

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ**

**( UZMANLIK TEZİ )**

**MULTİPL SKLEROZ HASTALARINDA METİLPREDNİZOLON  
TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI OKSİDATİF STRES, NİTROZATİF  
STRES VE ENFLAMASYON BELİRTEÇLERİNİN İNCELENMESİ**

**DR. MAHMURE ASLAN**

**DANIŞMAN**  
**PROF. DR. ARZU SEVEN**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2008**

## TEŞEKKÜR

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince biyokimya bilgisini, öğrenme arzusunu ve etik anlayışını taktirle karşıladığım saygı değer hocam, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof. Dr. Gülden Burçak'a,

Eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, iş disiplini anlayışını kendime örnek aldığım, tezimin hazırlanmasında gösterdiği özveri ve katkılarından dolayı danışmanım, değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Arzu Seven'e,

Eğitimimde emeği geçen başta Prof. Dr. Dildar Konukoğlu olmak üzere İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Birlikte zevkle çalıştığım, iyi ve kötü günlerimi paylaştığım sevgili asistan arkadaşlarım ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, hayatı birlikte yaşamaktan sonsuz mutluluk duyduğum sevgili eşim Cem ve oğlum Ilgaz'a

Tezimin her aşamasında katkısı bulunan, teşekkürü en çok hak eden canım ablam Mesrure Köseoğlu Bitnel'e,

Teşekkür ederim.

Dr. Mahmure Aslan

**Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje no: T-1403 / 20082007.**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Multipl Skleroz.....	3
2.2. Tarihçe.....	4
2.3. Epidemiyoloji.....	4
2.4. Genetik.....	6
2.5. Patoloji.....	7
2.6.1.Miyelinizasyonun Düzenlenmesi.....	9
2.6.2. Demiyelinizasyon Mekanizmaları.....	9
2.6.3.Akson Dejenerasyonu.....	11
2.6.4.Patogenezde enflamasyonun yeri.....	12
2.6.5.Patogenezde oksidatif ve nitrozatif stresin yeri.....	15
2.7. Hastalığı Tetikleyen Nedenler.....	21
2.8. Hastalığın Seyri.....	22
2.9. Klinik belirti ve bulgular.....	23
2.10. Tanı Kriterleri.....	24
2.11. Tedavi.....	27
2.11.1 Akut atak tedavisi.....	27
2.11.2. İmmunmodülatuvar tedaviler.....	28
2.11.3. MS’te immünosupresyon tedavisi.....	29
2.12. Seyir ve Prognoz.....	29
2.12.1.Genişletilmiş Özürülük Durum Ölçeği.....	30
2.13.MS’de enflamasyon göstergeleri.....	31
2.13.1.Hücre adezyon molekülleri:.....	31
2.13.2. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- ).....	32
2.14. MS’de oksidatif ve nitrozatif stres göstergeleri.....	33
2.14.1. Malondialdehit (MDA):.....	33

2.14.2. Nitrik oksit (NO):	33
2.14.3. 8-izoprostan (PG F <sub>2</sub> ):	35
2.14.4. Konjuge dien:	37
2.14.5. Nitrotirozin:	37
2.14.6. Ürik asit:	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	39
3.1. Kullanılan Gereçler	40
3.2. Yöntemler	40
3.2.1. Malondialdehit (MDA) ölçümü	40
3.2.2. 8-izoprostan (PG F <sub>2</sub> ) ölçümü	41
3.2.3. Konjuge dien ölçümü	43
3.2.4. Nitrotirozin ölçümü	44
3.2.5. Nitrit-nitrat(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) ölçümü	47
3.2.6. Ürik asit ölçümü	48
3.2.7. TNF ölçümü	50
3.2.8. Hücreler arası adezyon molekülü( ICAM-1) ölçümü	52
3.2.9. Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ölçümü	54
3.2.10. İstatiksel değerlendirme	57
4. BULGULAR	58
4.1. İstatistik anlamlılık	59
4.2. Korelasyon analizi bulguları	60
5. TARTIŞMA	74
6. ÖZET	80
7. SUMMARY	81
8. KAYNAKLAR	82
9. ÖZGEÇMİŞ	101
10. BİLİMSEL ÇALIŞMALAR	102

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Reaktif oksijen metabolitleri (ROM)

Tablo 2.2. Reaktif nitrojen metabolitleri (RNM)

Tablo 2.3. ROM/RNM oluşturan kaynaklar

Tablo 2.4. Mc Donald tanı kriterleri

Tablo 2.5. Prognoz Üzerine Etkili Faktörler

Tablo 3.1. Demografik bilgiler

Tablo 4.1: Kontrol grubu kan örneklerinde incelenen biyokimyasal parametrelere ait bulgular

Tablo 4.2: Multipl skleroz hastalarında metilprednizolon tedavi öncesi incelenen kan parametrelerine ait bulgular

Tablo 4.3: Multipl skleroz hastalarında 5-10 günlük 1gr/gün metilprednizolon tedavi sonrası incelenen kan parametrelerine ait bulgular

Tablo 4.4: Kontrol grubu BOS örneklerinde incelenen biyokimyasal parametrelere ait bulgular

Tablo 4.5: Multipl skleroz hastalarında metilprednizolon tedavi öncesi incelenen BOS parametrelerine ait bulgular

Tablo 4.6: Metilprednizolon tedavi öncesi ve sonrasında MS ve kontrol grubunun kan parametrelerinin değerlendirilmesi (ortalama  $\pm$  SD) ve istatistik anlamlılık

Tablo 4.7: MS hastaları ve kontrol grubu BOS parametreleri (ortalama  $\pm$  SD) ve istatistik anlamlılık

Tablo 4.8: Kontrol grubunda incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]

Tablo 4.9: MS hastalarında tedavi öncesi incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]

Tablo 4.10: MS hastalarında tedavi sonrası incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]

Tablo 4.11: Kontrol grubunda incelenen BOS parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]

Tablo 4.12: MS hastalarında incelenen BOS parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. MS’de tanımlanan dört farklı immünopatolojik patern

Şekil 2.2. İnflamasyon mekanizması

Şekil 2.3. Serbest radikal hasarının hedefleri ve ürünleri

Şekil 2.4. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidroksil radikali oluşumu

Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu

Şekil 2.6. MS’in klinik tipleri

Şekil 2.7. Nitrik oksit (NO)

Şekil 2.8. İzoprostan oluşumu

Şekil 3.1. 8-izoprostan standart eğrisi

Şekil 3.2. Nitrotirozin standart eğrisi

Şekil 3.3.  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  standart eğrisi

Şekil 3.4. TNF standart eğrisi

Şekil 3.5. ICAM-1 standart eğrisi

Şekil 3.6. VCAM-1 standart eğrisi

## SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotrofik hormon
<b>ASH</b>	: Antijen sunan hücreler
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş hidroksitoluen
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>DAN</b>	: 2,3-diaminonaftalen
<b>EAE</b>	: Experimental autoimmune Encephalomyelitis- Deneysel otoimmün ensefalomyelit
<b>EDSS</b>	: Expanded Disability Status Scale - Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay - Enzim bağlı immünosorbent ölçüm
<b>ETI</b>	: Endotelin I
<b>GEAP</b>	: Glial fibriler asidik protein
<b>ICAM-1</b>	: Hücreler arası adezyon molekülü
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	: İnterferon $\beta$
<b>İV</b>	: İntravenöz
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>KBB</b>	: Kan beyin bariyeri
<b>LP</b>	: Lomber ponksiyon
<b>LOO•</b>	: Lipid peroksil radikali
<b>LOOH</b>	: Lipid hidroperoksit
<b>MHC</b>	: Major Histocompatibility Complex
<b>MBP</b>	: Myelin basic protein - Miyelin Temel Protein
<b>MCP</b>	: Monocyte Chemoattractive Protein - Monosit Çekici Faktör
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinazlar
<b>MOG</b>	: Miyelin-oligodendrosit glikoprotein
<b>MOBP</b>	: Miyelin-ilişkili oligodendrosit temel protein
<b>MP</b>	: Metilprednizolon
<b>MR</b>	: Manyetik rezonans
<b>MRG</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MRSg</b>	: Manyetik rezonans spektroskopik görüntüleme



