antigēniem (ang. *Self-antigen*) un izdala IL-10, kas ir pretiekaisuma citokīns (Sakaguchi *et al.*, 2001; Pacholczyk and Kern, 2008)

CD8+ limfocītu citotoksicitāte ir viens no pamatfaktoriem, kas nosaka oligodendrocītu nāvi, neironu aksonu bojājumus (aksonālo deģenerāciju) un neiroloģiskās disfunkcijas progresiju pie MS (McFarland and Martin, 2007; Palumbo, 2017; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). CD8+ T-šūnas, caur MHC-I (ang. *Major Histocompatibility Complex class I*) atpazīst organismam raksturīgo (endogeno) intracelulāro proteīnu fragmentus, un nogalina šūnas caur kontakt-atkarīgo procesu, kura pamatā ir proteolītisko enzīmu (granzīmu A un B) darbība (Barry and Bleackley, 2002).

Papildus, CD8+ limfocīti sekretē iekaisuma citokīnus – IL-17 un IFN γ , un var producēt FasL (ang. *Fas ligand*). FasL spēj iniciēt oligodendrocītu apoptozi, saistoties ar TNF tipa receptoriem uz šūnu virsmas. Šādā veidā tiek samazināts mielīnu producējošo šūnu skaits un remielinizācijas efektivitāte (Volpe *et al.*, 2016).

Paralēli novēro imūnmodulējošo struktūru aktivāciju CNS – ar mērķi ierobežot iekaisumu un iniciēt audu reparācijas procesus. Tas noved pie, vismaz daļējās, remielinizācijas, kas tiek asociēta ar klīnisko remisiju RRMS pacientiem (Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). Piemēram, dažos pētījumos, tiek raksturots CD8+ T-šūnu apakštips, kas var inhibēt imūno atbildi un nomākt slimības aktivitāti. Šīs šūnas individualizē pēc unikāla antigēnu komplekta: CD122, CD28, CD103 vai HLA-G (Uss *et al.*, 2006; Lozano *et al.*, 2009; Lu* *et al.*, 2016; Vuddamalay and van Meerwijk, 2017).

NK (CD56^{bright}) šūnas ir iedzimtās, perifēriskās imūnsistēmas komponents, kas spēj darboties gan veicinot (TNF α , IFN γ) gan mazinot (IL-4, IL-10) iekaisumu (Schleinitz *et al.*, 2010). Literatūras dati liecina par NK imūnoregulējošo funkciju MS gadījumā – šūnu skaits pozitīvi korelē ar remisijas ilgumu un negatīvi ar recidīva iestāšanās risku (Infante-Duarte *et al.*, 2005; Morandi *et al.*, 2008). NK skaita palielinājums ir viens no faktoriem, ar kuru skaidro IFN β un daklizumaba efektivitāti pie RRMS (Bielekova *et al.*, 2006; Saraste, Irjala and Airas, 2007). Neārstētiem MS pacientiem NK inhibējoša ietekme uz T-šūnām ir samazināta, ko saista ar HLA-E ekspresiju T-limfocītos. HLA-E darbojas kā NK-inhibējošs ligands (Gross *et al.*, 2016).

Gan RRMS, gan PrMS (sākuma periodā) patoloģijas pamatā, ir imunoloģiskie (primārie) mehānismi. Patogēnēzes kontekstā, progresējoša forma atšķiras no recidivējošas ar hronisko, no neskartiem audiem nodalīto (kompartimentalizēto), iekaisuma procesu smadzeņu apvalkos un parenhīmā (funkcionālos CNS audos). RRMS gadījumā, iekaisuma procesam ir raksturīgas aktivācijas un remisijas stadijas, un CNS audu iekaisuma raksturs ir tuvāks akūtām (Dendrou, Fugger and Friese, 2015; Ghasemi, Razavi and Nikzad, 2017; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018).

Pacientiem ar progresējošu MS, īpaši vēlākos posmos, patoloģisko izmaiņu attīstību nosaka ar perifērisko imūno sistēmu tieši nesaistītie (sekundārie) mehānismi. Šo mehānismu klāsts ietver mitohondriju bojājumus, Fe³⁺ jonu akumulāciju un ar tiem saistīto oksidatīvo stresu, jonu kanālu disfunkcijas, glutamāt-atkarīgo uzbudinājuma toksicitāti, intra-aksonālo Ca²⁺ pārkāpumu, audu hipoksiju un aksonāla transporta defektus (Mahad, Trapp and Lassmann, 2015; Liddelov *et al.*, 2017).

Papildus, PrMS pacientiem tika konstatētas specifiskas izmaiņas perifēriskā imūnā sistēmā: pastiprināta IFN γ producēšana, kas kļūst raksturīga T-šūnu klasei nepiederīgām šūnām; palielināts antigēn-prezentējošo, mieloīdo dendrītisko šūnu skaits, kurām tiek ekspresēts CD80 antigēns un notiek IL-12 un TNF α sekrēcija (Balashov *et al.*, 1997; Karni *et al.*, 2006).

Pieminētās atšķirības ļauj, vismaz daļēji, izskaidrot, kāpēc ne visas zāles, kas ir nomērķētas uz adaptīvo, perifērisko imūnsistēmu un ir efektīvas RRMS pacientiem, rāda uzlabojumu arī PrMS gadījumā (Dendrou, Fugger and Friese, 2015; Ghasemi, Razavi and Nikzad, 2017; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018).

Kamēr perifēriskā, celulārā imunitāte (T-šūnas) ir noteicoša RRMS patoģenēzē, CNS iedzimtā celulārā imunitāte (mikroglija un astrocīti), kopā ar B-šūnām, ir pamata imunoloģiskais komponents PrMS gadījumā (Merrill *et al.*, 1993; Duddy *et al.*, 2007). B-šūnas spēj šķērsot HEB un akumulēties CNS, limfmezgliem līdzīgās struktūrās, kas ir atrodamas smadzeņu apvalkā, smadzeņu garozas bojājumu vietu tuvumā. Šie šūnu agregāti tiek nosaukti par ektopiskiem germināliem centriem – veicot MRA izmeklējumu sekundāras PrMS slimniekiem, tos atklāj 67% gadījumos (Serafini *et al.*, 2004; Cross *et al.*, 2006; Selter *et al.*, 2013; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). Smadzeņu apvalku germinālos centros B-šūnas atrodas kopā ar citām imūnšūnu populācijām (Hauser *et al.*, 1986; Kouchaki *et al.*, 2014). B-limfocīti veicina MS attīstību, sekretējot iekaisuma citokīnus (IL-6, IL-12) un aktivējot CD8+ T-šūnas caur antigēnu prezentēšanu. T-šūnu aktivējošas CD20+ B-šūnas (antigēn-prezentējošas atmiņas šūnas) ir viens no potenciāliem MS terapijas mērķiem. CD20+ populācijas aktivitātes samazināšana tiek asociēta ar mazākiem CNS bojājuma apgabaliem, spriežot pēc MRA izmeklējumu rezultātiem. Šo efektivitāti saista ar palielināto IL-10 un samazināto IL-12 un IL-6 sekrēciju (Hauser, Chan and Oksenberg, 2013).

Izdala atsevišķo B-šūnu grupu, Bregs, kurai piemīt pretiekaisuma darbība. Šie limfocīti tiek identificēti pēc augstas IL-10 produkcijas, jo tiem nav specifisko antigēnu un transkripcijas faktoru. To darbības pamatā ir IL-10, TGF β (ang. *Tumor growth factor*) un PD-L1 (ang. *Programmed-death ligand*) stimulējošais efekts uz regulējošām Tr1 un Tregs šūnām, kā arī efektoro T-šūnu (CD4+, CD8+) nogalināšana ar GzmB proteāžu citotoksicitātes starpniecību (Iwata *et al.*, 2011; Mauri and Menon, 2015; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). MS slimniekiem Bregs šūnu skaits un to sekretorā aktivitāte ir samazināti (Flores-Borja *et al.*, 2013).

Uzskata ka hroniskie iekaisuma procesi smadzeņu apvalkos maina asins-smadzeņu barjeras caurlaidību attiecībā uz perifēriskās imūnsistēmas šūnām. Piemērām, tika atklāts ka, MS gadījumā, CD8+ T-limfocītiem tiek atvieglota nokļūšana CNS, ko demonstrē cilvēku un peļu šūnu pētījumi (Duan *et al.*, 2013; Larochelle *et al.*, 2015). Smadzeņu apvalku iekaisums ir uzskatāms arī par vienu no kortikālo aksonu demielinēšanas iemesliem – iekaisuma citokīniem difundējot dziļākos CNS audos (Serafini *et al.*, 2004; Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018).

Vēlākos posmos, PrMS pacientiem konstatē B-šūnu diferenciācijas centru (ektopisko germinālo centru) un perifēriskās imūnsistēmas šūnu koncentrēšanas apgabalu (folikulu-tipa struktūru) veidošanu CNS. Šo struktūru eksistence liecina par B-šūnu spēju veikt klonālo (pēc *self*-antigēniem selektīvo) pavairošanu un diferenciāciju par antivielas producējošām šūnām (plazmas šūnām), pēc nonākšanas CSŠ (Serafini *et al.*, 2004; Magliozzi *et al.*, 2007). Ektopiskos centros iekaisuma procesu norisi nosaka gan B-šūnu un efektoro T-šūnu, gan naturālo killeru (NK) un CNS mikroglijas šūnu populāciju aktivitāte (Baecher-Allan, Kaskow and Weiner, 2018). Savukārt folikulu tipa struktūrās, pārsvarā, ir atrodami CD4+ un CD8+ T-limfocīti (Hauser *et al.*, 1986; Kouchaki *et al.*, 2014).

Antivielas, kas ir nomērķētas pret vairākām, uz CNS šūnu virsmas atrodamām, molekulām, atklāj PrMS pacientu CSŠ 95% gadījumos. Šādas antivielas tiek sekrētētas no klonāli-pavairotām plazmas šūnām (diferencētiem B-limfocītiem) (Heidelberger, Kabat and Mayer, 1942; Schirmer, Srivastava and Hemmer, 2014). Lielākai daļai antivielu mērķi nav zināmi, kamēr dažas specifiski saistās ar intracelulāriem proteīniem, kas tiek izdalīti notiekot citolīzei pie CNS audu destruktijas (Brändle *et al.*, 2016). Mielīn-reaktīvo antivielu daudzums un klonāli-pavairoto CD20+ B-šūnu skaits CSŠ ir asociēti ar agresīvākām MS formām (Cepok, 2001; Villar *et al.*, 2005).

Mikroglija – smadzenēs lokalizēts iedzimtās imunitātes komponents (CNS makrofāgi), MS gadījumā, tiek aktivēta. Šīs šūnas spēj izdalīt iekaisumu veicinošus citokīnus, skābekļa reaģētspējīgus intermediātus un proteīnāzes, kā arī aktivēt komplementa sistēmu (Lassmann, 2012; Liddelow *et al.*, 2017). Fizioloģiskos apstākļos mikroglijai var izpausties arī neuroprotektīvie, imūnosupresorie fenotipi, piemērām, pastiprināta indolamīna-2,3-dioksiģenāzes ekspresija, kas regulē triptofāna metabolismu un stimulē iekaisumu apturošas vides veidošanos. Tomēr, MS gadījumā, mikroglija, visbiežāk, zaudē homeostāzi uzturošo fenotipu (Kwidzinski *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2017).

Astrocīti, kas ir iesaistīti vairāku CNS funkciju veikšanā, piemērām, homeostāzes uzturēšanā sinapsēs, neurotransmisijas regulācijā, fagocitozē un HEB veidošanā (Minhas, Bansal and Bansal, 2019), arī piedalās MS patoģenēzē.

Neirotoksisko astrocītu apakšpopulācijas (A1 astrocītu) aktivitāti pastiprina mikroglija. A1 astrocīti producē citotoksiskās molekulas, piemēram NO un TNF α , kā arī veicina neirotoksisko monocītu (leikocītu, makrofāgu) migrāciju CNS (Liddelov *et al.*, 2017).

Oligodendrocīti, astrocīti un neironi MS slimniekiem pastiprināti ekspresē MHC-I un MHC-II (Hila, Soane and Koski, 2001). Mikroglijas šūnām arī piemīt spēja kross-prezentēt (ang. *Cross-presentation*) eksogēnus antigēnus MHC-I kompleksā, kas ir viens no iespējamajiem mielīn-reaktīvo CD8+ T-šūnu klonālas pavairošanas iemesliem pie MS (Zang *et al.*, 2004).

Apkopojot, var secināt ka MS patoģenēzes pamatā ir CNS autoimūnais iekaisuma process, kura aktivitāte un raksturs variē atkarībā no iekaisumu veicinošo un ierobežojošo šūnu populāciju kompleksās mijiedarbības. Sarežģīts mijiedarbības raksturs apgrūtina terapeitiskās intervences punktu izvēli un rezultātu prognozēšanu. Ar to var pamatot, kāpēc slimība pašlaik nav izārstējama. Situāciju papildus apgrūtina imūnšūnu populāciju proporciju variācijas un gēnu polimorfisms MS pacientu populācija, ka arī katram pacientam individuālie faktori (piem. vecums, dzimums, paralēlas slimības u.c.). Analogiskā veidā var skaidrot arī DMT terapijas efektivitātes atšķirības starp MS pacientu grupām un arī starp konkrētiem pacientiem.

3. NO LOMA MULTIPLĀS SKLEROZES PATOĢĒNĒZĒ

Slāpekļa (II) oksīdam piemīt svarīga loma vairākās cilvēka slimībās. NO efekti variē atkarībā no koncentrācijas, kā arī no tālākā signālu kaskādē iesaistīto molekulu esamības un veida (Yuste *et al.*, 2015). Paaugstināta NO koncentrācija centrālā nervu sistēmā ir asociēta ar MS progresiju. Nitrozatīvais stress MS pacientiem tiek saistīts ar progresējošiem mielīna apvalku un aksonu bojājumiem galvas un muguras smadzenēs (Shivane and Chakrabarty, 2007). Literatūrā tika pieminēti vairāki mehānismi, kas skaidro NO spēju ietekmēt mitohondriālo enerģijas produkciju (Broadwater *et al.*, 2011; Witte *et al.*, 2014).

MS gadījumā, monocīti no perifēriskām asinīm spēj nonākt CNS un diferencēties par makrofāgiem. Tie, savukārt, spēj producēt vairākus iekaisuma mediatorus, ieskaitot reaģētspējīgas skābekļa daļiņas (ROS) un NO (Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2009; D'Souza *et al.*, 2016). NO, ar cGMP stārniecību, var veicināt Ca^{2+} koncentrācijas pieaugumu citozolā, kas ietekmē homeostāzes uzturēšanas mehānismus un šūnas fizioloģiskās funkcijas (Li, Sul and Haydon, 2003). Mitohondriji piedalās šūnas kalcija bilances regulācijā (Ruiz, Matute and Alberdi, 2010). Ca^{2+} akumulācija oligodendrocītu citozolā veicina mitohondriju funkciju traucējumu attīstību. Efekts pamatojas uz skābekļa radikāļu inaktivācijas inhibēšanu, ko saista ar, Ca^{2+} -atkarīgo, mitohondriālas citohroma-oksīdāžu sistēmas disfunkciju (Correale and Farez, 2015; Lan *et al.*, 2017). Akumulētie skābekļa radikāļi veicina šūnu lipīdu peroksidāciju, kas noved pie demielinēšanas.

Dati liecina ka glutamāta receptoru stimulācija ir viens no veidiem kā kalcija joni var ieplūst oligodendrocītu šūnā un stimulēt iNOS ekspresiju (Bolton and Paul, 2006; Centonze *et al.*, 2010; Stojanovic, Kostic and Ljubisavljevic, 2014). Oksidatīvais stress, proti ROS un reaģētspējīgas slāpekļa oksīda daļiņas, kuras producē mikroglija, veicina glutamāta izvadtransportieru ekspresijas nomākšanu oligodendrocītos, pastiprinot uzbudinājuma toksiskuma efektus (Bolton and Paul, 2006; Matute, Domercq and Sánchez-Gómez, 2006; Su *et al.*, 2009; Centonze *et al.*, 2010; Marinelli *et al.*, 2016).

Papildus, pie NO koncentrācijas pieauguma, novēro aksonu pārrāvumus. Iespējamais mehānisms, kas to izskaidro, ir saistīts ar Na^{+}/Ca^{2+} antiporteriem (NCX) mitohondrijos (Black *et al.*, 2006; Kapoor, 2008). Fizioloģiskā NCX loma neironos ir Ca^{2+} jonu uzņemšana mitohondrijos, ievadot Na^{+} jonus citozolā. Pieaugot Na^{+} intracelulārai koncentrācijai (piem., pārmērīgas glutamāta receptoru stimulācijas rezultātā), NCX var sākt darboties pretējā virzienā, kas noved pie kalcija jonu akumulācijas aksonā un uzbudinājuma toksiskuma efektiem (Craner *et al.*, 2004; Persson *et al.*, 2013).

Tika izteikta doma ka NO spēj inducēt aksonu bojājumus, inhibējot mitohondriālas elpošanas reakcijas. ATF deficīts arī veicina Na⁺ koncentrācijas pieauguma aksonos (Grigoriadis *et al.*, 2004). Ideja par to ka NCX piemīt svarīga lomā MS patoģenēzē, tika eksperimentāli atbalstīta, pētot EAE un aksonālas deģenerācijas smagumu *wild-type* un NCX-β2-*knockout* pelēm. Dzīvniekiem, kuriem netiek sintezēta Na⁺/Ca²⁺ kanāla β2 subvienība, novēroja mazāku EAE intensitāti un deģenerācijas intensitāti (O'Malley *et al.*, 2009; Zindler and Zipp, 2010). Papildus tika konstatēts ka Na⁺ kanālu blokatori, piemēram, flekainīds, var mazināt neironu un aksonu deģenerāciju dzīvnieku neuroiekaisuma modeļi (Bechtold *et al.*, 2005; Smith, 2006).

NO un iekaisuma citokīni spēj veicināt šūnu bojāeju apoptozes, nekrozes un autofāģijas ceļos (Mitrovic *et al.*, 1995). Apoptoze ir primārais oligodendrocītu nāves mehānisms, kas tiek iniciēts ar NO starpniecību (Chakraborti *et al.*, 1999). Sekundāri, oksidatīva stresa ietekmē, šūnu nāve var notikt nekrozes ceļā (Mitrovic *et al.*, 1995). Kā jau iepriekš tika pieminēts, primārais mitohondriju disfunkcijas efekts ir adenozintrifosfāta (ATF) produkcijas inhibēšana (Sas *et al.*, 2007). Oksidatīvais un nitrozatīvais stress veicina šūnu bojāejas/izdzīvošanas līdzsvara novirzi nāves virzienā (Wang, Lee and Wang, 2014). Elpošanas ķēdes kompleksu bojājumi mitohondrijos var novest pie intensīvākas brīvo radikāļu producēšanas. Rezultātā, ilgstoši saglabājoties ATF deficītam un oksidatīvam stresam, mitohondriju membrānas integritāte tiek izjaukta – veidojas mPTP (ang. *Mitochondrial permeability transition pore*) (Kalman and Leist, 2003; Sas *et al.*, 2007). Caur mPTP no mitohondrijām citozolā iznāk citohroma C proteīns, kas iniciē šūnu apoptozi, aktivējot vienu no šūnu “programmētas nāves” enzīmu (kaspāžu) kaskādēm (Narita *et al.*, 1998; Rolo *et al.*, 2003; Heck *et al.*, 2005; Mullauer, Kessler and Medema, 2009; Huang *et al.*, 2014).

Literatūrā ir liecinājumi par specifisku NO toksiskuma mehānismu attiecībā uz neironu aksoniem. Oligodendrocīti spēj saņemt glikozi no asinīm un piegādāt laktātu neironiem, kur tas tiek patērēts ATF producēšanai (Schurr and Rigor, 1998; Amaral *et al.*, 2013; Philips and Rothstein, 2017). Polāro karbonskābju anjonu, t.s. arī laktāta, transportu neironos nodrošina monokarboksilāta transportieris 1 (MCT1) (Rinholm and Bergersen, 2012). Ir dati ka NO spēj ietekmēt MCT1 funkcijas, veicinot tās nitrozēšanu (Diers *et al.*, 2014). Tiek izvirzīta hipotēze, ka šādā veidā tiek traucēta substrātu plūsma enerģijas producēšanai neironos. Tas, savukārt, noved pie aksonālas deģenerācijas (Cambron *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2017).

Kopumā, var secināt ka, MS gadījumā, NO-atkarīga citotoksicitāte noved pie oksidatīva un nitrozatīva stresa MS bojājuma apgabalos pēc vairākiem mehānismiem, kas kopā izveido kaut-ko līdzīgu pozitīvās atgriezeniskās saites mehānismam.

Imūnšūnu izdalītais NO un ROS izjauc glutamāt-atkarīgas neurotransmisijas regulāciju un tieši veicina Ca^{2+} ieplūšanu CNS šūnās. Rezultātā Ca^{2+} joni aktīvāk ieplūst neironu un oligodendrocītu citoplazmā, aktivējot iNOS ekspresiju un veicinot ROS produkciju. Paralēla Na^+ jonu ieplūšana veicina papildus Ca^{2+} jonu ieplūšanu šūnā (no mitohondrijām); tas noved pie vēl aktīvākas NO un ROS produkcijas, un vēl izteiktākā oksidatīvā stresa – Ca^{2+} , NO, peroksinitrīta un ROS ietekmē tiek inhibēti ATF producējošie enzīmi (Correale and Farez, 2015; Lan *et al.*, 2017). Rezultātā notiek lipīdu peroksidācija un attīstās DNS bojājumi, kas noved pie neironu un oligodendrocītu bojāejas, apoptozes vai nekrozes ceļā.

4. MODIFICĒJOŠĀS TERAPIJAS STRATĒGIJAS PIE MS

Šobrīd MS nav izārstējama ne ar vienu no pieejamiem terapijas variantiem. Pārsvārā farmakoloģiskie līdzekļi darbojas preventīvi, mazinot simptomus un uzlabojot slimnieku dzīves kvalitāti (Schapiro, 2009; MFMER, 2019). Agrīnā iekaisuma procesa atpazīšana ļauj pacientam uzsākt terapiju ar slimību modificējošiem preparātiem vēl pirms tiek uzstādīta MS diagnoze, aizkavējot funkcionālo traucējumu iestāšanās brīdi (Miller, 2004).

Visi DMT iedarbojas uz imūno sistēmu, modulējot vai ihnibējot tās komponentus dažādos līmeņos un pēc atšķirīgiem mehānismiem. To efektivitāte, drošums un panesamība variē plašās robežās (Gitto, 2017).

Pirmās izvēles līdzekļi, parasti, darbojas ar mēreno efektivitāti un ir drošāki. Pie šīs grupas pieskaita interferonu- β (IFN β) grupu, glatiramēra acetātu, teriflunomīdu un dimetilfumarātu. Otrās izvēles preparāti tiek pielietoti kad pirmās izvēles līdzekļu izmantošana nesniedz apmierinošus rezultātus. Tiem ir raksturīga lielāka efektivitāte un augstāki riski. Otrās izvēles preparātu piemēri ir natalizumabs, alemtuzumabs, mitoksantrons (Gajofatto and Benedetti, 2015; Gitto, 2017).

Kortikosteroīdi un metotreksāts tiek pielietoti RRMS un PrMS formu terapijā, lai mazinātu limfocītu proliferāciju un iekaisumu veicinošo citokīnu sekrēciju (glikokortikoīdi) un samazināt mielīna noārdīšanu un iekaisuma citokīnu sekrēciju no makrofāgiem (metotreksāts) (Gitto, 2017). Fingolimods ir apstiprināts kā otrās izvēles līdzeklis Eiropā un pirmās izvēles līdzeklis ASV, Kanādā un citās valstīs. Azatioprīns un ciklofosfamīds nav reģistrēti MS ārstēšanai, bet tiek lietoti kā, atbilstoši, pirmās un otrās izvēles preparāti, “*off-label*” kārtībā (Gajofatto and Benedetti, 2015; Gitto, 2017).

IFN β -1b un IFN β -1a demonstrēja labvēlīgu iedarbību, mazinot MS aktivitāti. IFN β terapija samazina letāla iznākuma risku eksponētai grupai par 32%, salīdzinot ar neeksponēto grupu (Kieseier, 2011). Bioloģiskā aktivitāte, IFN β gadījumā, pamatojas uz iekaisumu veicinošo citokīnu (piem. IL-17) sekrēcijas inhibēšanu. Papildus notiek iekaisumu mazinošo citokīnu un trofisko faktoru sekrēcijas stimulācija (piem. NGF, IL-10), tiek ierobežota limfocītu migrācija caur HEB (Kozovska *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2009). Vēl ir raksturota spēja inducēt Tregs klases limfocītus un nomācošas CD19+, CD24++ un CD38++ B-šūnas. Klīniski novēro samazinātu recidīvu skaitu gada laikā pie RRMS, kā arī palielinātu laiku, kurā RRMS pāriet sekundārā PrMS. Blakusefekti: saaukstēšanas simptomi pēc injekcijas, hepatotoksicitāte un depresija. Specifiskās neitralizējošas antivielas var mazināt terapijas efektivitāti (Goodkin, 1996; Bermel *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2015).

Glatiramēra acetāts ir glutamīnskābes, lizīna, alanīna un tirozīna oligopeptīdu maisījums, kas darbojas, saistoties ar MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*). Peptīdi konkurējoši antagonizē citu proteīnu saistīšanu ar MHC, vienlaikus stimulējot IL-10, IL-4, TGFβ sekrēciju un CD8+ Tregs skaita pieaugumu. Papildus notiek efektoro (CD4+) Th1 un Th2 skaita samazinājums. Klīniski novēro mazināto recidīvu skaitu gada laikā RRMS pacientiem. Blakusefekti: idiosinkrātiskas reakcijas pēc injekcijas un limfadenopātijas (Simpson, Noble and Perry, 2002; Tennakoon *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2007; Racke, Lovett-Racke and Karandikar, 2010).

Natalizumabs ir monoklonāla antivielas, kas saistās ar CD49d+ limfocītu VLA4 integrīna α-subvienību. Tiek bloķēta VLA4 saistīšana ar VCAM-1 receptoru un fibronektītu, mazinot B un T limfocītu tieksmi saistīties ar vaskulāro endotēliju un piedalīties ekstravazācijā (migrēt caur HEB). Klīniski efektivitāte izpaužas kā samazināts RRMS recidīvu skaits gada laikā. Blakusefekti: JC vīrusa (cilvēka papilomas vīruss 2) reaktivācijas iespēja CNS, kas veicina progresējošas multifokālas encefalopātijas attīstību, kā arī lokālas reakcijas injekcijas vietā (Polman *et al.*, 2006; Sellebjerg *et al.*, 2016).

Fingolimods ir sfignozīn-1-fosfāta receptora ligands, kas veicina limfocītu agregāciju limfmezglos, inhibējot to iziešanas procesu. Klīniski efektivitāte izpaužas kā samazināts RRMS recidīvu skaits gada laikā. Blakusefekti: bradikardija, dzeltenā plankuma tūska, limfopēnija un, reti, progresējošas multifokālas encefalopātijas gadījumi (Willis and Cohen, 2013; Gajofatto and Benedetti, 2015).

Teriflunomīds ir dihidroorotāt-dehidrogenāzes inhibitors, kas samazina pirimidīnu biosintēzi, inhibē iekaisumu veicinošo citokīnu sekrēciju un T šūnu aktivāciju. Klīniski novēro mazināto recidīvu skaitu gada laikā RRMS pacientiem. Blakusefekti: matu biezuma samazināšana, hepatotoksicitāte un teratogenitāte (Tallantyre, Evangelou and Constantinescu, 2008; O'Connor *et al.*, 2011).