<b>MRF-1</b>	: Microglia response factor-1 - Mikroglia yanıt faktörü-1
<b>MS</b>	: Multipl Skleroz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrit
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrat
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>ONOOH</b>	: Peroksinitrit
<b>OSP</b>	: Oligodendrosit-spesifik protein
<b>PLP</b>	: Proteolipid protein
<b>PPMS</b>	: Primer progresif multipl skleroz
<b>RPMS</b>	: Relapslarla seyreden progresif multipl skleroz
<b>RRMS</b>	: Relaps ve remisyonlar ile seyreden multipl skleroz
<b>PSS</b>	: Periferik Sinir Sistemi
<b>ROR</b>	: Reaktif oksijen radikalleri
<b>SPMS</b>	: Sekonder progresif multipl skleroz
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik asitle reaksiyonlaşan maddeler
<b>TMB</b>	: Tetrametilbenzidin
<b>TNF-</b>	: Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü
<b>VEP</b>	: Görsel uyarılmış potansiyel

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Skleroz (MS); santral sinir sisteminin (SSS) çeşitli bölgelerinde, kronik enflamasyon, demiyelinizasyon ve sklerozisle karakterize, etyolojisinde genetik, viral ve immunolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülen, ataklarla seyreden kronik bir hastalıktır.

Hastalık yaygın olarak, SSS miyelinine yönelir, çok odaklı lezyonlar ve klinik belirtiler meydana getirir. Her ne kadar en büyük değişiklikler beyaz cevherde oluşursa da günümüzde hem beyaz hem de gri cevherin bu enflamatuvar süreçten etkilendiği bilinmektedir.

Hastalığın en önemli özelliği heterojen olmasıdır. Klinik sunum, seyir, görüntüleme özellikleri, patoloji bulguları ve tedavi cevabı başta olmak üzere birçok yönden hastalar arasında büyük farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, MS'in tek bir hastalık olmayıp bir sendrom olarak görülme eğiliminin oluşmasına neden olmuştur [1].

Klinik ve patolojik özellikleri ile ilk kez tanımlandığı 1868 yılından bu yana yüz kırk yıl geçmiş olmasına rağmen hastalıkla ilgili bilgilerimiz hala yetersizdir. Yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen etyolojisi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Genel olarak kabul gören görüşe göre, genetik ve çevresel faktörlerin karşılıklı ve karmaşık etkileşimleri etyolojiden sorumludur. Özellikle son çeyrek asırda immünoloji bilim dalındaki gelişmelere paralel olarak hastalığın immün patogenezi ile ilgili bilgilerimizde önemli artışlar ve bunun tedaviye yansımalarını gözlemlenmiştir. Ayrıca bu dönemde manyetik rezonans görüntülemenin (MRG) klinik kullanıma girmesi ve daha sonra yeni tekniklerin geliştirilmesi; hastalığın tanısına, seyrinin izlenmesine ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

MS'de tanı; semptom ve bulgularla hastalığın klinik seyri dikkate alınarak konmaktadır. Manyetik rezonans (MR), nörofizyolojik testler ve beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesi tanıya ulaşmada önemli katkılar sağlar. Ancak kesin tanı koydurtacak bir laboratuvar bulgusu yoktur [2,3].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, MS'in etyopatogenezinde oksidatif ve nitrozatif stres ile enflamasyonun birlikte rol aldığını göstermektedir. Bu doğrultuda planladığımız çalışmamızda amacımız; Relapsing-Remitting MS (RRMS) hastalarında oksidatif stres göstergesi olarak 8-izoprostan, malondialdehid (MDA) ve konjuge dien düzeylerini, nitrozatif stres göstergesi olarak nitrotirozin ve nitrit-nitrat ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) ve peroksinitrit tutucusu olan ürik asid düzeylerini, enflamatuvar belirteçler olarak TNF ve adezyon moleküllerinden ICAM-1, VCAM-1 düzeylerini incelemek ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmaktır. Bu

parametreler serum ve BOS örneklerinde immunsupresif etkili metilprednizolon (5-10gün IV 1000mg/gün) tedavisi öncesi ve sonrasında deęerlendirilmiřtir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multipl Skleroz

Multipl Skleroz (MS), SSS'ni multipl lokalizasyonlarda etkileyen, genetik ve çevresel etmenlerin karmaşık etkileşimleri sonucu oluştuğu varsayılan, olasılıkla otoimmün, yaşamı değil yaşam kalitesini sınırlayan kronik bir hastalıktır. Enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson kaybı belli başlı patolojik bulgularını oluşturmaktadır.

Bu hastalığa ait klinik ve patolojik tanımlama ilk kez 1868 yılında Charcot tarafından yapılmıştır. Hastalığın prevalansı 0.5-1/1000'dir ve 18-50 yaşları arasında, kadınlarda erkeklere göre daha sık olarak görülür [4]. MS hastalığında, beyin ve spinal kord beyaz cevherinde ortaya çıkan enflamatuvar plaklar multifokal nörolojik defisitlerle kendini gösteren, hastalanma ve iyileşme dönemlerinin birbirini izlediği ataklara neden olur. Plaklar karakteristik olarak çok sayıda ve değişik yaşlardadır. Her atakta birkaç akson yıkıma uğrar, sonraki ataklar da aynı traktüsü etkilerse, toplam bir etki ile akson kaybı kalıcı hale gelir ve nörolojik fonksiyonlarda ilerleyici kayba yol açar. Başlangıç şikayetleri sıklıkla güçsüzlük, duyu kayıpları, uyuşma, çift görme ve yürüme güçlüğüdür. Hastalığın ilerlemesiyle miksiyon ve defekasyon kontrolünün kaybı, körlük, felçler ve bilinç kaybına kadar giden tablolar ortaya çıkabilir.

MS nöropatolojisinin çok farklı değişimler sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. MS'te enflamasyon ağırlıklı akut bir süreç yanında, nöron kaybı ve gliozisle sonuçlanan kronik değişiklikler birlikte ya da ayrı ayrı izlenmektedir. Yıllarca SSS immünolojik olarak "korunmuş" bir yapı olarak düşünülmüştür. Beyin ve bağışıklık konusundaki bilgilerin gelişmesine paralel olarak belli patolojik şartlarda önceden immün cevap göstermeyen beyin dokusunun enflamatuvar bir ortama dönüştüğü ve kendi dokusu ile "yabancı-immün" hücreler arası iki yönlü bir iletişim başlattığı düşünülmektedir. Bu ilişki sadece MS gibi bir otoimmün hastalık için değil travmatik beyin zedelenmesi, SSS infeksiyonları ya da nörodejeneratif hastalıklar için de geçerli görünmektedir. Patolojik olarak değişmiş beyin dokusu Major Histocompatibility Complex (MHC) moleküllerini belirginleştirmekte, lokal sitokinleri üretmekte, aktive olmuş T hücreleri kan beyin bariyerini (KBB) geçerek SSS'ne girebilmektedir [5]. Normalde Th1 hücrelerinden salınan proenflamatuvar ve Th2 hücrelerinden salınan anti-enflamatuvar sitokinler arasında ince bir denge söz konusudur. MS'te bu dengenin proenflamatuvar sitokinler lehine bozulması sonucunda demiyelinizasyon meydana gelmektedir.

MS; genellikle genç erişkinlerde görülür, yaşam kalitesini ileri derecede bozar ve hatta ciddi sakatlıklara yol açar. Hastaların mesleki başarılarını ve toplumsal ilişkilerini olumsuz yönde etkiler. Hastalığın tıbbi ve toplumsal etkilerinin yanı sıra, önemli bir ekonomik boyutu da vardır. Tanı ve tedavi giderlerine ek olarak iş verimini de ileri derecede düşürerek ülke ekonomisini olumsuz yönde etkiler.