Apkopojot informāciju par DMT variantiem, var secināt ka visos gadījumos terapeitiskais mērķis ir samazināt iekaisuma procesa aktivitāti centrālā nervu sistēmā. Aktīvas vielas iedarbojas uz limfocītu apakšpopulācijām, mazinot iekaisumu veicinošo šūnu skaitu, tieksmi migrēt caur HEB un citokīnu sekrēcijas aktivitāti. Daži preparāti paralēli stimulē iekaisumu regulējošās/mazinošās limfocītu populācijas. Teorētiski, DMT terapijas efektivitātei ir jākorrelē negatīvi ar iekaisuma procesa intensitāti. Līdz ar to, pacientiem kas pielieto dažādus DMT variantus, NO_x līmeņiem asins plazmā būtu jābūt zemākiem, salīdzinot ar pacientiem bez terapijas.

REZULTĀTI

NO metabolītu līmeņi MS pacientu un veselo indivīdu asins plazmā

Darba ietvaros tika iegūti dati par nitrītu (NO_2^-) koncentrācijām 20 MS pacientu un 20 veselo indivīdu asins plazmas paraugos. Papildus tika noteiktas nitrātu (NO_3^-) koncentrācijas 20 MS pacientu un 20 veselo indivīdu asins plazmas paraugos. MS pacientu grupā tika iekļautas 12 sievietes un 8 vīrieši. 16 sievietes un 4 vīrieši tika iekļauti kontroles grupā. Kontroles grupas vidējais vecums (\pm SD) ir $43,5 \pm 18,5$ gadi. Pacientu vidējais vecums (\pm SD) ir $43,4 \pm 13,6$ gadi. Detektora kalibrēšana dati un līknes ir atrodamas 1. un 2. pielikumos.

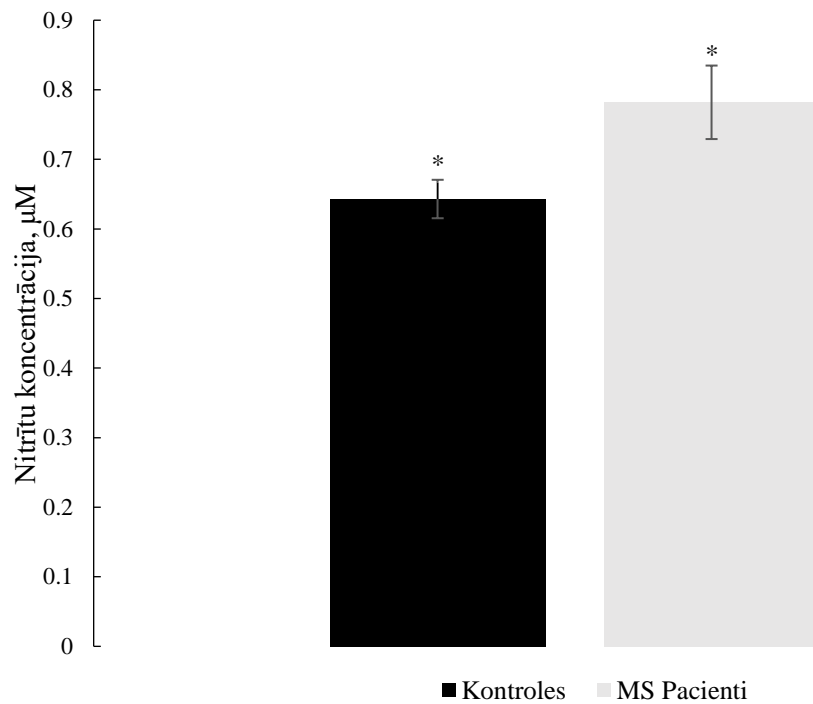
Pacientu grupā, salīdzinot ar kontroles grupu, gan nitrītu (NO_2^-) gan nitrātu (NO_3^-) koncentrācijas asins plazmā bija paaugstinātas. Vērtību atšķirības starp pētāmo grupu un kontroles grupu ir statistiski nozīmīgas ($p < 0,05^*$, skat. tabulu 1.).

Hipotēzes t-testam – nulles hipotēze (H_0): NO_x koncentrācijas (μM) MS pacientu asins plazmā nav nozīmīgi augstākas par NO_x koncentrācijām (μM) kontrolēm; alternatīva hipotēze (H_a): NO_x koncentrācijas (μM) MS pacientu asins plazmā ir nozīmīgi augstākas par NO_x koncentrācijām (μM) kontrolēm. Eksperimentu un hipotēžu pārbaudes rezultāti ir apkopoti tabulā 1. un attēlos 1. un 2.

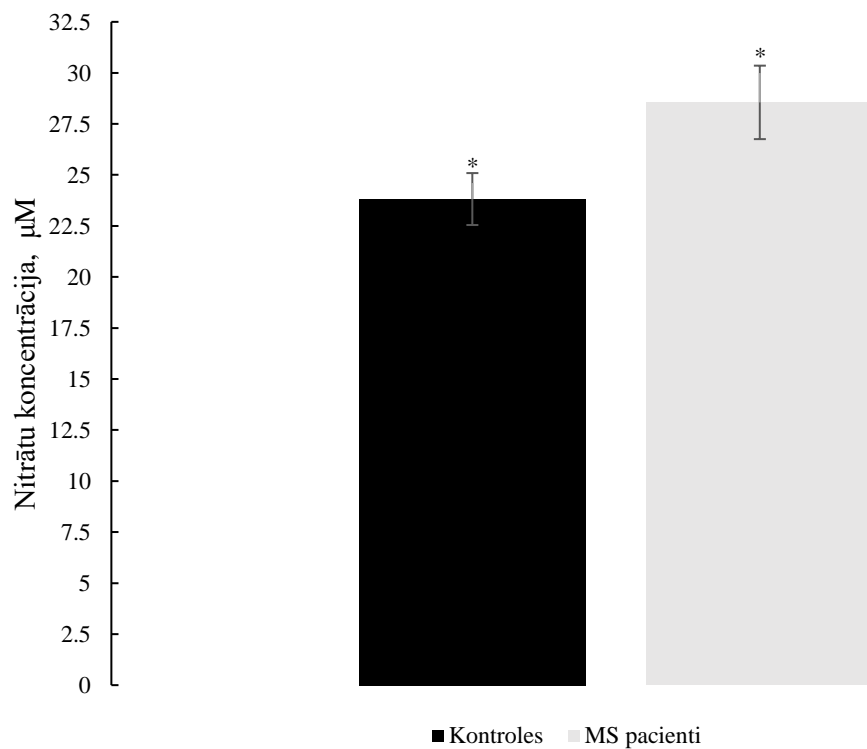
1. tabula

Nitrītu un nitrātu koncentrācijas cilvēku asins plazmā ($p < 0,05^*$)

	<i>MS Pacienti</i>	<i>Kontroles</i>	<i>p (right-tailed, nesapārotais t-tests)</i>
<i>Nitrītu koncentrācija \pm SEM, μM</i>	<i>0,78 \pm 0,05</i>	<i>0,64 \pm 0,03</i>	<i>0,012*</i>
<i>Nitrātu koncentrācija \pm SEM, μM</i>	<i>28,55 \pm 1,80</i>	<i>23,82 \pm 1,27</i>	<i>0,019*</i>



1. att. Nitrītu koncentrācijas (\pm SEM) MS pacientu un veselo indivīdu asins plazmā ($p < 0,05^*$)



2. att. Nitrātu koncentrācijas (\pm SEM) MS pacientu un veselo indivīdu asins plazmā ($p < 0,05^*$)

NO metabolītu līmeņi MS pacientu asins plazmā, atkarībā no terapijas veida

Pētāmā grupā esošiem MS pacientiem, kā DMT tika pielietotas sekojošas aktīvas vielas: *Interferonum beta-1a*; *Fingolimodum*; *Teriflunomidum*; *Interferonum beta-1b*; *Natalizumabum*; *Glatirameri acetat*.

Pacientiem, kam bija nozīmēta Interferona-beta-1a terapija, nitrātu (NO_3^-) koncentrācijas bija nozīmīgi paaugstinātas, salīdzinot ar pacientiem bez terapijas ($p < 0,05^*$, skat. tabulu 3.). Pārējos gadījumos NO_x koncentrāciju atšķirības starp pacientu grupām nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$, skat. 3. tabulu).

Hipotēzes ANOVA (*one way*) testam: H_0 – NO_x plazmas koncentrāciju (μM) atšķirības starp MS pacientu grupām, kas saņēma Interferona beta-1a terapiju, citus*(skat. tabulu 2.) terapijas variantus un nesaņēma terapiju, nav statistiski nozīmīgas. H_a – NO_x plazmas koncentrāciju (μM) atšķirības starp MS pacientu grupām, kas saņēma Interferona beta-1a terapiju, citus*(skat. 2. tabulu) terapijas variantus un nesaņēma terapiju, ir statistiski nozīmīgas. Kopā, veicot ANOVA testu, tika veikta 2 H_0/H_a hipotēžu komplektu pārbaude – pa vienam pie katra $\text{NO}_x - \text{NO}_2^-$ koncentrācijas un NO_3^- koncentrācijas.

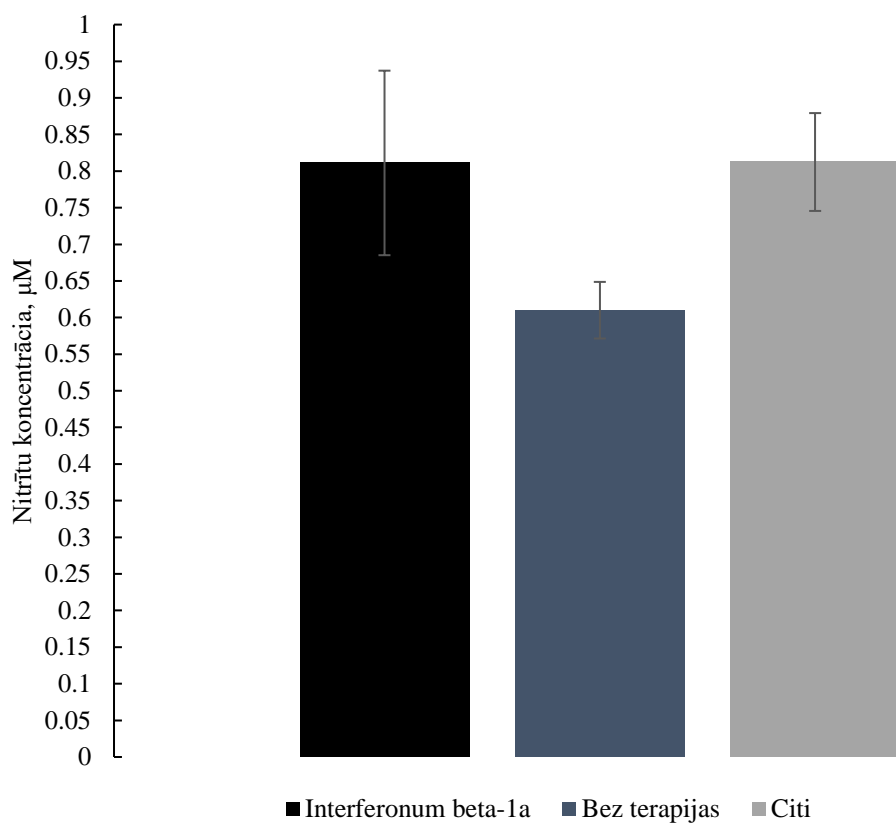
Hipotēžu piemērs Kramera testam: H_0 (*Post hoc*) – NO_x plazmas koncentrāciju (μM) atšķirības starp MS pacientu grupu, kas saņēma A terapijas variantu un B terapijas variantu, nav statistiski nozīmīgas. H_a (*Post hoc*) – NO_x koncentrāciju (μM) atšķirības starp MS pacientu grupu, kas saņēma A terapijas variantu un B terapijas variantu, ir statistiski nozīmīgas. Kopā, veicot *Post hoc* testu, tika veikta 6 H_0/H_a hipotēžu komplektu pārbaude, pa 1 H_0/H_a komplektam pie katras grupu kombinācijas (kopā 3), ņemot vienu reizi pie katra $\text{NO}_x - \text{NO}_2^-$ koncentrācijas un NO_3^- koncentrācijas. Eksperimentu rezultāti ir apkopoti tabulā 2. un attēlos 3. un 4. Hipotēžu pārbaudes rezultāti ir apkopoti tabulā 3.

**Nitrātu un nitrītu koncentrācijas
MS pacientu asins plazmā, atkarībā no terapijas veida**

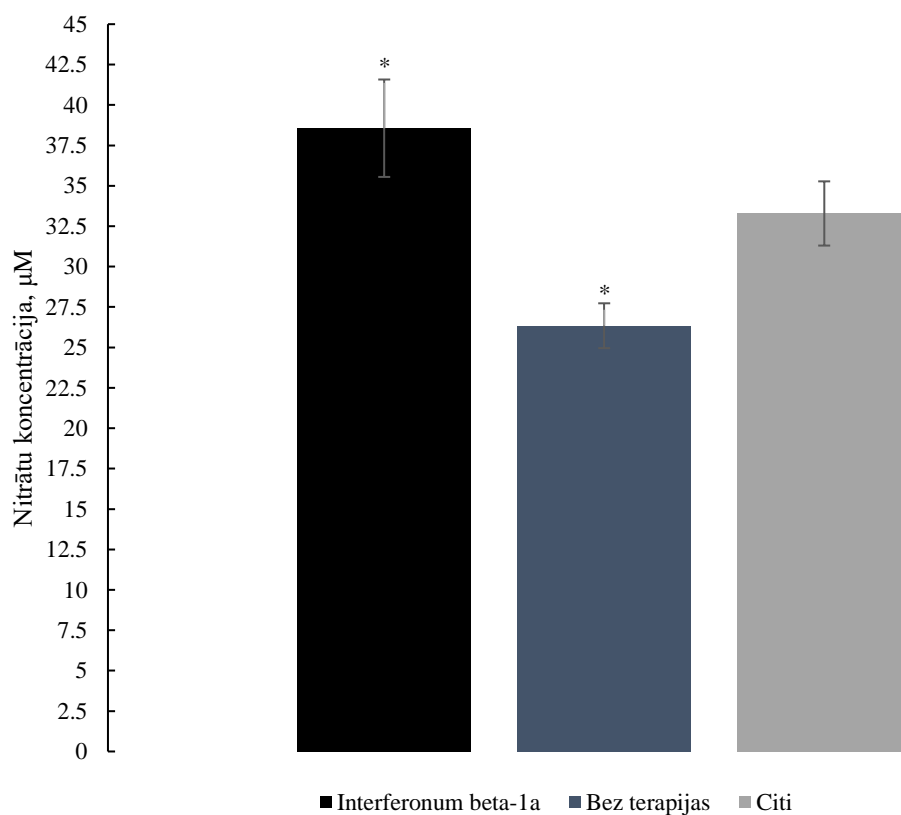
Mērījumu grupa	Parametrs	Pacientu grupas		
		Interferonum beta-1a	Bez terapijas	Citi*: Fingolimodum; Natalizumabum; Glatirameri acetat; Teriflunomidum; Interferonum beta-1b
Nitrītu koncentrāciju mērījumi	Nitrītu koncentrācija ± SEM, μM	0,81 ± 0,13	0,61 ± 0,04	0,81 ± 0,07
	Pacientu vecums ± SEM, gados	39 ± 4,4	51,3 ± 10,2	42,8 ± 6,3
	Sieviešu skaits/Vīriešu skaits	2/1	1/3	2/1
Nitrātu koncentrāciju mērījumi	Nitrātu koncentrācija ± SEM, μM	38,56 ± 3,01	26,34 ± 1,39	33,29 ± 1,99
	Pacientu vecums ± SEM, gados	34 ± 7	53,8 ± 8,3	40 ± 11,1
	Sieviešu skaits/Vīriešu skaits	4/2	1/3	3/2

**Statistiskā nozīmīguma pārbaude -
NO_x koncentrācijas pacientiem, kas saņēma dažādas terapijas (p<0,05*)**

<i>Mērījumu grupa</i>	<i>Pacientu grupas (ANOVA)</i>			<i>Statistiskais tests</i>
	<i>Interferonum beta-1a/Citi/Bez terapijas</i>			
<i>Nitrītu koncentrāciju (μM) atšķirības</i>	<i>0,101</i>			<i>p vērtības (ANOVA, one way)</i>
<i>Nitrātu koncentrāciju (μM) atšķirības</i>	<i>0,0066*</i>			
<i>Mērījumu grupa</i>	<i>Pacientu grupas (Post-hoc)</i>			<i>Statistiskais tests</i>
	<i>Interferonum beta-1a/ bez terapijas</i>	<i>Citi/bez terapijas</i>	<i>Interferonum beta-1a/Citi</i>	
<i>Nitrītu koncentrāciju (μM) atšķirības</i>	<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	<i>p vērtības (Tukey-Kramera tests)</i>
<i>Nitrātu koncentrāciju (μM) atšķirības</i>	<i>< 0,05*</i>	<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	



3. att. Nitrītu koncentrācijas (\pm SEM) MS pacientu asins plazmā atkarībā no pielietotas terapijas ($p > 0,05$)



4. att. Nitrātu koncentrācijas (\pm SEM) MS pacientu asins plazmā atkarībā no pielietotas terapijas ($p < 0,05^*$)

Iegūto rezultātu analīze

Literatūras dati par NO_x līmeņiem MS pacientu asins plazmā ir pieejami, bet nav apjomīgi. Līdz ar to par referenci tika izmantoti dati par NO_x koncentrācijām MS pacientu un veselu cilvēku serumā. Literatūras avoti tika atlasīti pēc šādiem kritērijiem: rakstā ir apkopoti autoru veikto eksperimentu rezultāti; dati tika iegūti ar vienu metodi; dalībnieku vecums un dzimumu attiecība ir līdzīgi atbilstošo lielumu vērtībām, kas tika pieņemtas šajā darbā; dalībnieku skaits pētījumos ir pēc iespējas lielāks.

Literatūrā bija pieejami dati no pētījumiem, kas tika veikti dažādās valstīs un dažādos laika posmos (Giovannoni *et al.*, 1997; Yuceyar, Taşkiran and Sagduyu, 2001; Tavazzi *et al.*, 2011; Niedziela, Adamczyk-Sowa, Jacek T Niedziela, *et al.*, 2016; Kallaur *et al.*, 2017). Konkrēto pētījumu dati ir apkopoti 3. Pielikumā. No ģeogrāfijas atkarīgo faktoru ietekme, kā arī dalībnieku piesaistes kritēriji attiecība uz iekaisuma procesiem u.c. faktoriem bija atšķirīgi. Papildus NO_x noteikšana tika veikta serumā, kamēr šī darba ietvaros tika izmantota asins plazma. Apskatītos pētījumos NO_x kvantificēšana tika veikta ar Grissa metodi. Ņemot vērā pieminētas atšķirības starp publicēto un eksperimentāli iegūto datu iegūšanas protokoliem, nav korekti tieši salīdzināt rezultātus ar literatūras datiem, izmantojot statistiskus testus. Tomēr ir iespējams noteikt, vai eksperimentālas NO_x vērtības ietilpst no iepriekšējo pētījumu datiem noteiktā izkliedes intervālā ($\pm 1\text{SD}$ jeb 68,2% no sagaidāmām vērtībām), lai noteikt cik lielā mērā jaunie dati atšķiras no iepriekš iegūtiem (Marshall and Bangert, 2008).

Iegūtas NO_x koncentrāciju vērtības, MS pacientiem un veseliem pētījuma dalībniekiem, iekļaujās no literatūras datiem aprēķināta NO_x koncentrāciju references intervālā (skat. 5. attēlu un 4. tabulu).

Vidējas NO_x koncentrāciju vērtības no literatūras datiem tika izrēķinātas pēc formulas (4) (svērtais vidējais). Aprēķinot kopējo standartnovirzi no datiem, kas nāk no dažādiem pētījumiem, tika atkārtoti izmantota formula (6), kombinējot rezultātus pa pāriem (piem. 1. + 2., tad (1.+2.) + 3.), MS pacientu un kontroles grupu ietvaros (Higgins and Green, 2008). Par references intervālu tiek izmantots no pētījumu datiem aprēķināts NO_x vērtību intervāls: [$C_{\text{NO}_x, \text{vid.}} - \text{SD}_s$; $C_{\text{NO}_x, \text{vid.}} + \text{SD}_s$] (Marshall and Bangert, 2008). NO_x vidēja vērtība no eksperimentāliem datiem tika aprēķināta, summējot vidējas nitrātu un nitrītu koncentrācijas. Standartnovirze pie eksperimentālām NO_x koncentrāciju vērtībām tika aprēķināta pēc (5) formulas (ang. *Pooled standard deviation*) (Higgins and Green, 2008).

$$(6) \quad C_{\text{NO}_x, \text{ vid.}} = \frac{\sum_1^N (M_i * C_{\text{NO}_x, i})}{\sum_1^N M_i}$$

$$(7) \quad SD_s = \sqrt{\frac{(M_1 - 1) * SD_1^2 + (M_2 - 1) * SD_2^2}{(M_s - 2)}}$$

$$(8) \quad SD_s = \sqrt{\frac{(M_1 - 1) * SD_1^2 + (M_2 - 1) * SD_2^2 + \frac{M_1 * M_2}{M_1 + M_2} (M_1^2 + M_2^2 - 2M_1 * M_2)}{(M_s - 1)}};$$

$C_{\text{NO}_x, \text{ vid.}}$ – vidējā svērta NO_x koncentrācija (veselo indivīdu vai pacientu grupā);

$C_{\text{NO}_x, i}$ – NO_x koncentrācijas pēc i -tā pētījuma rezultātiem

(veselo indivīdu vai pacientu grupā);

SD_i – standartnovirze NO_x vērtībai pētījumā i (veselo indivīdu vai pacientu grupā);

M_i – dalībnieku (veselo indivīdu vai pacientu grupā) skaits pētījumā i ;

SD_s – kopēja standartnovirze NO_x vērtībai starp visiem atlasītiem pētījumiem

(veselo indivīdu vai pacientu grupā);

M_s – unikālo dalībnieku (veselo indivīdu vai pacientu grupā) skaits

eksperimentos/pētījumos kopā;

NO_x atšķirību nozīmīguma pārbaude starp šajā darbā noteiktām NO_x koncentrācijām MS pacientu un kontroles grupu asins plazmā ir veikta, izmantojot vidējās vērtības salīdzinājuma t -testu ($p < 0,001^{**}$ skat. 5. attēlu) (MedCalc Software Ltd, 2020).

H_0 : NO_x koncentrācijas (μM) MS pacientu asins plazmā nav nozīmīgi augstākas par NO_x koncentrācijām (μM) kontroles grupas asins plazmā. H_a : NO_x koncentrācijas (μM) MS pacientu asins plazmā ir nozīmīgi augstākas par NO_x koncentrācijām (μM) kontroles grupas asins plazmā. Rezultāti ir apkopoti 4. tabulā un 5. attēlā.

Kā redzams no 4. tabulas datiem, literatūrā pieminētas NO_x koncentrācijas svārstās plašās robežās, spriežot pēc SD un NO_x koncentrāciju vērtību relatīviem lielumiem. Ir pazīstami vairāki faktori, kas to nosaka. Nitrāti un nitrīti var nonākt cirkulācijā ar pārtiku, piemēram zaļo lapu dārzeniem un apstrādātiem gaļas produktiem (Hord, Tang and Bryan, 2009). Vēl pastāv iespēja uzņemt nitrātus ar dzeramo ūdeni (Ward *et al.*, 2018).

Endogena nitrātu un nitrītu produkcija pamatojas uz biosintēzes ceļā veidotā NO oksidēšanu (Ma *et al.*, 2018). NO līmeņi var svārstīties fiziskās slodzes laikā un pēc tās (Nosarev *et al.*, 2015). Vēl izmaiņas NO metabolismā var būt saistītas ar adaptācijas procesiem cilvēkiem, kas dzīvo vai ilgstoši atrodas lielajos augstumos, kur ir pazemināts skābekļa saturs gaisā (Beall, Laskowski and Erzurum, 2012). NO līmeņu izmaiņas ir cieši saistītas ar iekaisuma procesiem organismā, jo tas ir visbiežākais iNOS-saturošo makrofāgu un neitrofilo leukocītu aktivācijas iemesls (Miles *et al.*, 1995).

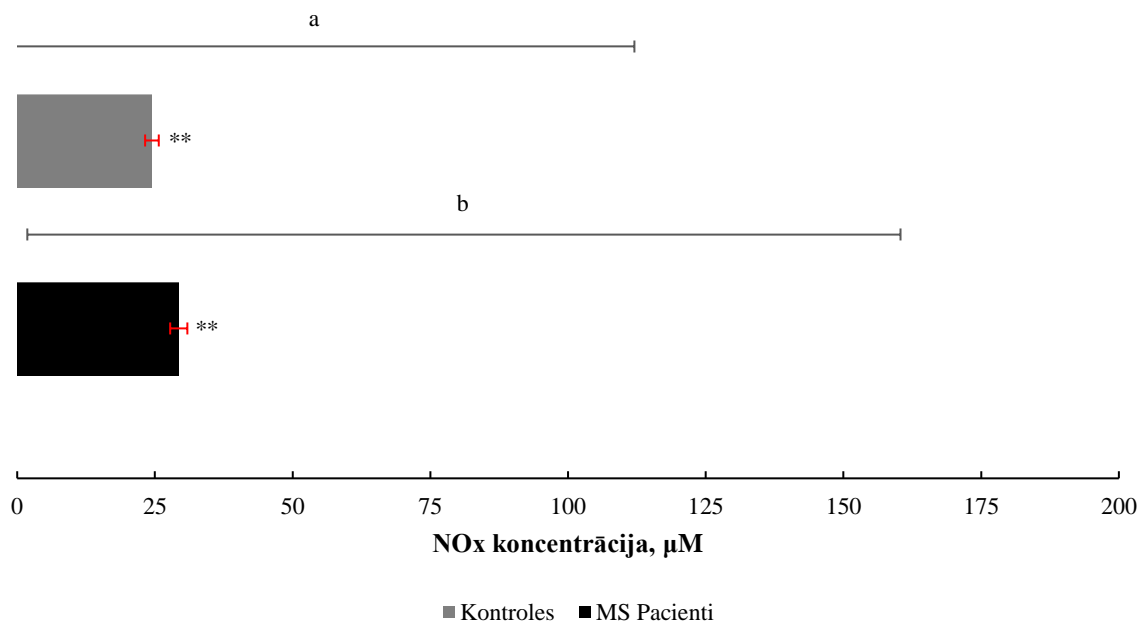
Līdz ar to NO₂⁻ un NO₃⁻ daudzums cirkulācija var stipri pieaugt iekaisuma procesa gadījumā. Piemērām, RRMS pacientiem paaugstinātie NO_x līmeņi serumā ir asociējami ar lielāko lēkmju biežumu (Niedziela, Adamczyk-Sowa, Jacek T. Niedziela, *et al.*, 2016).