## 2.2. Tarihçe

İngilizler tarafından “disseminated sclerosis”, Fransızlar tarafından da “sclerose en plaques” olarak adlandırılmıştır [4].

Hastalık ile ilgili ilk bildiri 1824’te, Charles Prosper Ollivier d’Angers, tarafından yayınlanmış, 1838’de Robert Carswell, 1842’de Cruveilhier MS’in patolojik bulgularından ve MS plaklarından bahsetmişlerdir. 1849’da Freidrich Theodore von Frerichs, yaşayan bir hastada klinik tanıyı koyup, spontan remisyonların görüldüğünü bildirmiştir. Fransız nörolog, Jean Martin Charcot, 1868 yılında MS’in en önemli klinik ve patolojik yönlerini ortaya koyan ilk tanımını yapmıştır [6].

1933 yılında Thomas River, MS’in bir hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyeliti (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) geliştirmiştir. Bu ilk EAE modelleri monofazik seyir gösterdiği için MS’in klinik gidişini tam yansıtmamaktadır [7]. Takip eden yıllarda, immünizasyon yöntemleri ile kronik veya ataklarla seyreden EAE modelleri geliştirilmiştir. EAE modelleri, MS’in genetik olarak yatkın bir bireyde kendi antijenlerine karşı oluşmuş otoimmün cevaba ikincil olarak geliştiği hipotezinin ortaya çıkmasını sağlamıştır [7]. Aynı zamanda bu modeller hastalığının immün patogenezinin anlaşılmasında ve potansiyel tedavilerin geliştirilip denenmesinde de önemli yer tutmaktadır. 1948 yılında Evlin Kabat, MS hastalarının BOS’larında oligoklonal immünglobulinlerin arttığını göstererek hastalığın enflamatuvar yönüne dikkat çekmiştir [8-9].

## 2.3. Epidemiyoloji

MS’in genç erişkinlerde ve erkeklere oranla kadınlarda daha sık görüldüğü bilinmektedir. Hastaların yaklaşık 2/3’ünde başlangıç yaşı 20 ile 40 arasındadır [5]. Çeşitli prevalans çalışmalarında kadın:erkek oranı 2,1:1 olarak bildirilmektedir [10]. Daquette, % 2.7 vakada başlangıç yaşının 16 yaş altında saptandığını ve erken başlangıçlı vakalarda kadın:erkek oranının 3:1 olduğunu bildirmiştir [10]. Çocuklarda başlangıç yaşı genellikle 10-13

arasındadır. Şimdiye kadar rastlanılan en erken MS olgusu 10 aylık bir bebeğe aittir. Kırklı yaşlardan sonra bu insidansın azaldığı gözlenmektedir. Ancak altmış yaşından sonra izlenen geç başlangıçlı ya da geç tanı aldığı düşünülen MS hastaları da vardır [11]. Başlangıç yaşı geç olan hastalarda, cinsiyet farkı olmadığı bildirilmektedir [12].

MS prevalansı; 1-100 / 100.000 arasında değişkenlik göstermektedir [13]. En sık görüldüğü ülkeler Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Kanada, Güney Avustralya ve Yeni Zelanda'dır. Bu ülkelerdeki prevalans 30-80/100,000 veya biraz daha fazladır. Japonya, Çin ve Güney Amerika düşük prevalansa sahip ülkelerdir (5/100,000). Ülkemizde MS prevalansı ve insidansı bilinmemektedir, ancak klinik gözlemlere göre son yıllarda hasta sayısında artış gözlenmiştir.

MS'in nedeni bilinmemesine karşın, mevcut bulgular çevreden gelen bir etkenin genetik olarak duyarlı bir bireyde hastalığı tetiklediğini göstermektedir. Bu bulgular MS için hem genetik hem de çevresel nedenlerin araştırılmasına yol açmıştır.

Coğrafi özelliklere bakıldığında, Kurtzke [14] çok sayıdaki epidemiyolojik çalışma sonuçlarını toplayarak, yüksek, orta ve düşük prevalans oranları gösteren coğrafi bölgeleri tarif etmiştir. Buna göre MS'in her iki yarım kürede ekvatorдан uzaklaştıkça sıklaştığı, özellikle ılıman ve soğuk iklim kuşağında daha çok görüldüğü gözlenmektedir [10].

Aynı coğrafyada yaşayan ancak ırk ve etnik farklılıkları olan topluluklarda çarpıcı prevalans farklılıkları bildirilmekte; beyaz ırkta daha fazla görüldüğü vurgulanmaktadır. Afrika'da yaşayan siyahlarda hastalığın çok ender olduğu, ABD'de yaşayan siyahlarda ise insidansın beyazların yarısı kadar olduğu bilinmektedir [15].

İrk ve etnik açıdan klinik özellikler de farklılık gösterir. Japonya ve diğer Asya ülkelerinde hastalık daha çok optik sinirleri ve spinal kordu tutarken, Avrupa ve Kuzey Amerika'da bu tutulum nadirdir [10].

Prevalansın, farklı coğrafi bölgelerdeki değişkenliği, çalışmaların göçmenler üzerinde odaklanmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar, genetik faktörler sabitken, çevresel faktörlerin, MS riskine etkilerini göstermektedir. Bunun yanında göç yaşının da önemi vurgulanmaktadır. Yüksek riskli bölgelerde doğan bireyler 15 yaşından önce düşük riskli bölgelere göç eder ve buralarda yerleşirlerse, MS gelişimi açısından taşıdıkları risk azalmaktadır. Tersine, 15 yaşında önce yüksek riskli bir bölgeye göç ederlerse MS gelişme riskleri artar [10]. Bunun sebebi yaşamın erken dönemlerinde etkili olan bir takım çevresel etmenler veya uzun inkübasyon periyodu olan virus gibi bazı enfeksiyöz ajanlardır.

Araştırmacılar viral, bakteriyel infeksiyonlar, çevresel toksinler, güneş ışığından uzak kalma, ısı ve nem değişiklikleri ve beslenme alışkanlıklarının MS gelişiminde etkili

olabileceğini veya şiddetini arttırabileceğini düşünmektedirler. Ancak bugüne değin MS'in nedeni olarak özgül bir çevresel neden ortaya konamamıştır.

Bazı virüsler insan ve hayvanlarda beyin ve omurilikte demiyelinizasyona neden olabilir. MS atakları basit viral infeksiyon sonrasında diğer zamanlara göre daha sık görülür. Bu tip infeksiyonları izleyen hastalığın klinik şeklinin her hastada aynı olmaması ve MS'li hastaların beyinlerinden infeksiyöz materyelin güvenli bir şekilde elde edilememesi MS ile infeksiyöz etkenler (insan herpes virusu-6, klamidya vb.) arasındaki ilişkinin belirsiz kalmasına neden olmuştur.

## 2.4. Genetik

MS'de genetik faktörlerin rolü olabileceği ilk kez 19. yüzyılın ikinci yarısında ailevi olguların farkedilmesiyle gündeme gelmiştir. İlk genetik birliktelik insan lökosit antijenleri (sınıf I) için 1972 de bildirilmiştir. Aradan 30 yılı aşkın bir süre geçmesine karşın MS'in kesin etyolojisi, genlerin ve çevrenin rolleri hala bilinmemektedir.

MS özellikle Kuzey-Avrupa'dan ABD'ye göç etmiş beyaz ırkta sık görülmesine karşın yüksek risk bölgelerinde yaşayan Kızılderililerde, Afrika kökenli siyahlarda ve Asyalılarda nadiren görülür. Bu bilgilere göre, eğer MS genetik faktörlerin rol almadığı sadece çevresel nedenlerle gelişen bir hastalık olsaydı, yüksek riskli bölgelerdeki her etnik grupta görülmesi beklenirdi.