4. tabula

Literatūras dati un eksperimentālie dati par NO_x koncentrācijām veselo indivīdu un MS pacientu asins plazmā

<i>Grupa</i>	<i>NO_x koncentrācija ±SD, μM</i>	<i>Analizējams paraugs</i>	<i>Unikālo dalībnieku skaits</i>	<i>Dalībnieku vidējais svērtais vecums, gados</i>	<i>Dzimumu proporcija (V/S)</i>	<i>Atsauces</i>
<i>References intervāls (C_{NOx}, vid. ±1SD) kontroles grupai^a</i>	53,6 ± 58,4	<i>Serums</i>	430	39,2	137/239	(Giovannoni <i>et al.</i> , 1997; Tavazzi <i>et al.</i> , 2011; Kallaur <i>et al.</i> , 2017)
<i>References intervāls (C_{NOx}, vid. ±1SD) MS pacientiem^a</i>	81,1 ± 79,3	<i>Serums</i>	239	43,8	71/168	(Yuceyar, Taşkiran and Sagduyu, 2001; Tavazzi <i>et al.</i> , 2011; Niedziela, Adamczyk-Sowa, Jacek T Niedziela, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Kontroles grupa^b</i>	24,5 ± 1,3	<i>Asins plazma</i>	21	43,5	15/6	<i>Eksperimenta rezultāti</i>
<i>MS pacienti^b</i>	29,3 ± 1,6	<i>Asins plazma</i>	25	43,4	17/8	<i>Eksperimenta rezultāti</i>

NO_x – Nitrātu un nitrītu kopējā koncentrācija, kas ir aprēķināta no literatūras datiem^a, vai summējot eksperimentāli noteiktas nitrātu un nitrītu koncentrācijas^b; SD – standartnovirze; V – vīrietis; S – sieviete;



5. att. NO_x plazmas koncentrāciju (\pm SD) salīdzinājums ar references intervāliem;

a – NO_x koncentrāciju references intervāls kontroles grupai;

b – NO_x koncentrāciju references intervāls MS pacientiem; ($p < 0,001^{}$);**

Kā jau iepriekš tika konstatēts, NO_x koncentrācijas cirkulācijā ir atkarīgas no vairākiem endogēniem un eksogēniem faktoriem. Endogēnie faktori, piemēram vecums, dzimums un slimību vēsture, parasti tiek ņemti vērā, veicot pētījuma dizainu. Tomēr eksogēnie faktori, kas bieži nosaka rezultātu variācijas starp pasaules reģioniem, bieži vien ir grūti kontrolējami. Līdz ar to, dati kas tiek iegūti dažādos ģeogrāfiskos reģionos var stipri atšķirties.

Lai būtu iespējams iegūt salīdzināmus datus, vismaz vienā ģeogrāfiska reģiona ietvaros, būtu vēlams izstrādāt standarta pētījuma dalībnieku piesaistes kritērijus, kas ņemtu vērā gan endogēno, gan lokālo eksogēno faktoru ietekmi uz NO_x līmeņiem. Šādi kritēriji papildus varētu palīdzēt samazināt anomālas variantes (ang. *Outlier*) tipa vērtību iegūšanas biežumu, paātrinot datu iegūšanu un samazinot reaģentu izmaksas un darba laiku.

Vienīgas statistiski nozīmīgas NO metabolītu koncentrāciju atšķirības ($p < 0,05$) tika konstatētas, salīdzinot MS pacientu grupu, kas saņēma interferona β -1a terapiju un MS pacientus, kas terapiju nebija saņēmuši (skat. 3. tabulu un 4. attēlu), nitrātu gadījumā. Primāri tas ir saistīts ar lielo anomālas variantes (AVT - ang. *Outlier*) tipa vērtību skaitu, kas ir konstatējamas tikai pēc mērījumu pabeigšanas. Kā jau bija teikts, liels AVT vērtību skaits ir saistīts ar to, ka nitrātu un nitrītu koncentrācijas cilvēku asins plazmā ir atkarīgas no vairākiem faktoriem, kurus ir grūti kontrolēt, veicot pētījuma dizainu.

Tas ka nitrātu koncentrācija ir lielāka pacientiem, kas ir saņēmuši terapiju, var būt saistīts ar vecuma atšķirībām starp salīdzināmām grupām. Cilvēkiem ir raksturīga NO produkcijas samazināšana ar vecumu (Goubareva *et al.*, 2007; Torregrossa, Aranke and Bryan, 2011). Cits iemesls varētu būt saistīts ar neitralizējošo antivielu produkciju pret interferonu- β (Soelberg Sorensen, 2008).

Nevar pilnībā izslēgt arī izlases kļūdu, kas ir saistīta ar mazo kopējas MS pacientu izlases izmēru pie katra no terapijas veidiem. Tas ir daļēji skaidrojams ar iepriekš pieminēto AVT izslēgšanu nekontrolējamo faktoru ietekmes dēļ, un daļēji ar mazo analizējamās populācijas izmēru. Pēc Rīgas Klīniskās universitātes slimnīcas atskaites datiem, Latvijā vidēja saslimstība ar MS ir 51 uz 100000 iedzīvotāju (Gulbe and Vainšteine, 2015). Par pamatu ņemot Centrālās statistikas pārvaldes datus par iedzīvotāju skaitu 2019. gadā, aptuvenais MS slimnieku skaits ir 979 cilvēki (Centrālā statistikas pārvalde, 2019). NO metabolītu koncentrāciju variācijas atkarībā no vairākiem nekontrolējamiem faktoriem noved pie rezultātu izseģšanas (AVT). Papildus novēro pētījumā iekļaujamo pacientu skaita variācijas atkarībā no vecuma, dzimuma, MS tipa, terapijas veida, piekrišanās piedalīties pētījumā u.c. faktoriem. Kopumā tas nozīme ka pietiekamā apjoma reprezentatīvas izlases iegūšanai var būt vajadzīgs laiks, kas ir ilgāks par kopējo bakalaura darba izstrādes periodu.

Apkopojot, var secināt ka iegūtas NO_x vērtības iekļaujas no literatūras datiem aprēķināta references intervālā. Eksperimentāli iegūtās nitrātu un nitrītu koncentrācijas ir nozīmīgi augstākas MS pacientu grupā, salīdzinot ar kontroles grupām ($p < 0,05$) (skat. 1. tabulu, 1., 2. un 5. attēlus). Līdz ar to hipotēze par to, ka nitrātu un nitrītu līmeņi MS pacientu asins plazmā ir augstāki nekā veseliem indivīdiem ir apstiprinājusies. Eksperimenta rezultāti nedod iespēju pamatoti apstiprināt izvirzīto hipotēzi par to, ka NO metabolītu līmeņi nozīmīgi variē atkarībā no pielietotas slimību modificējošas terapijas veida. Hipotēzes pārbaudei ir nepieciešams lielāks reprezentatīvo paraugu apjoms, kura uzkrāšanai noteicošais faktors ir laiks.

SECINĀJUMI

No zinātniskās literatūras iegūtā informācija liecina ka NO ir bioloģiski-aktīva molekula, kas piedalās vairākos organismā notiekošos procesos, ieskaitot asinsspiediena regulāciju, asinsreci, neurotransmisiju un iekaisuma procesus. Multiplās sklerozes gadījumā novēro aktīvu NO produkciju CNS, ko nosaka gan perifērisko imūnšūnu (īpaši makrofāgu), gan CNS lokalizētu šūnu (piem. A1 astrocītu) sekretorā aktivitāte. MS kontekstā, NO piemīt iekaisuma mediatora loma – oksidatīvā stresa ietekmē notiek intensīva NO un ROS produkcija, kas kopā noved pie peroksinitrīta ģenerācijas un lokāliem citoskiskuma efektiem. Oligodendrocītu un neironu bojājumi un bojāeja ir NO/ROS kopējās toksicitātes efekti, ar kuriem tiek asociēti neiroloģiskie simptomi MS pacientiem.

Veicot asins paraugu testēšanu ar eksperimentālām metodēm, bija iespējams novērtēt NO_x plazmas koncentrāciju atšķirības starp MS pacientu un kontroles grupām. Tika iegūti dati par nitrātu un nitrītu koncentrācijām MS pacientu asins plazmā un veselo indivīdu asins plazmā. Ar statistiskiem testiem tika novērtēts vai atšķirības starp MS pacientu grupu un kontroles grupu ir statistiski nozīmīgas.

Iegūtie rezultāti liecina ka MS pacientu grupā NO_x koncentrācijas ir nozīmīgi ($p < 0,05$) paaugstinātas gan nitrātu gan nitrītu gadījumā (skat. 1. tabulu un 1. un 2. attēlus). Tika apstiprināta hipotēze par to, ka MS pacientu grupā novēro augstākas nitrātu un nitrītu koncentrācijas asins plazmā, nekā veselo indivīdu kontroles grupā.

Iegūto datu apjoms pie katra terapijas veida nebija pietiekams, lai būtu iespējams droši novērtēt sakarības starp NO_x plazmas koncentrācijām un modificējošo terapijas veidu MS pacientiem. Tomēr, analizējot datus par nitrātu un nitrītu koncentrācijām MS pacientu asins plazmā, atkarībā no terapijas veida, tika konstatēta nozīmīga ($p < 0,05$) atšķirība starp MS pacientiem, kas saņēma interferona- β 1a terapiju un MS pacientiem, kas nesaņēma terapiju (skat. tabulas 3. un 4., un attēlus 3. un 4). Kopumā, iegūtie rezultāti nedod iespēju droši spriest par to, vai NO_x plazmas koncentrācijas MS pacientu grupā nozīmīgi variē atkarībā no pielietotas terapijas veida.

Pētījuma kvalitātes uzlabošanai būtu vērtīgi noteikt to, kādi faktori un cik lielā mērā nosaka NO_x plazmas koncentrāciju variācijas ģeogrāfiskā reģionā, kur notiek dalībnieku piesaiste. Šādu informāciju varētu izmantot piesaistes kritēriju un/vai datu apstrādes metožu pielāgošanai, lai mazinātu pēc mērījumu pabeigšanas izslēgto AVT vērtību skaitu.

Viens no šādiem faktoriem varētu būt arī NO metabolītu koncentrācijas ietekmējošo zāļu (piem. pretstenokārdijas līdzekļu – nitroglicerīna un amilnitrīta) lietošana. Kontrolējamo faktoru kontekstā, viens no iespējamiem tālākās izpētes virzieniem varētu būt NO_x plazmas koncentrāciju variācijas atkarībā no MS apakštipa (PrMS, RRMS). Papildus būtu jāvāc dati par modificējošas terapijas uzsākšanas laiku, devu lielumu un režīmu MS pacientiem.

Lai būtu iespējams iegūt pietiekamo reprezentatīvo paraugu skaitu, papildus pie piesaistes kritēriju precizēšanas varētu pagarināt datu vākšanas laiku. Tas dotu iespēju savākt vajadzīgo reprezentatīvo paraugu skaitu, lai būtu iespējams novērtēt terapijas ietekmi uz NO_x plazmas koncentrācijām lokālā MS pacientu populācijā.

Paralēli būtu iespējams veikt regulāro zinātniskās literatūras pārskatu, novērtējot sakarības starp datiem kas tika iegūtas ar vecākām (piem. Grissa metode) un jaunākām metodēm, ka arī apkopojot datus par dažādiem paraugu veidiem (asins plazma, serums, CSŠ, siekalas, urīns u.c.).

Aprakstītie pētniecības virzieni ļautu precizēt NO_x references intervālus, notiek references intervālus nitrātu un nitrītu koncentrāciju mērījumiem, ka arī veikt rezultātu salīdzinājumu, izmantojot statistiskus testus, novērtējot NO_x plazmas koncentrāciju atšķirību nozīmīgumu starp dažādiem ģeogrāfiskiem reģioniem.

Pieaugot paraugu apjomam, paaugstināsies arī darba apjoms laboratorijā un arī iegūto datu apjoms. Paraugu sagatavošanas, analīzes veikšanas, ka arī datu apstrādes procesu automatizācija ir vēl viens aktuāls pētījumu virziens. Automatizējot datu iegūšanas procesu, būtu iespējams paaugstināt analīzes ražību attiecība uz paraugu skaitu, samazināt personāla darba laiku laboratorijā un precīzāk prognozēt reaģentu izmaksas. Savukārt, datu apkopošanas un analīzes automatizācija ir nepieciešami, lai būtu iespējams strādāt ar lieliem datu apjomiem.

Kopumā var secināt ka nitrātu un nitrītu koncentrācijas asins plazmā noteikti ir potenciālie biomarķieri, kas varētu tikt izmantoti iekaisuma procesa intensitātes novērtēšanai MS pacientiem. Tomēr koncentrāciju vērtība var svārstīties ļoti plašās robežās atkarībā no vairākiem, ar pacientu tieši saistītiem, gan arī nesaistītiem faktoriem. Līdz ar to, vienīgi NO_x koncentrācijas nevar kalpot par drošu iekaisuma intensitātes indikatoru pie MS. Papildus izpēte ir nepieciešama, lai novērtētu NO_x plazmas koncentrāciju variācijas atkarībā no MS apakštipiem un modificējošas terapijas veidiem.

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību prof. Dr.habil.biol. Nikolajam Sjakste par iespēju izstrādāt bakalaura darbu un apgūt izstrādei nepieciešamas metodes, strādājot Latvijas Universitātes, Medicīnas Fakultātes, Medicīnas bioķīmijas katedrā.

Izsaku pateicību darba vadītājam, M.Sc. Vitālijam Borisovam, par iespēju iegūt darba izstrādei nepieciešamos asins plazmas paraugus, ka arī par palīdzību un ieteikumiem darba izstrādes procesā.

IZMANOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

- Acar, G. *et al.* (2003) 'Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis', *Journal of Neurology*, 250(5), pp. 588–592. doi: 10.1007/s00415-003-1041-0.
- Albina, J. E. *et al.* (1993) 'Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. J Immunol, 150(11), pp. 5080–5. Pieejams tiešsaistē: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684418> (Skatīts: 16 Marts 2020).
- Alessandro Oksenberg, J. R. D. (2017) 'The Genetics of Multiple Sclerosis', in *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*. Codon Publications, pp. 3–16. doi: 10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch1.
- Amaral, A. I. *et al.* (2013) 'Metabolic aspects of Neuron-Oligodendrocyte-Astrocyte interactions', *Frontiers in Endocrinology*. doi: 10.3389/fendo.2013.00054.
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J. and Weiner, H. L. (2018) 'Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy', *Neuron*. Cell Press, 97(4), pp. 742–768. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.021.
- Balashov, K. E. *et al.* (1997) 'Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: Induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(2), pp. 599–603. doi: 10.1073/pnas.94.2.599.
- Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002) 'Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 2(6), pp. 401–409. doi: 10.1038/nri819.
- Beall, C. M., Laskowski, D. and Erzurum, S. C. (2012) 'Nitric oxide in adaptation to altitude', *Free Radical Biology and Medicine*. NIH Public Access, 52(7), pp. 1123–1134. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.028.
- Bechtold, D. A. *et al.* (2005) 'Axonal protection in experimental autoimmune neuritis by the sodium channel blocking agent flecainide', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awh328.
- Beckman, J. S. (1996) 'Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite', *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 9(5), pp. 836–844. doi: 10.1021/tx9501445.
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996) 'Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Am J Physiol,

271(5 40-5). doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.c1424.

Berghmans, N., Dillen, C. and Heremans, H. (2006) 'Exogenous IL-12 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by tuning IL-10 and IL-5 levels in an IFN- γ -dependent way', *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier, 176(1–2), pp. 63–75. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.04.009.

Bermel, R. A. *et al.* (2013) 'Predictors of long-term outcome in multiple sclerosis patients treated with interferon beta', *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 73(1), pp. 95–103. doi: 10.1002/ana.23758.

Bielekova, B. *et al.* (2006) 'Regulatory CD56bright natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(15), pp. 5941–5946. doi: 10.1073/pnas.0601335103.

Black, J. A. *et al.* (2006) 'Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awl216.

Bolton, C. and Paul, C. (2006) 'Glutamate receptors in neuroinflammatory demyelinating disease', *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/MI/2006/93684.

Brändle, S. M. *et al.* (2016) 'Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(28), pp. 7864–7869. doi: 10.1073/pnas.1522730113.

Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) 'Nitric oxide, a novel neuronal messenger', *Neuron*. Cell Press, 8(1), pp. 3–11. doi: 10.1016/0896-6273(92)90104-L.

Broadwater, L. *et al.* (2011) 'Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.01.012.

Bryan, N. S. and Grisham, M. B. (2007) 'Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples', *Free Radical Biology and Medicine*. NIH Public Access, pp. 645–657. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.

Cambron, M. *et al.* (2012) 'White-matter astrocytes, axonal energy metabolism, and axonal degeneration in multiple sclerosis', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. doi: 10.1038/jcbfm.2011.193.

Centonze, D. *et al.* (2010) 'The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis', *Cell Death and Differentiation*. doi: 10.1038/cdd.2009.179.

Centrālā statistikas pārvalde (2019) *Iedzīvotāju skaits, tā izmaiņas un blīvums | Centrālā statistikas pārvalde*. Pieejams tiešsaistē: <https://www.csb.gov.lv/lv/statistika/statistikas-temas/iedzivotaji/iedzivotaju-skaits/galvenie-raditaji/iedzivotaju-skaits-ta-izmainas-un-blivums> (Skatīts: 14 Aprīlis 2020).

Cepok, S. (2001) 'Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis', *Brain*. doi: 10.1093/brain/124.11.2169.

Chakraborti, T. *et al.* (1999) 'Oxidant, mitochondria and calcium: An Overview', *Cellular Signalling*. doi: 10.1016/S0898-6568(98)00025-4.

Chen, M. *et al.* (2009) 'Regulatory effects of IFN- β on production of osteopontin and IL-17 by CD4⁺ T Cells in MS', *European Journal of Immunology*. Eur J Immunol, 39(9), pp. 2525–2536. doi: 10.1002/eji.200838879.

Correale, J. and Farez, M. F. (2015) 'The role of astrocytes in multiple sclerosis progression', *Frontiers in Neurology*. doi: 10.3389/fneur.2015.00180.

Craner, M. J. *et al.* (2004) 'Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awh032.

Cross, A. H. *et al.* (2006) 'Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients', *Journal of Neuroimmunology*. J Neuroimmunol, 180(1–2), pp. 63–70. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.06.029.

Csonka, C. *et al.* (2015) 'Measurement of NO in biological samples', *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc., pp. 1620–1632. doi: 10.1111/bph.12832.

Cuzzocrea, S. and Salvemini, D. (2007) 'Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes', *Kidney International*. Nature Publishing Group, 71(4), pp. 290–297. doi: 10.1038/sj.ki.5002058.

D'Souza, C. A. *et al.* (2016) 'OGR1/GPR68 modulates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and regulates nitric oxide production by macrophages', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(2). doi: 10.1371/journal.pone.0148439.

Darley-Usmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995) 'Nitric oxide and oxygen radicals: a

question of balance’, *FEBS Letters*. FEBS Lett, 369(2–3), pp. 131–135. doi: 10.1016/0014-5793(95)00764-Z.

Dawson, V. L. *et al.* (1991) ‘Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 88(14), pp. 6368–6371. doi: 10.1073/pnas.88.14.6368.

Dendrou, C. A., Fugger, L. and Friese, M. A. (2015) ‘Immunopathology of multiple sclerosis’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 545–558. doi: 10.1038/nri3871.

Diers, A. R. *et al.* (2014) ‘S-nitrosation of monocarboxylate transporter 1: Inhibition of pyruvate-fueled respiration and proliferation of breast cancer cells’, *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.031.

Duan, H. *et al.* (2013) ‘Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 3(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep01687.

Duddy, M. *et al.* (2007) ‘Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis’, *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 178(10), pp. 6092–6099. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6092.

Flores-Borja, F. *et al.* (2013) ‘CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation’, *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 5(173), pp. 173ra23-173ra23. doi: 10.1126/scitranslmed.3005407.

Gajofatto, A. and Benedetti, M. D. (2015) ‘Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop?’, *World Journal of Clinical Cases*. Baishideng Publishing Group Inc., 3(7), p. 545. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.545.

Ghasemi, N., Razavi, S. and Nikzad, E. (2017) ‘Multiple sclerosis: Pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy’, *Cell Journal*. Royan Institute (ACECR), pp. 1–10. doi: 10.22074/cellj.2016.4867.

Giovannoni, G. *et al.* (1997) ‘Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with multiple sclerosis’, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier, 145(1), pp. 77–81. doi: 10.1016/S0022-510X(96)00246-8.

Gitto, L. (2017) ‘Living with Multiple Sclerosis in Europe: Pharmacological Treatments, Cost of Illness, and Health-Related Quality of Life Across Countries’, in *Multiple Sclerosis:*

Perspectives in Treatment and Pathogenesis. Codon Publications, pp. 17–37. doi: 10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch2.

Goodkin, D. E. (1996) 'Interferon beta treatment for multiple sclerosis: persisting questions.', *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. Arnold, 1(6), pp. 321–4. doi: 10.1177/135245859600100605.

Gordge, M. P. (1998) 'How Cytotoxic is Nitric Oxide?', *Nephron Experimental Nephrology*. Karger Publishers, 6(1), pp. 12–16. doi: 10.1159/000020499.

Goubareva, I. *et al.* (2007) 'Age decreases nitric oxide synthesis and responsiveness in human platelets and increases formation of monocyte-platelet aggregates', *Cardiovascular Research*. Oxford Academic, 75(4), pp. 793–802. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.021.

Graber, J. J. and Dhib-Jalbut, S. (2011) 'Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis', *Journal of the Neurological Sciences*. J Neurol Sci, 305(1–2), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jns.2011.03.026.

Grigoriadis, N. *et al.* (2004) 'Axonal damage in multiple sclerosis: A complex issue in a complex disease', *Clinical Neurology and Neurosurgery*. Elsevier, 106(3), pp. 211–217. doi: 10.1016/j.clineuro.2004.02.017.

Gross, C. C. *et al.* (2016) 'Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(21), pp. E2973–E2982. doi: 10.1073/pnas.1524924113.

Gulbe, G. and Vainšteine, L. (2015) *Kas ir multiplā skleroze?* Rīga. Pieejams tiešsaistē: https://www.aslimnica.lv/sites/default/files/editor/svarigi_ms_pacientu_aprupes_principi.pdf (Skatīts: 13 Aprīlis 2020).

Habib, S. and Ali, A. (2011) 'Biochemistry of nitric oxide', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, pp. 3–17. doi: 10.1007/s12291-011-0108-4.

Harris, V., Tuddenham, J. and Sadiq, S. (2017) 'Biomarkers of multiple sclerosis: current findings', *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. Dove Medical Press Ltd., Volume 7, pp. 19–29. doi: 10.2147/dnnd.s98936.

Hauser, S. L. *et al.* (1986) 'Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions', *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 19(6), pp. 578–587. doi: 10.1002/ana.410190610.

- Hauser, S. L., Chan, J. R. and Oksenberg, J. R. (2013) 'Multiple sclerosis: Prospects and promise', *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 74(3), pp. 317–327. doi: 10.1002/ana.24009.
- Heck, D. E. *et al.* (2005) 'An epigrammatic (abridged) recounting of the myriad tales of astonishing deeds and dire consequences pertaining to nitric oxide and reactive oxygen species in mitochondria with an ancillary missive concerning the origins of apoptosis', *Toxicology*. doi: 10.1016/j.tox.2004.11.027.
- Heidelberger, M., Kabat, E. A. and Mayer, M. (1942) 'A further study of the cross reaction between the specific polysaccharides of types iii and viii pneumococci in horse antisera', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 75(1), pp. 35–47. doi: 10.1084/jem.75.1.35.
- Higgins, J. P. and Green, S. (2008) *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Cochrane Book Series, Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Cochrane Book Series*. Cochrane library. doi: 10.1002/9780470712184.
- Hila, S., Soane, L. and Koski, C. L. (2001) 'Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions', *GLIA*. Glia, 36(1), pp. 68–77. doi: 10.1002/glia.1096.
- Hord, N. G., Tang, Y. and Bryan, N. S. (2009) 'Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits', *American Journal of Clinical Nutrition*. Am J Clin Nutr, 90(1), pp. 1–10. doi: 10.3945/ajcn.2008.27131.
- Huang, S. Q. *et al.* (2014) 'Demyelination initiated by oligodendrocyte apoptosis through enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions and Id2 expression after compressed spinal cord injury in rats', *CNS Neuroscience and Therapeutics*. doi: 10.1111/cns.12155.
- Hughes, M. N. (2008) 'Chemistry of Nitric Oxide and Related Species', in *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp. 3–19. doi: 10.1016/S0076-6879(08)36001-7.
- Hughes, M. N., Nicklin, H. G. and Sackrle, W. A. C. (1971) 'The chemistry of peroxonitrites. Part III. the reaction of peroxonitrite with nucleophiles in alkali, and other nitrite producing reactions', *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, and Theoretical Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, (0), pp. 3722–3725. doi: 10.1039/J19710003722.
- Infante-Duarte, C. *et al.* (2005) 'Frequency of blood CX 3 CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients ', *The FASEB Journal*. FASEB,

19(13), pp. 1902–1904. doi: 10.1096/fj.05-3832fje.

Ionic Instruments (2009) *NOAnalysis-Liquid™ Operation Manual*.

Iwata, Y. *et al.* (2011) ‘Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells’, *Blood*. American Society of Hematology, 117(2), pp. 530–541. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249.

Kallaur, A. P. *et al.* (2017) ‘Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis’, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc., 54(1), pp. 31–44. doi: 10.1007/s12035-015-9648-6.

Kalman, B. and Leist, T. P. (2003) ‘A mitochondrial component of neurodegeneration in Multiple Sclerosis’, *NeuroMolecular Medicine*. doi: 10.1385/NMM:3:3:147.

Kanner, J., Harel, S. and Granit, R. (1992) ‘Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin’, *Lipids*. Springer-Verlag, 27(1), pp. 46–49. doi: 10.1007/BF02537058.

Kanner, J., Harel, S. and Rina, G. (1991) ‘Nitric oxide as an antioxidant’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Arch Biochem Biophys, 289(1), pp. 130–136. doi: 10.1016/0003-9861(91)90452-O.

Kapoor, R. (2008) ‘Sodium channel blockers and neuroprotection in multiple sclerosis using lamotrigine’, *Journal of the Neurological Sciences*. J Neurol Sci, 274(1–2), pp. 54–56. doi: 10.1016/j.jns.2008.03.019.

Karni, A. *et al.* (2006) ‘Innate Immunity in Multiple Sclerosis: Myeloid Dendritic Cells in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Are Activated and Drive a Proinflammatory Immune Response’, *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 177(6), pp. 4196–4202. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.4196.

Kieseier, B. C. (2011) ‘The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis’, *CNS Drugs*. CNS Drugs, 25(6), pp. 491–502. doi: 10.2165/11591110-000000000-00000.

Kouchaki, E. *et al.* (2014) ‘Numerical status of CD4+CD25+FoxP3+ and CD8+CD28-regulatory T cells in multiple sclerosis’, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. Mashhad University of Medical Sciences, 17(4), pp. 250–255. doi: 10.22038/ijbms.2014.2582.

Kozovska, M. E. *et al.* (1999) ‘Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS’, *Neurology*. Neurology, 53(8), pp. 1692–1697. doi: 10.1212/wnl.53.8.1692.

- Kwidzinski, E. *et al.* (2005) 'Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation', *The FASEB Journal*. FASEB, 19(10), pp. 1347–1349. doi: 10.1096/fj.04-3228fje.
- Kwon, N. S., Stuehr, D. J. and Nathan, C. F. (1991) 'Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 174(4), pp. 761–767. doi: 10.1084/jem.174.4.761.
- Lan, M. *et al.* (2017) 'Insights in pathogenesis of multiple sclerosis: Nitric oxide may induce mitochondrial dysfunction of oligodendrocytes', *Reviews in the Neurosciences*. Walter de Gruyter GmbH, 29(1), pp. 39–53. doi: 10.1515/revneuro-2017-0033.
- Larochelle, C. *et al.* (2015) 'Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation', *Annals of Neurology*. John Wiley and Sons Inc., 78(1), pp. 39–53. doi: 10.1002/ana.24415.
- Lassmann, H. (2012) 'Cortical lesions in multiple sclerosis: Inflammation versus neurodegeneration', *Brain*. doi: 10.1093/brain/aws260.
- Li, N., Sul, J. Y. and Haydon, P. G. (2003) 'A Calcium-Induced Calcium Influx Factor, Nitric Oxide, Modulates the Refilling of Calcium Stores in Astrocytes', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 23(32), pp. 10302–10310. doi: 10.1523/jneurosci.23-32-10302.2003.
- Liddelow, S. A. *et al.* (2017) 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*. Nature Publishing Group, 541(7638), pp. 481–487. doi: 10.1038/nature21029.
- Lock, C. *et al.* (2002) 'Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis', *Nature Medicine*. Nat Med, 8(5), pp. 500–508. doi: 10.1038/nm0502-500.
- Lozano, J. M. *et al.* (2009) 'CD8⁺ HLA-G⁺ Regulatory T Cells Are Expanded in HIV-1-Infected Patients', *Viral Immunology*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 22(6), pp. 463–465. doi: 10.1089/vim.2009.0041.
- Lu*, N. *et al.* (2016) 'Modeling and analysis of seismic AVAz in shale reservoir based on anisotropic rock physics model: A case study from Southwest China', in *Global Meeting Abstracts*. Society of Exploration Geophysicists, pp. 134–137. doi: 10.1190/rp2016-035.
- Lublin, F. D. *et al.* (2014) 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions', *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins, 83(3), pp. 278–286. doi:

10.1212/WNL.0000000000000560.