Birden fazla MS'linin bulunduğu ailelerde etkilenmemiş aile bireyleri genel nüfustaki MS olmayan bireylerle karşılaştırıldığında riskleri fazladır (%1-4). Genel nüfusta MS gelişme riski yaklaşık %0.15 dir [16].

Ailesel sıklık ve dağılım birçok genin genetik yatkınlığa katkıda bulunduğunu gösterir. İkiz çalışmalarında tek yumurta ikizlerinde % 26 konkordans saptanırken, çift yumurta ikizlerinde bu oran %2.4 dür [16]. Genetik yatkınlığın 6. kromozomun kısa kolunda lokalize HLADRDQ bölgesine yakın olan veya içinde bulunan genlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir [17].

MS poligenik bir hastalıktır. MS'de sıklıkla HLADR2, DR3, B7, A3, DR15, DQ6, DW2 birlikteliği görülür. Türk toplumunda DQ2 ve DR14 antijenlerine sık rastlanırken, Avrupa ve Kuzey Amerikadaki MS'lilerde DW2 daha fazla görülmektedir.

Genetik, infeksiyöz ve çevresel faktörlerin MS oluşumundaki önceliği konusundaki tartışmalar sürmektedir. Bütün kompleks geçişli hastalıklarda olduğu gibi genetik ve çevresel faktörler birlikte etkileşerek MS' e yatkınlığı ve prognozu belirlemektedir.

## 2.5. Patoloji

MS'teki esas patolojik değişiklik olan fokal demiyelinizasyon; plağın yaşına göre değişiklik göstermektedir. Plaklar sıklıkla korteksin gri cevherine, serebrum ve serebellumun derin gri cevher yapılarına uzanır. Plaklar periventriküler bölgede lokalize olup özellikle serebral hemisferlerdedir. Ancak beyaz cevherin herhangi bir bölgesinde de olabilir. [18].

SSS'nin parçaları olan beyin sapı, serebellum, spinal kord ve optik sinirde de plak formasyonu görülebilir. Plakların en sık izlendiği bölgeler yan ventrikülün çevresi (özellikle nukleus kaudatus ile korpus kallosum arası) 4. ventrikül tabanı ve tavanı, optik sinir, pons, akuadukt çevresi ve medulla spinalistir.

MS'de görülen başlıca patolojik değişiklikler [19]:

Çok sayıda birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar değişebilen büyüklüklerde, sınırları keskin, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli plaklar görülür.

Lezyonlar değişik yaşlarda olabilir. Yeni ve eski lezyonlar bir arada görülebilirler.

Makroskopik ve mikroskopik bulgular, plağın yaşına ve aktif olup olmamasına göre değişir. Aynı plakta aktif ve inaktif alanlar birlikte görülebilir, otopside daha çok inaktif plaklar görülür.

Histopatolojik incelemede 4 farklı grup MS plağı ayırt edilir [20].

Kronik plak

Kronik aktif plak

Akut plak

Gölge plak

## 2.6. Patogenez

MS; klinik tanımı ve nedeni konusundaki yoğun araştırmalara karşın kesin patogenezi bilinmeyen ve belirsizliğini koruyan bir hastalıktır. MS'te atakların hedefi miyelin kılıf ve oligodendrositlerdir. Birincil hedefin miyelin mi yoksa oligodendrositler mi olduğu konusu tartışmalıdır.

MS; genetik olarak yatkın kişilerde; çevresel faktörlerin, viral veya bakteriyel ajanların, enflamatuvar ve otoimmün cevap sırasında salgılanan sitokinlerin ve henüz tanımlanamayan bazı etyolojik ajanların kombinasyonu sonucu gelişen bir hastalıktır. SSS'nde marjinal demiyelinizasyondan, oligodendrositlerin tam kaybına kadar değişen doku



kaybı, ağır glial skar gelişimi ve akson hasarının oluşması ile şekillenmektedir [21]. İnsanda en sık görülen demiyelinizan hastalık olan MS’de, oligodendrositler demiyelinizasyonun tamirinde (remiyelinizasyon) yetersiz kalmaktadırlar. Sonuçta kalıcı miyelin ve oligodendrosit kaybı ile nörolojik sekeller gelişmektedir. Hastalığın erken dönemlerinde immatür oligodendrositler tarafından oluşturulan normalden daha ince miyelinize aksonlar görülmektedir [22].

SSS’ndeki miyelin, oligodendrositlerin plazma membranlarının özelleşmiş uzantıları tarafından oluşturulan bir yapıdır. Yüksek lipid/protein oranı ile karakterize olan bu yapı, intrasellüler membran ve plazma membranına göre daha az sayıda protein kapsar [23]. Aksonların miyelinizasyonu, oligodendrositlerin (santral sinir sisteminde) ve Schwann hücrelerinin (periferik sinir sisteminde) plazma membranlarının uzantılar oluşturması ve biyokimyasal modifikasyonu sonucu gelişmektedir. Schwann hücrelerinin aksine oligodendrositler çok sayıda sinirin aksonu ile etkileşerek miyelinizasyonu sağlayabilmektedir.

Miyelin temel olarak; SSS ak maddesi ve geniş motor aksonlar içeren periferik sinirlerde bulunan, lipid ve proteinden oluşan bir membrandır. Yapısının %70’i lipid, %30’u proteinden oluşmaktadır. Miyelin kılıfını oluşturan lipidlerin bileşiminde kolesterol %25, galaktolipid %29 ve fosfolipidler %46 oranında bulunmaktadır. Galaktoserebrozid miyelindeki major galaktolipiddir [24]. Miyelin kılıfı içiçe geçmiş tabakalar şeklindedir. Aksonun miyelinize segmentleri, “Ranvier düğümlerinin” bulunduğu, düzenli bir şekilde yerleşmiş miyelin içermeyen alanlar ile birbirinden ayrılmaktadır. Ranvier düğümlerinde bulunan sodyum kanalları, aksiyon potansiyelinin iletimini sağlar [23-24].

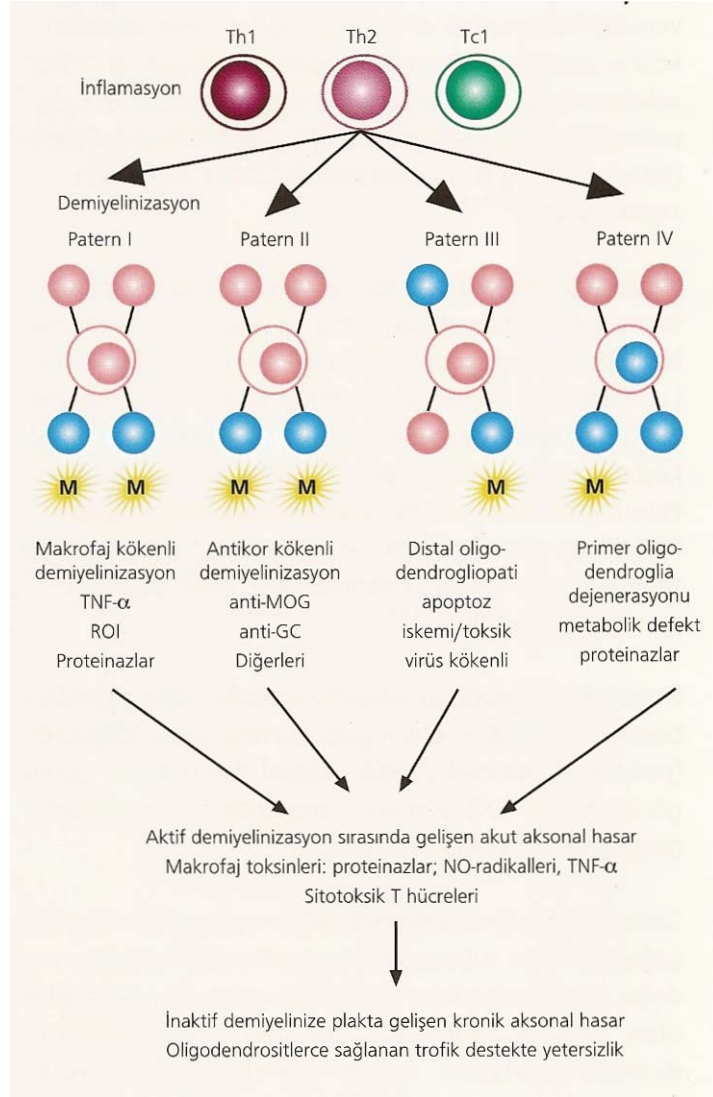
Bazı miyelin proteinleri hem SSS, hem de Periferik Sinir Sistemi (PSS)’nde yer almakta iken, bazıları seçicilik göstermektedir. SSS kompakt miyelini; proteolipid protein (PLP), oligodendrosit-spesifik protein (OSP), miyelin-oligodendrosit glikoprotein (MOG), miyelin-ilişkili oligodendrosit temel protein (MOBP) ve miyelin temel protein (MBP) içermektedir [23].