Ma, L. *et al.* (2018) 'Nitrate and nitrite in health and disease', *Aging and Disease*. International Society on Aging and Disease, 9(5), pp. 938–945. doi: 10.14336/AD.2017.1207.

Macaron, G. and Ontaneda, D. (2019) 'Diagnosis and Management of Progressive Multiple Sclerosis', *Biomedicines*. MDPI AG, 7(3), p. 56. doi: 10.3390/biomedicines7030056.

Magliozzi, R. *et al.* (2007) 'Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awm038.

Mahad, D. H., Trapp, B. D. and Lassmann, H. (2015) 'Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis', *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group, pp. 183–193. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70256-X.

Malpass, K. (2012) 'Multiple sclerosis: "Outside-in" demyelination in MS', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 8(2), p. 61. doi: 10.1038/nrneurol.2011.217.

Marinelli, C. *et al.* (2016) 'Systematic review of pharmacological properties of the oligodendrocyte lineage', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi: 10.3389/fncel.2016.00027.

Marletta, M. A. (1988) 'Mammalian Synthesis of Nitrite, Nitrate, Nitric Oxide, and N-Nitrosating Agents', *Chemical Research in Toxicology*. Chem Res Toxicol, 1(5), pp. 249–257. doi: 10.1021/tx00005a001.

Marshall, W. J. and Bangert, S. K. (2008) *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects [Paperback]*. Churchill Livingstone; 2nd Revised edition edition.

Matute, C., Domercq, M. and Sánchez-Gómez, M. V. (2006) 'Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance', *GLIA*. doi: 10.1002/glia.20275.

Mauri, C. and Menon, M. (2015) 'The expanding family of regulatory B cells', *International Immunology*. doi: 10.1093/intimm/dxv038.

McFarland, H. F. and Martin, R. (2007) 'Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity', *Nature Immunology*. Nat Immunol, 8(9), pp. 913–919. doi: 10.1038/ni1507.

MedCalc Software Ltd (2020) *MedCalc's Comparison of means calculator*. Pieejams tiešsaistē: https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_means.php (Skatīts: 14 Aprīlis 2020).

Merchant, K. *et al.* (1996) 'Deamination of single-stranded DNA cytosine residues in aerobic nitric oxide solution at micromolar total NO exposures', *Chemical Research in Toxicology*.

American Chemical Society, 9(5), pp. 891–896. doi: 10.1021/tx950102g.

Merrill, J. E. *et al.* (1993) 'Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. *J Immunol*, 151(4), pp. 2132–41. Pieejams tiešsaistē: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102159> (Skatīts: 14 Marts 2020).

MFMER (2019) *Multiple sclerosis - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic*. Pieejams tiešsaistē: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/multiple-sclerosis/diagnosis-treatment/drc-20350274> (Skatīts: 15 Marts 2020).

Miles, A. M. *et al.* (1995) 'Effects of superoxide on nitric oxide-dependent n-nitrosation reactions', *Free Radical Research*. Informa Healthcare, 23(4), pp. 379–390. doi: 10.3109/10715769509065259.

Miller, J. R. (2004) 'The importance of early diagnosis of multiple sclerosis.', *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. *J Manag Care Pharm*.

Minhas, R., Bansal, Y. and Bansal, G. (2019) 'Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update', *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc. doi: 10.1002/med.21636.

Mirshafiey, A. and Mohsenzadegan, M. (2009) 'Antioxidant therapy in multiple sclerosis', *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. doi: 10.1080/08923970802331943.

Mitrovic, B. *et al.* (1995) 'Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes', *Neuroscience*. doi: 10.1016/0306-4522(94)00491-M.

Mohr, S., Stamler, J. S. and Brüne, B. (1994) 'Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents', *FEBS Letters*. *FEBS Lett*, 348(3), pp. 223–227. doi: 10.1016/0014-5793(94)00596-6.

Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. (1991) 'Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology', *Pharmacological Reviews*. *Pharmacol Rev*, 43(2), pp. 109–142.

Morandi, B. *et al.* (2008) 'Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis', *Pharmacological Research*. Academic Press, 57(1), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.phrs.2007.11.003.

Mullauer, F. B., Kessler, J. H. and Medema, J. P. (2009) 'Betulinic acid induces cytochrome c

release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion', *Apoptosis*. *Apoptosis*, 14(2), pp. 191–202. doi: 10.1007/s10495-008-0290-x.

Narita, M. *et al.* (1998) 'Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.95.25.14681.

Naseem, K. M. (2005) 'The role of nitric oxide in cardiovascular diseases', *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd, 26(1-2 SPEC. ISS.), pp. 33–65. doi: 10.1016/j.mam.2004.09.003.

Niedziela, N., Adamczyk-Sowa, M., Niedziela, Jacek T, *et al.* (2016) 'Assessment of Serum Nitrogen Species and Inflammatory Parameters in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Treated with Different Therapeutic Approaches'. doi: 10.1155/2016/4570351.

Niedziela, N., Adamczyk-Sowa, M., Niedziela, Jacek T., *et al.* (2016) 'Assessment of Serum Nitrogen Species and Inflammatory Parameters in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Treated with Different Therapeutic Approaches', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/4570351.

Nosarev, A. V. *et al.* (2015) 'Exercise and NO production: Relevance and implications in the cardiopulmonary system', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fcell.2014.00073.

O'Connor, P. *et al.* (2011) 'Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 365(14), pp. 1293–1303. doi: 10.1056/NEJMoa1014656.

O'Malley, H. A. *et al.* (2009) 'Loss of Na⁺ channel β 2 subunits is neuroprotective in a mouse model of multiple sclerosis', *Molecular and Cellular Neuroscience*. doi: 10.1016/j.mcn.2008.10.001.

Pacholczyk, R. and Kern, J. (2008) 'The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells', *Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 125(4), pp. 450–458. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02992.x.

Padmaja, S. and Huie, R. E. (1993) 'The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Biochem Biophys Res Commun, 195(2), pp. 539–544. doi: 10.1006/bbrc.1993.2079.

Palumbo, S. (2017) 'Pathogenesis and Progression of Multiple Sclerosis: The Role of Arachidonic Acid-Mediated Neuroinflammation', in *Multiple Sclerosis: Perspectives in*

Treatment and Pathogenesis. Codon Publications, pp. 111–124. doi: 10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch7.

Paradise, W. A. *et al.* (2010) ‘Nitric oxide: Perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin’, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 11(7), pp. 2715–2745. doi: 10.3390/ijms11072715.

Persson, A. K. *et al.* (2013) ‘Sodium channels contribute to degeneration of dorsal root ganglion neurites induced by mitochondrial dysfunction in an in vitro model of axonal injury’, *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2148-13.2013.

Pezzullo, J. C. (2013) *Biostatistics for dummies*. Wiley.

Pfeiffer, S., Mayer, B. and Hemmens, B. (1999) ‘Nitric Oxide: Chemical Puzzles Posed by a Biological Messenger’, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. Angew Chem Int Ed Engl, 38(12). doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1714::AID-ANIE1714>3.0.CO;2-3.

Philips, T. and Rothstein, J. D. (2017) ‘Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons’, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, pp. 3271–3280. doi: 10.1172/JCI90610.

Polman, C. H. *et al.* (2006) ‘A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis’, *New England Journal of Medicine*. N Engl J Med, 354(9), pp. 899–910. doi: 10.1056/NEJMoa044397.

Puppo, A. and Halliwell, B. (1988) ‘Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent?’, *The Biochemical journal*. Biochem J, 249(1), pp. 185–190. doi: 10.1042/bj2490185.

Racke, M. K., Lovett-Racke, A. E. and Karandikar, N. J. (2010) ‘The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis’, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins, 74(1 SUPPL.), pp. S25–S30. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c97e39.

Rejdak, K. *et al.* (2004) ‘CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis’, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins, 63(8), pp. 1439–1445. doi: 10.1212/01.WNL.0000142043.32578.5D.

Rinholm, J. E. and Bergersen, L. H. (2012) ‘Neuroscience: The wrap that feeds neurons’, *Nature*. doi: 10.1038/487435a.

Rolo, A. P. *et al.* (2003) ‘Chenodexycolate induction of mitochondrial permeability transition

pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome c release: Protective role of carvedilol', *Mitochondrion*. doi: 10.1016/S1567-7249(03)00007-2.

Roy, B. *et al.* (1995) 'Inhibition of Ribonucleotide Reductase by Nitric Oxide Derived from Thionitrites: Reversible Modifications of Both Subunits', *Biochemistry*. American Chemical Society, 34(16), pp. 5411–5418. doi: 10.1021/bi00016a012.

Ruiz, A., Matute, C. and Alberdi, E. (2010) 'Intracellular Ca²⁺ release through ryanodine receptors contributes to AMPA receptor-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress in oligodendrocytes', *Cell Death and Disease*. doi: 10.1038/cddis.2010.31.

Sakaguchi, S. *et al.* (2001) 'Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: Their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance', *Immunological Reviews*. Immunol Rev, 182, pp. 18–32. doi: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820102.x.

Sampson, J. B. *et al.* (1998) 'Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc., 356(2), pp. 207–213. doi: 10.1006/abbi.1998.0772.

Saraste, M., Irjala, H. and Airas, L. (2007) 'Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta', *Neurological Sciences*. Springer, 28(3), pp. 121–126. doi: 10.1007/s10072-007-0803-3.

Sas, K. *et al.* (2007) 'Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders', *Journal of the Neurological Sciences*. doi: 10.1016/j.jns.2007.01.033.

Schapiro, R. T. (2009) 'The symptomatic management of multiple sclerosis', *Annals of Indian Academy of Neurology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 12(4), pp. 291–295. doi: 10.4103/0972-2327.58278.

Schirmer, L., Srivastava, R. and Hemmer, B. (2014) 'To look for a needle in a haystack: the search for autoantibodies in multiple sclerosis.', *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 20(3), pp. 271–9. doi: 10.1177/1352458514522104.

Schleinitz, N. *et al.* (2010) 'Natural killer cells in human autoimmune diseases', *Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 131(4), pp. 451–458. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03360.x.

Schubert, R. D. *et al.* (2015) 'IFN- β Treatment Requires B Cells for Efficacy in

- Neuroautoimmunity', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 194(5), pp. 2110–2116. doi: 10.4049/jimmunol.1402029.
- Schurr, A. and Rigor, B. M. (1998) 'Brain anaerobic lactate production: A suicide note or a survival kit?', in *Developmental Neuroscience*. doi: 10.1159/000017330.
- Sellebjerg, F. *et al.* (2002) 'Cerebrospinal fluid levels of nitric oxide metabolites predict response to methylprednisolone treatment in multiple sclerosis and optic neuritis', *Journal of Neuroimmunology*. *J Neuroimmunol*, 125(1–2), pp. 198–203. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00037-1.
- Sellebjerg, F. *et al.* (2016) 'Exploring potential mechanisms of action of natalizumab in secondary progressive multiple sclerosis.', *Therapeutic advances in neurological disorders*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 9(1), pp. 31–43. doi: 10.1177/1756285615615257.
- Selter, R. C. *et al.* (2013) 'Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients', *Multiple Sclerosis Journal*. *Mult Scler*, 19(11), pp. 1454–1461. doi: 10.1177/1352458513477229.
- Serafini, B. *et al.* (2004) 'Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis', *Brain Pathology*. International Society of Neuropathology, 14(2), pp. 164–174. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x.
- Shivane, A. G. and Chakrabarty, A. (2007) 'Multiple sclerosis and demyelination', *Current Diagnostic Pathology*. Churchill Livingstone, 13(3), pp. 193–202. doi: 10.1016/j.cdip.2007.04.003.
- Sievers Instruments Inc. (2001) 'Nitric Oxide Analyzer NOATM 280i - Operation and Maintenance Manual', *NOA Firmware Version 3.00*.
- Simpson, D., Noble, S. and Perry, C. (2002) 'Glatiramer acetate: A review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis', *CNS Drugs*. Adis International Ltd, pp. 825–850. doi: 10.2165/00023210-200216120-00004.
- Smith, K. J. (2006) 'Axonal protection in multiple sclerosis - A particular need during remyelination?', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awl323.
- Soelberg Sorensen, P. (2008) 'Neutralizing antibodies against interferon-beta', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. SAGE Publications, 1(2), pp. 125–141. doi:

10.1177/1756285608095144.

Stojanovic, I. R., Kostic, M. and Ljubisavljevic, S. (2014) 'The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis', *Journal of Neural Transmission*. doi: 10.1007/s00702-014-1188-0.

Su, K. G. *et al.* (2009) 'Axonal degeneration in multiple sclerosis: The mitochondrial hypothesis', *Current Neurology and Neuroscience Reports*. doi: 10.1007/s11910-009-0060-3.

Sun, J. *et al.* (2003) 'Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay', *Sensors*. Molecular Diversity Preservation International, 3(8), pp. 276–284. doi: 10.3390/s30800276.