### 2.6.1.Miyelinizasyonun Düzenlenmesi

Miyelinin yapımından sorumlu hücreler olan oligodendrositler; astrositler, nöronlar ve aksonları ile sıkı bir ilişki içindedirler. Nöronlar oligodendrositlerin proliferasyonu ve fonksiyonlarının devamlılığı üzerinde etkilidirler. Oligodendrositler de nöronları etkileyebilirler. Tüm bu hücreler birbirleri ile yakın ilişkili bir ağ oluşturmaktadırlar [25]. SSS'nde, aksonun bulunmadığı in vitro koşullarda oligodendrositlerde miyelin gen ekspresyonu artabilmekte, ancak gen ekspresyonunun yüksek seviyelere ulaşabilmesi ve miyelin yapısının oluşabilmesi için aksonal etkileşim gerekmektedir. PSS'nde ise; Schwann hücrelerinin gelişimi, farklılaşması ve miyelin üretmesi tamamen aksonun varlığına bağlıdır [26].

### 2.6.2. Demiyelinizasyon Mekanizmaları

Oligodendrositlerin kaybı, MS'de gelişen demiyelinizasyondan kısmen sorumludur. Enflamatuvar cevap sırasında gelişen immün mekanizmalar oligodendrositleri hasara uğratar. Aktif makrofajlar veya mikroglial hücreler, TNF- $\alpha$  veya IFN- $\beta$  gibi proenflamatuvar sitokinler salgılayarak oligodendrosit hasarı oluşturabilmektedirler. Oligodendrositlere toksik olan diğer etkenler arasında; reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin oluşumu, glutamat gibi eksitator amino asitlerin üretimi, kompleman komponentlerinin aktivasyonu, proteolitik ve lipolitik enzimlerin salınımı, perfonin/ lenfotoksin gibi ürünlerle T hücre kökenli hasarlanma, fas-ligand ile fas antijeninin etkileşime girmesi, CD8 sınıf I MHC-kökenli sitotoksikite ve tekrarlayan viral enfeksiyonlar sayılabilir [27-28]. Aktif MS lezyonlarının patolojik olarak incelenmesi, demiyelinizasyon gelişiminde farklı mekanizmaların varlığını ortaya koymuştur. Lezyonların büyük bir kısmında T lenfosit ve makrofajlardan oluşan enflamatuvar reaksiyon saptanmasına rağmen, oldukça farklı miyelin yıkılım modelleri gözlenmiştir. Bu bulgulara göre, MS'de dört farklı immüнопatolojik model tanımlanmıştır [29]. (Şekil 1)



Şekil 2.1. MS’de tanımlanan dört farklı immünopatolojik model. [patern: model, OG:oligodendrosit, Th1 ve Th2: yardımcı T lenfositler, Tc1; sitotoksik T lenfositler, M:makrofaj]]

**Model I:** Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon

**Model II:** Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon ve aktif miyelin yıkım alanlarında gözlenen immünoglobulin ve kompleman (C9neo antijeni) birikimi

**Model III:** Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon, miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) kaybı ve oligodendrosit apoptozu

**Model IV:** Makrofajla ilişkili demiyelinizasyon ve beraberinde peri-plak ak maddede oligodendrosit dejenerasyonu

### 2.6.3. Akson Dejenerasyonu

MS hastalarında kalıcı, geri dönüşsüz sekellerin en güçlü nedeni akson hasarıdır [30]. Remiyelinizasyon başlayana kadar aksonların korunması kalıcı nörolojik hasarların ortaya çıkmasını engelleyebilir [31]. Akson hasarı, miyelin kaybına oranla geri planda kalsa da eskiden sanılanın aksine hastalığın erken döneminde başlar ve fonksiyon kaybından sorumludur [32].

Akson kaybı; akson spesifik antikor, kompleman, miyelin spesifik antikor, miyelin spesifik T hücresi, makrofaj, mikroglial hücreler, CD8 T hücresi, nitrik oksit (NO), matriks metalloproteinazlar (MMP) ve glutamat aracılığıyla ortaya çıkan kompleks bir enflamatuvar süreç sonucunda gelişebilir. MS lezyonlarında yoğun olarak bulunan makrofajlar; enflamasyonun alevlenmesi sırasında proenflamatuvar sitokinler, serbest radikaller, glutamat, matriks metalloproteinazlar gibi medyatörler salgılayarak akson hasarına neden olabilirler. Ayrıca aktif makrofajlar kan beyin bariyerini bozarak monosit göçü ve infiltrasyonu ile enflamasyonu daha da şiddetlendirirler. Makrofajlar özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi sitokinleri salgırlar. TNF- $\alpha$ 'nın invitro çalışmalarda nörotoksik olduğu ve özellikle oligodendrosit ölümüyle gelişen demiyelinize alanlarda akson hasarı yaptığı tespit edilmiştir. TNF- $\alpha$  NO üretimini ve glutamat eksisitotoksitesini artırır. Ayrıca invitro IL-6 ve IL-1  $\beta$ 'nin glutamat indüksiyonuyla hasara neden olabileceği tespit edilmiştir.

SSS'nde en yaygın eksitatör nörotransmitter olan glutamat, enflamasyon sırasında aktif immün hücrelerden salınarak miyelin, oligodendrosit ve bazı aksonlarda nekrotik hasara neden olabilir. Glutamat nöronlarda Ca<sup>2+</sup> iyon pompasını inhibe eder. MS hastalarının BOS'nda yükselmiş glutamat seviyesinin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca ekstrasellüler ortamdaki aşırı miktardaki glutamat astrosit ve oligodendrositlerde yıkım ve glutamat temizlenme mekanizmalarında bozulmaya neden olur. Ekstrasellüler matriksin yıkılması ve enflamatuvar hücrelerin SSS'ne girişini kolaylaştıran MMP'lar enflamatuvar hücreler ve özellikle makrofajlar tarafından salgılanırlar ve akson hasarının oluşumunda önemlidirler. (Şekil 2.2)



enflamatuvar reaksiyona yol açabilir (hipoksi, fiziksel- kimyasal ajanlar, ilaçlar, infeksiyon etkenleri ve immun aracılı olaylar), plazma ve hücrel mediatörlerin salınımını tetikleyebilir [33].

Son yıllarda yapılan çalışmalar MS sürecinde nörodejenerasyonun önemli rol oynadığını ve enflamasyonun immünopatogenez üzerinde hasar yapıcı etkisinin yanı sıra olumlu etkilerinin de olabileceğini ortaya koymuştur.

İnflamasyon, yalnızca kan beyin bariyeri aracılığı ile SSS'ne geçen hücrelerle sınırlı değildir. Endojen yerleşimli, astrosit ve mikroglialardan oluşan lokal immün hücreler de bu sürece katılırlar. Bu hücrelerden ikincil enflamatuvar mediatörlerin salınımıyla (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) SSS'ne özgün immün reaksiyon ortaya çıkar. SSS'de astrosit, mikroglia ve perivasküler makrofajlar; antijen sunan hücreler (ASH) olarak görev yaparlar, bu hücreler MHC sınıf II, B7-1 ve LFA-3 molekülleri gibi önemli koreseptör molekülleri ekspres ederler. Mikroglia, beyin homeostazisindeki herhangi bir değişikliğe karşı oldukça duyarlıdır, hızla hücre yüzey ve sitoplazmik antijenlerini artırır, morfolojisini değiştirir [34-35].

Enflamasyon varlığında astrosit ve mikroglialarda bulunan MHC sınıf II, glial fibriler asidik protein (GFAP), mikroglia response faktör-1 (MRF-1) ve bazı enflamasyonu tetikleyici sitokinlerin salınımı artmaktadır [35]. Aktif mikroglia bir yandan demiyelinizasyonun erken döneminde miyelin kalıntılarını endositozla yok ederek fagositer hücre gibi davranırken diğer yandan antijen sunan hücre görevlerini de sürdürebilirler. Ancak, miyelin hasarının gelişiminde direkt makrofaj aracılı miyelin fagositozunun yanısıra, miyeline karşı oluşturulan antikorlar, toksik etki gösteren sitokinler, prostaglandinler ve nitrik asit ürünleri rol oynayabilmektedir.

SSS hasarına karşı gelişen lokal immün yanıtta, NO ve INF gibi sitotoksik moleküller salınır. Bu mediyatörler, glutamat geri alınımını inhibe eder ve makrofaj / mikroglial hücre aktivasyonuna neden olur [36]. Bu durum, bir taraftan da glutamat toksisitesine karşı koruyuculuk sağlamaktadır [37]. Aynı taşıyıcılar makrofaj ve mikroglial hücreler tarafından glutamat salınım ve geri alınımına aracılık ederler. Hücrelerin metabolik durumu ve ekstrasellüler sinyaller, hangi aktivitenin ön planda olacağını belirler [38].

SSS'de makrofajlar uzun süre Wallerian dejenerasyon bölgesinde kalır ve IL-1, TNF gibi sitokinleri salgılayarak diğer hücreleri etkilerler. Ayrıca, makrofajlardan uzun süreli

olarak enflamasyonu tetikleyici sitokin ve/veya serbest radikallerin salınımı, başlangıçtaki doku hasarında sonradan alevlenmelere yol açabilir [34]. MS lezyonlarında aktif T hücreleri, makrofajlar ve mikroglia, sitokin ve kemokin gibi enflamatuvar moleküller ve bu hücrelerle ilişkili diğer araçlar bulunur. Sonuç olarak, biriken lökositlere bağlı doku hiperplazisi, demiyelinizasyon, akson kaybı ve astrositik nedbe dokusu meydana gelir [39].

#### Enflamasyonun olumsuz etkileri

MS'deki demiyelinizasyon alanları, miyelin spesifik T hücreleri, miyeline karşı antikor oluşturma özelliği taşıyan B hücreleri ve mononükleer hücrelerden oluşur. SSS enflamasyonunda, CD4+ T hücreleri önemli rol alsalar da doku hasarının derecesi ve yaygınlığı hem doğal (CD8 T hücreleri ve antikorlar) hem de edinsel (mikroglial makrofajlar) immun sisteme ait elemanların lezyonlardaki varlığına bağlıdır. MS'de hem enflamatuvar hem de dejeneratif bulgular bir arada olup; birincil nörodejenerasyon sürecinde demiyelinizasyon ve akson kaybı hem birbirinden bağımsız hem de bağımlı süreçler olarak ilerlemektedir [39-40].

Kan-beyin bariyerinin bozulması ile mononükleer hücrelerin SSS'ne geçişi ve bu hücrelerin uzaklaştırılmaması sonucu lenfoid artıklar oluşur. Demiyelinize plaklar çevresinde ve perivasküler bölgelerde yerleşmiş lenfosit ve monositler, meninks boşlukları ve normal gri ve beyaz cevherde de bulunabilmektedir [41].

Aktif MS plaklarında enflamasyonu tetikleyici sitokinler ve kemokinler de saptanmıştır. Akut ve kronik MS lezyonlarında *Monosit Cemoattractive Protein (MCP)* ailesinden bazı üyeler saptanmıştır. MS hastalarının postmortem SSS dokusunda CCR1, CCR2, CCR3 ve CCR5 gibi kemokin reseptörlerinin varlığı gösterilmiş, aktif MS plaklarında bu dört kemokin reseptörü için özelleşmiş ligandlar taşıyan köpüksü makrofajlar ve aktif mikroglia da saptanmıştır. MS lezyonlarında benzer bölgelerde saptanan CCR8'in aktif demiyelinizasyon ile direkt ilişkisi saptanmıştır. MS'de T hücrelerinin, hastalığı tetikleyici rolü iyi bilinmektedir [42]. Makrofajlar gibi diğer hücre tiplerinin de nöroenflamasyonun devamı ve değişiminde önemli rolleri vardır. Bu hücreler, T hücrelerini aktive ederek ve iltihabı tetikleyici sitokinler salgılayarak miyelinin fagositozuna yol açarlar. Makrofajlar yalnızca direkt etki ile değil, makrofaj-kaynaklı proteazlar ve/veya NO aracılığı ile de akson hasarında etkili olabilirler [43].

## Enflamasyonun olumlu etkileri

Enflamasyonun MS'in erken dönemlerinden itibaren; demiyelinizasyon ve akson kaybının gelişiminde bir yandan hasar yapıcı diğer yandan da koruyucu etkisi bulunmaktadır. SSS' nin otoimmün demiyelinizasyon süreci sırasında enflamasyonun hangi özelliğinin baskın olacağını genetik alt yapı belirler. Bu duruma ait kanıtların bazıları aşağıda özetlenmiştir.

MS hastalarının beyin örneklerinden izole edilen T hücrelerinin 'brain derived neurotrophic faktör' gibi miyelin koruyucu faktörler salgıladığı saptanmıştır [44].

Makrofajlar miyelin yıkım ürünlerinin temizlenmesini sağlayarak remiyelinizasyonu tetiklerler [45].

Makrofajlar, enflamasyonu tetikleyici sitokinlerin salınımıyla oligodendrosit öncül hücrelerinin artışı da sağlarlar [46].

Aktif makrofajların doku onarımı için gerekli büyüme faktörlerinin üretimini sağlaması, nöral iyileşme açısından olumlu etkilere yol açar [34].

Lisolesitin ile indüklenen demiyelinizasyonda, miyeline karşı gelişen antikorların remiyelinizasyonu tetiklediği gösterilmiştir [47].

Bazı durumlarda, dokuların T hücreleri ile etkileşiminden önce demiyelinizasyonun gelişmesi ve sağlam görümlü SSS'de perivasküler T hücre infiltrasyonunun gözlenmesi enflamasyonun demiyelinizasyonu takip ettiğine dair bir göstergedir [39]. MS patogenezinde kalıcı doku hasarı erken dönemde ortaya çıkar. Erken hastalık dönemlerinde çok belirgin olan remiyelinizasyon ileri evrelerde giderek azalmaktadır.

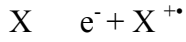
### 2.6.5.Patogenezde oksidatif ve nitrozatif stresin yeri

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisindedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durum prooksidanlar ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması ile oluşur [48].