Tallantyre, E., Evangelou, N. and Constantinescu, C. S. (2008) 'Spotlight on teriflunomide.', *International MS journal*. Int MS J, 15(2), pp. 62–8. Pieejams tiešsaistē: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782502> (Skatīts: 15 Marts 2020).

Tamir, S., Burney, S. and Tannenbaum, S. R. (1996) 'DNA damage by nitric oxide', *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 9(5), pp. 821–827. doi: 10.1021/tx9600311.

Tavazzi, B. *et al.* (2011) 'Serum Metabolic Profile in Multiple Sclerosis Patients', *Multiple Sclerosis International*. Hindawi Publishing Corporation, 2011. doi: 10.1155/2011/167156.

Tennakoon, D. K. *et al.* (2006) 'Therapeutic Induction of Regulatory, Cytotoxic CD8 + T Cells in Multiple Sclerosis', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 176(11), pp. 7119–7129. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.7119.

Torregrossa, A. C., Aranke, M. and Bryan, N. S. (2011) 'Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly', *Journal of Geriatric Cardiology*. Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, 8(4), pp. 230–242. doi: 10.3724/SP.J.1263.2011.00230.

Uitdehaag, B. M. J. *et al.* (2011) 'The changing face of multiple sclerosis clinical trial populations', *Current Medical Research and Opinion*. Taylor & Francis, 27(8), pp. 1529–1537. doi: 10.1185/03007995.2011.591370.

Uppu, R. M., Squadrito, G. L. and Pryor, W. A. (1996) 'Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc., 327(2), pp. 335–343. doi: 10.1006/abbi.1996.0131.

Uss, E. *et al.* (2006) 'CD103 Is a Marker for Alloantigen-Induced Regulatory CD8 + T Cells

, *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 177(5), pp. 2775–2783. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.2775.

Villar, L. M. *et al.* (2005) ‘Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS’, *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 115(1), pp. 187–194. doi: 10.1172/JCI22833.

Volpe, E. *et al.* (2016) ‘Fas-fas ligand: Checkpoint of t cell functions in multiple sclerosis’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 7(SEP). doi: 10.3389/fimmu.2016.00382.

Vuddamalay, Y. and van Meerwijk, J. P. M. (2017) ‘CD28- and CD28^{low}CD8⁺ regulatory T cells: Of mice and men’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 8(JAN), p. 31. doi: 10.3389/fimmu.2017.00031.

Wallin, M. T. *et al.* (2019) ‘Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016’, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group, 18(3), pp. 269–285. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30443-5.

Wang, J. Y., Lee, C. T. and Wang, J. Y. (2014) ‘Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia’, *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.048.

Ward, M. H. *et al.* (2018) ‘Drinking water nitrate and human health: An updated review’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijerph15071557.

Watanabe, N. *et al.* (2001) ‘Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide’, *Free Radical Biology and Medicine*. Free Radic Biol Med, 30(9), pp. 1019–1028. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00498-1.

Weber, M. S. *et al.* (2007) ‘Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease’, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 13(8), pp. 935–943. doi: 10.1038/nm1620.

Willis, M. A. and Cohen, J. A. (2013) ‘Fingolimod therapy for multiple sclerosis’, *Seminars in Neurology*. Semin Neurol, 33(1), pp. 37–44. doi: 10.1055/s-0033-1343794.

Wink, D. A. *et al.* (1997) ‘Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress’, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for

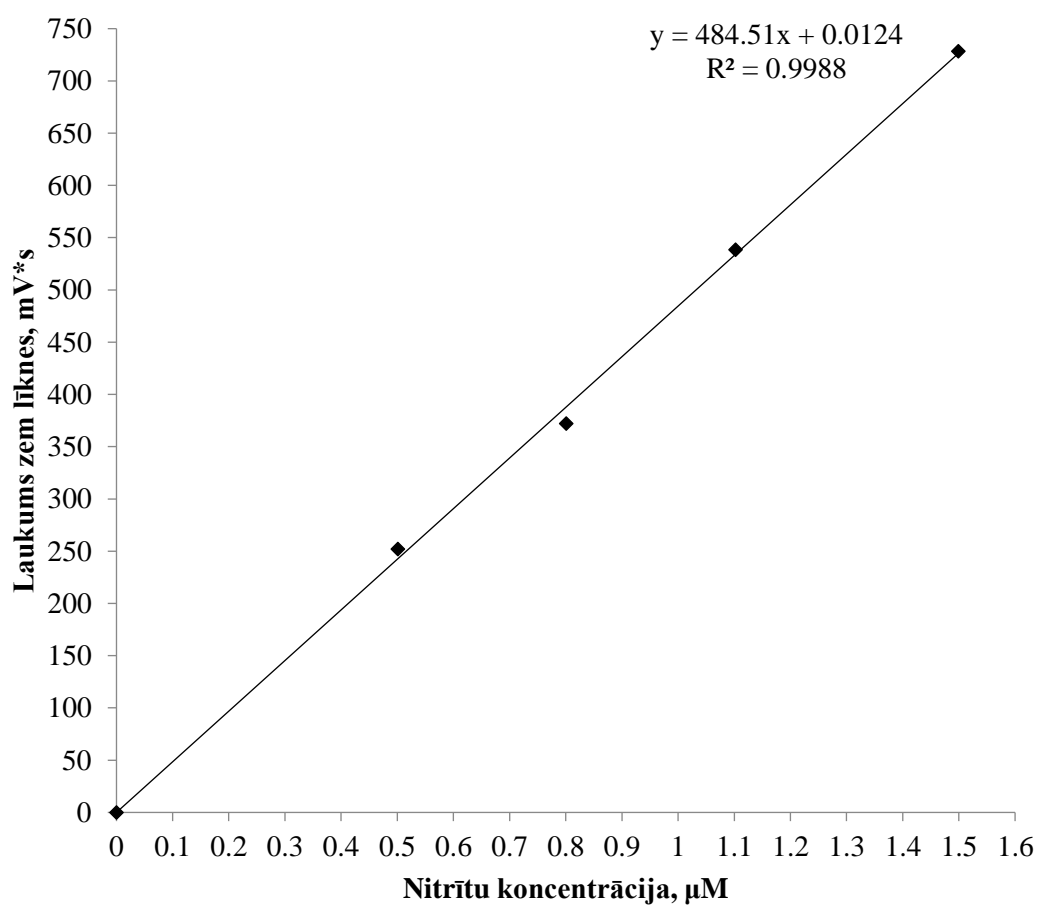
- Biochemistry and Molecular Biology Inc., 272(17), pp. 11147–11151. doi: 10.1074/jbc.272.17.11147.
- Wink, D. A. *et al.* (1998) ‘The multifaceted roles of nitric oxide in cancer’, *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/19.5.711.
- Wink, D. A. and Ford, P. C. (1995) ‘Nitric oxide reactions important to biological systems: A survey of some kinetics investigations’, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. Academic Press, 7(1), pp. 14–20. doi: 10.1006/meth.1995.1003.
- Wink, D. A. and Mitchell, J. B. (1998) ‘Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide’, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 25(4–5), pp. 434–456. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00092-6.
- Witte, M. E. *et al.* (2014) ‘Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis’, *Trends in Molecular Medicine*. doi: 10.1016/j.molmed.2013.11.007.
- Yang, F. *et al.* (1996) *Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence Automation and Analytical Techniques, Clinical Chemistry*.
- Yuceyar, N., Taşkıran, D. and Sagduyu, A. (2001) ‘Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients’, *Clinical Neurology and Neurosurgery*. Elsevier, 103(4), pp. 206–211. doi: 10.1016/S0303-8467(01)00144-5.
- Yuste, J. E. *et al.* (2015) ‘Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi: 10.3389/fncel.2015.00322.
- Zang, Y. C. Q. *et al.* (2004) ‘Increased CD8 + Cytotoxic T Cell Responses to Myelin Basic Protein in Multiple Sclerosis’, *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 172(8), pp. 5120–5127. doi: 10.4049/jimmunol.172.8.5120.
- Zhao, Y. *et al.* (2017) ‘Exploration of machine learning techniques in predicting multiple sclerosis disease course’, *PLOS ONE*. Edited by S. V. Ramagopalan. Public Library of Science, 12(4), p. e0174866. doi: 10.1371/journal.pone.0174866.
- Zindler, E. and Zipp, F. (2010) ‘Neuronal injury in chronic CNS inflammation’, *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*. doi: 10.1016/j.bpa.2010.11.001.

PIELIKUMI

1. Pielikums.

Hemiluminiscences detektora kalibrēšanas
tabula un grafiks, nitrītu kvantificēšanai

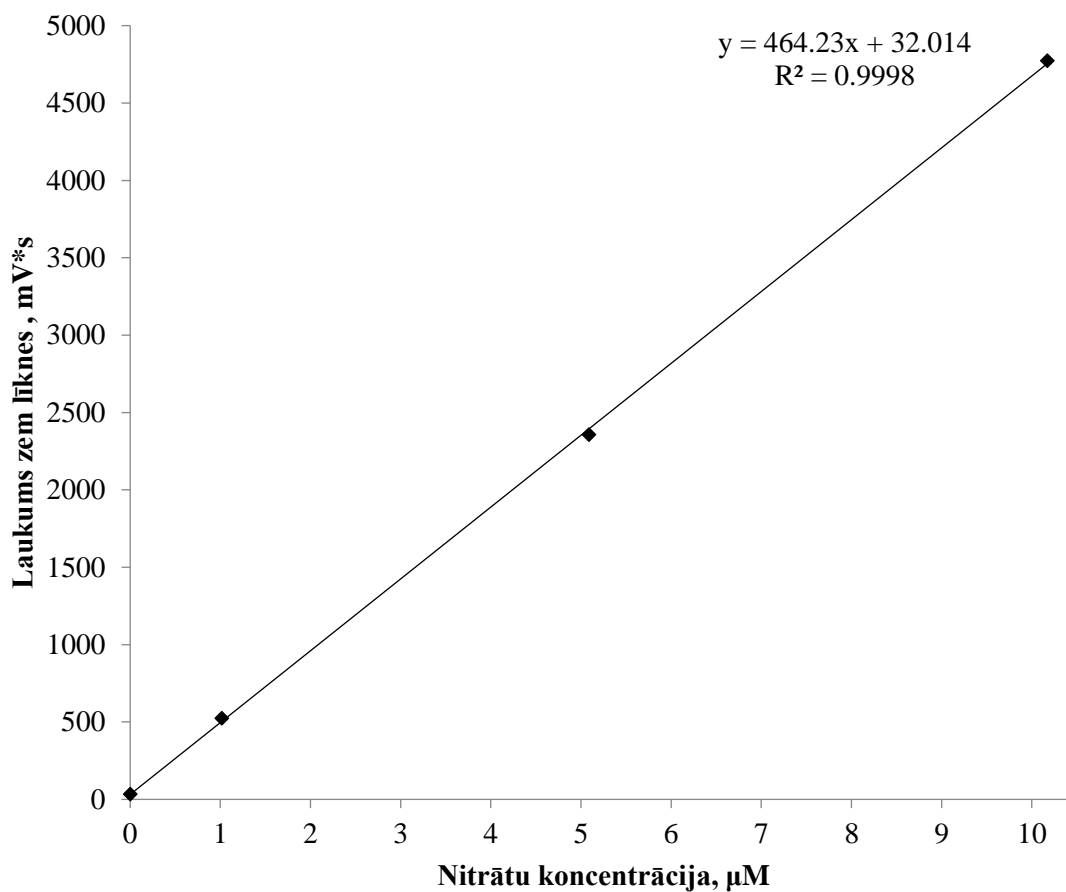
<i>Nitrītu koncentrācija, μM</i>	<i>Laukums zem līknes, $\text{mV}\cdot\text{s}$</i>
0,00	0,000
0,50	252,2
0,80	372,2
1,10	538,6
1,50	728,5



2. Pielikums.

Hemiluminiscences detektora kalibrēšanas
tabula un grafiks, nitrātu kvantificēšanai

<i>Nitrātu koncentrācija, μM</i>	<i>Laukums zem līknes, $\text{mV}\cdot\text{s}$</i>
0,00	34,17
1,00	523,0
5,10	2356
10,2	4772



3. Pielikums.

Pētījumu dati par NO_x koncentrācijām
cilvēku serumā

<i>Paraugs</i>	<i>NO_x koncentrācija, μM</i>	<i>SD</i>	<i>Grupa</i>	<i>Metode</i>	<i>Izlases izmērs</i>	<i>Vidējais vecums</i>	<i>Dzimumu attiecība (V/S)</i>	<i>Avota doi numurs</i>
<i>Serums</i>	46,0	26,0	<i>Kontroles grupa</i>	<i>Grissa metode</i>	249	36,8	72/177	10.1007/s1 2035-015-9648- 6
<i>Serums</i>	69,06	29,04	<i>Kontroles grupa</i>	<i>Grissa metode</i>	163	43,45	57/106	10.1155/ 2011/167156
<i>Serums</i>	19,3	3,7	<i>Kontroles grupa</i>	<i>Grissa metode</i>	18	33,12	8/10	10.1016/S0303- 8467(01)00144- 5
<i>Serums</i>	107,94	43,87	<i>MS Pacienti</i>	<i>Grissa metode</i>	170	45,27	55/115	10.1155/ 2011/167156
<i>Serums</i>	2,04	0,7	<i>MS Pacienti</i>	<i>Grissa metode</i>	44	43,5	12/32	10.1155/2016/ 4570351
<i>Serums</i>	37,7	28,89	<i>MS Pacienti</i>	<i>Grissa metode</i>	25	34	4/21	10.1016/ S0303-8467(01) 00144-5

DOKUMENTĀRA LAPA

Bakalaura darbs

„Slāpekļa (II) oksīda metabolīti multiplās sklerozes slimnieku asins plazmā atkarībā no terapijas efektivitātes”

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Jevgenijs, Bodrenko _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Zinātniskais asistents, Vitālijs, Borisovs _____
(amats, vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Recenzents: _____
(amats, vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2020., prot. Nr. _____.
Komisijas sekretāre: docente Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____
(paraksts)