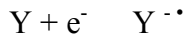
Canlı hücrelerin yapıtaşlarını oluşturan moleküllerin atomları, kovalan bağlarla birbirine bağlıdır. Bu tip bağlar paralel olmayan yörüngelere sahip iki komşu atom arasındaki elektronun ortaklaşa kullanılmasına dayanmaktadır. Yeterli bir enerji kaynağı ile (ısı veya çoğu kez kimyasal etkiler) bu bağ kopabilir. Bu tip bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona



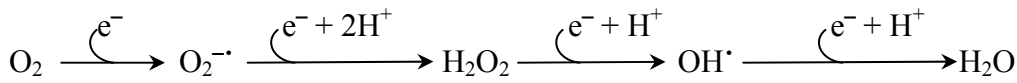
sahip, kısa ömürlü, kararsız, kimyasal reaktiviteleri yüksek molekül veya atomlar “serbest radikal” olarak adlandırılırlar. [49,50] Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşabilir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olup diğer moleküllerle hızlı reaksiyona girerek daha kararlı yapı oluştururlar. Radikal; radikal olmayan atom veya molekülden bir elektron kaybıyla oluşabilir.



Ya da radikal olmayan atom veya molekülün bir elektron kazanması ile oluşur.

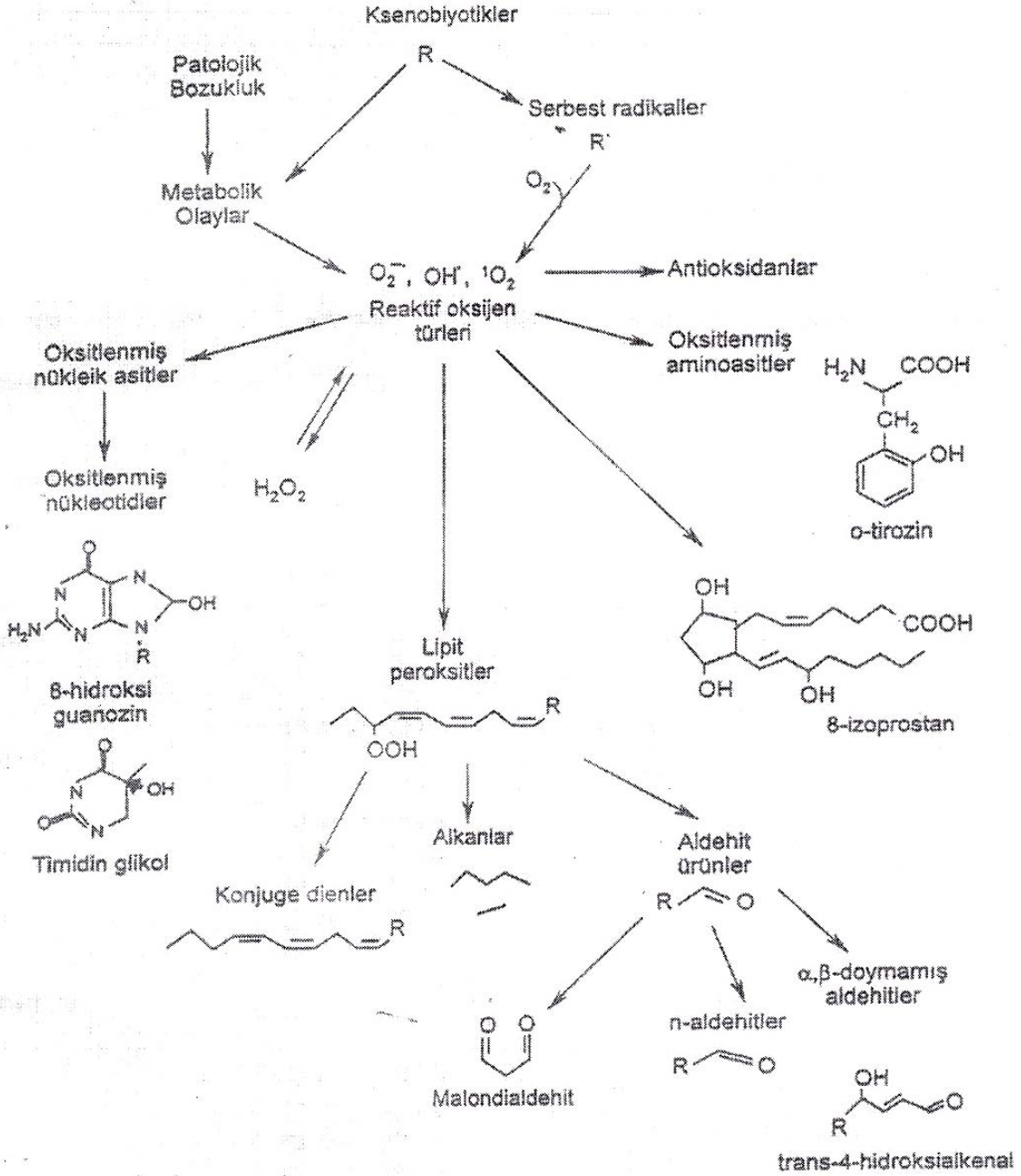


Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijen hücre içinde dört elektron gerektiren bir dizi reaksiyon sonunda indirgenir, bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Bu süreçte oksijenin az bir kısmı (% 1-3) tam olarak suya dönüşmez ve bu reaksiyonlarda ara ürün olarak serbest radikaller olan süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) oluşur :



Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- 1-DNA'nın tahrip olması
- 2-Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı
- 3-Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi
- 4-Protein ve lipidlerle kovalen bağlar oluşması
- 5-Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler
- 6-Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- 7-Proteinlerin tahrip olması ve proteinlerin dönüşüm hızlarının artması
- 8-Lipid peroksidasyonu, zar yapısının bozulması
- 9-Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması
- 10-Steroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- 11-Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozulması kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması [51,52]. ( Şekil 2.3).



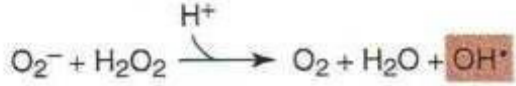
Şekil 2.3. Serbest radikal hasarının hedefleri ve ürünleri

Hidrojen peroksit; biyolojik membranları kolayca geçebilen, nonradikal bir oksidandır. Yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak toksik etkiler gösterebilir.  $H_2O_2$  ve/veya  $O_2^{\bullet-}$  radikalı transizyon metal iyonları varlığında reaktif ve hasar verici bir oksidan olan  $OH^{\bullet}$  radikalinin yapımına yol açar. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinmektedir [53-55].

### Fenton Reaksiyonu



### Haber-Weiss Reaksiyonu



Şekil 2.4. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidroksil radikali oluşumu

Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Güçlü reaktif özellikte olduğundan, oluştuğu yerde reaksiyona girer. Yarı ömrü kısa olmasına karşın yaptığı hasar büyüktür [54,56 ].

Başka moleküller ile çok kolay elektron alış verişine girip onların yapılarını bozan bu moleküller "Reaktif Oksijen Metabolitleri" olarak adlandırılır [57,58]. (Tablo 2.1)

NO, süperoksit radikali veya moleküler oksijen ile reaksiyona girerek “reaktif nitrojen metabolitleri (RNM)” adı verilen çeşitli ara ürünlerin oluşumuna neden olur [59] (Tablo 2.2).

Tablo 2.1. Reaktif oksijen metabolitleri (ROM) [54,58]

<i>Radikaller</i>		<i>Non-Radikaller</i>	
Süperoksit radikali	(O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hidroksil radikali	(OH <sup>•</sup> )	Lipit hidroperoksit	(LOOH)
Hidroperoksil radikali	(HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Hipokloroz asit	(HOCl)
Alkoksil radikali	(LO <sup>•</sup> )	Singlet oksijen	( <sup>1</sup> ΔgO <sub>2</sub> )
Peroksil radikali	(LOO <sup>•</sup> )	Nitrozil	NO <sup>+</sup>
Tiil radikali	(LS <sup>•</sup> )	Nitroksil	NO <sup>•</sup>
Nitrik oksit	(NO)	Nitröz asit	HNO <sub>2</sub>
		Dinitrojen trioksit	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
		Dinitrojen tetraoksit	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
		Peroksinitrit	ONOO <sup>-a</sup>
		Alkil peroksinitrit	ROONO

<sup>a</sup>Peroksinitrit hem reaktif oksijen hem de reaktif nitrojen metabolitleri kategorilerine girmektedir.

Tablo 2.2. Reaktif nitrojen metabolitleri (RNM)

Nitroksil anyonu	$\text{NO}^-$	Dinitrojen trioksit	$\text{N}_2\text{O}_3$
Dinitrojen dioksit	$\text{N}_2\text{O}_2$	Nitrojen dioksit	$\text{NO}_2^\cdot$
Nitrozil katyonu	$\text{NO}^+$	Dinitrojen tetraoksit	$\text{N}_2\text{O}_4$
Nitrit	$\text{NO}_2^-$	Dinitro pentaoksit	$\text{N}_2\text{O}_5$
Peroksinitrit	$\text{ONOO}^-$	Nitril katyonu	$\text{NO}_2^+$
Nitrat	$\text{NO}_3^-$	Peroksinitrat	$\text{O}_2\text{NOO}^-$

Tablo 2.3. ROM/RNM oluşturan kaynaklar

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
1. Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirleri	1. İyonize radyasyon (Örn: X ışınları)
2. Nötrofil fagositoz sistemi (NADPH oksidaz)	2. Hepatotoksinler (Örn: karbon tetraklorür)
3. Ksantin oksidaz enzim sistemi	3. Ksenobiyotikler
4. Araşidonik asit metabolizması	4. Redoks siklüsü yapanlar
5. Enzimatik olmayan reaksiyonlar	5. Kemoterapötikler (Örn: Adriyamisin)
6. Lenfosit, Endotel ve fibroblastlardan düzenleyici salınma	6. Hava kirliliği
7. Diğer oksidazlar	7. Sigara

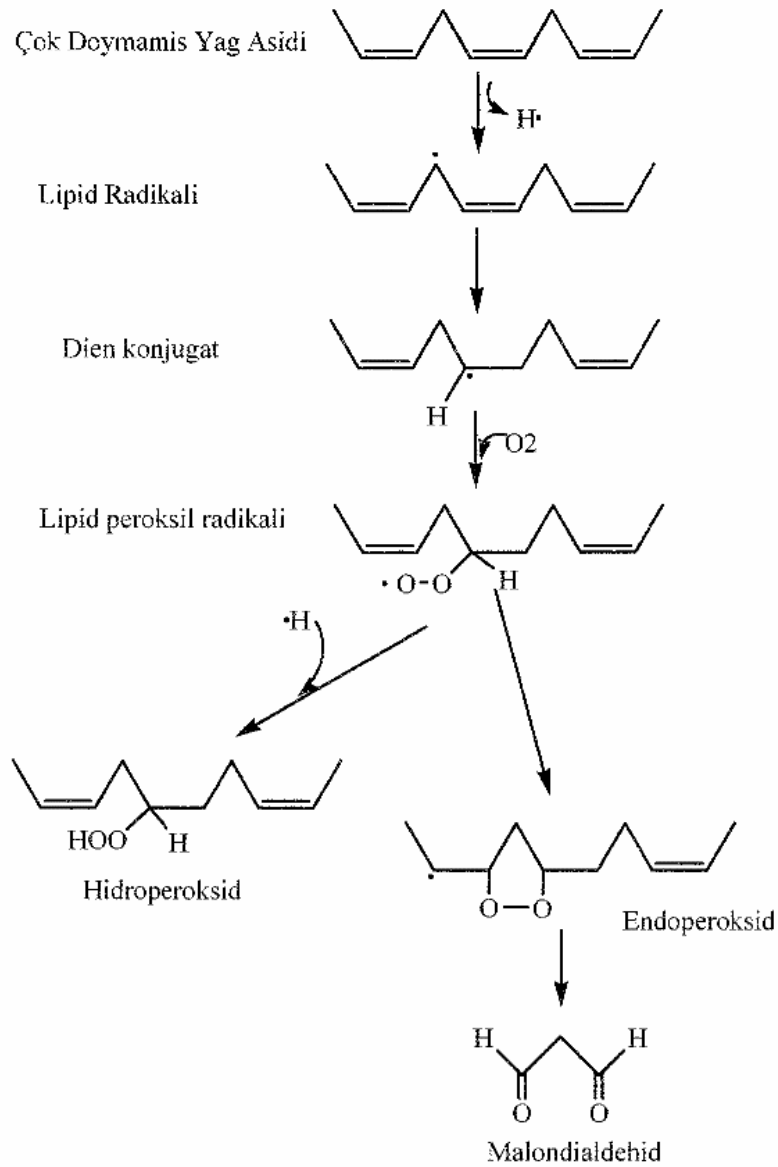
Biyolojik ortamların, basamakları en iyi bilinen ve en çok çalışılan radikal reaksiyon zinciri lipid peroksidasyonudur [60]. Radikaller organik ortamlardaki biyomoleküllerin tümünü etkilese de hedefleri başta membran lipidleri olmak üzere diğer lipidler, proteinler ve DNA'dır [61].

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipidlerindeki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır [62].

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile membran yapısında bulunan konjuge olmayan çok doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından, bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır. Bu olay, yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur. Oluşan lipid radikali ( $\text{L}^\cdot$ ) dayanıksızdır ve bir dizi spontan değişikliğe uğradığında oluşan konjuge dienler daha stabildir. Lipid radikalının

moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksil radikali (LOO•) meydana gelmektedir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan H<sub>2</sub> atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Lipid hidroperoksitlerden, Fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve alkanlar oluşur. Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkarak, lipid peroksit, etan ve pentan gibi uçucu gazlar oluşur. Aldehitler en toksik ürünlerdir [62,63].

#### Nonenzimatik lipid peroksidasyonu:



Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu (Murray ve ark., 1996).

Lipid peroksidasyonu, lipid-hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sonlanır.

Potansiyel nörotoksik medyatörlerin bir başka grubu da reaktif oksijen radikalleri (ROR) ve NO'dur. ROR düşük konsantrasyonda bile hücre defans mekanizmalarını zarara uğratar. Enflamasyon sırasında makrofajların oksidatif patlamalarıyla yüksek konsantrasyonda ROR salınır. Bu da hücrel savunma mekanizmalarının devre dışı kalmasına ve protein, lipid ve nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olur. Bu oksidatif stres belirteçleri MS hastalarının serum ve BOS'larında yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca MS hastalarının lökositlerinde ROR üretiminin sağlıklı bireylerden yüksek oluşu oksidatif stresin MS patogenezindeki rolünü desteklemektedir. MS hastalarında ROR'nin nörodejenerasyona neden olan DNA hasarını indüklediği tespit edilmiştir.

Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonlarını inhibe eden güçlü bir savunma sistemine sahiptir. Bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkabilmektedir [64,65].

## **2.7. Hastalığı Tetikleyen Nedenler**

MS semptomlarını tetikleyen en önemli faktörler, enfeksiyon, travma ve gebeliktir. Üst solunum yolu veya gastrointestinal viral enfeksiyonların da %5-50 oranında alevlenmeye yol açtığı bildirilmiştir. Klinik gözlemler relapsların solunum yolu enfeksiyonlarının daha sık olduğu mevsimlerde geliştiğini göstermektedir [66].

Kadınların %43'ünde menstruasyondan önceki günlerde semptomlar alevlenmektedir.

Aşıların MS atağına yol açıp açmadığı da tartışılan önemli konulardan biridir. Bu konu ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Aşılar içerisinde özellikle hepatit B ve tetanoz aşıları tavsiye edilmez.

MS'de de stres önemli bir risk faktörüdür. Remisyonadaki MS hastaları strese maruz kaldıklarında akut atak geçirebilmektedirler.

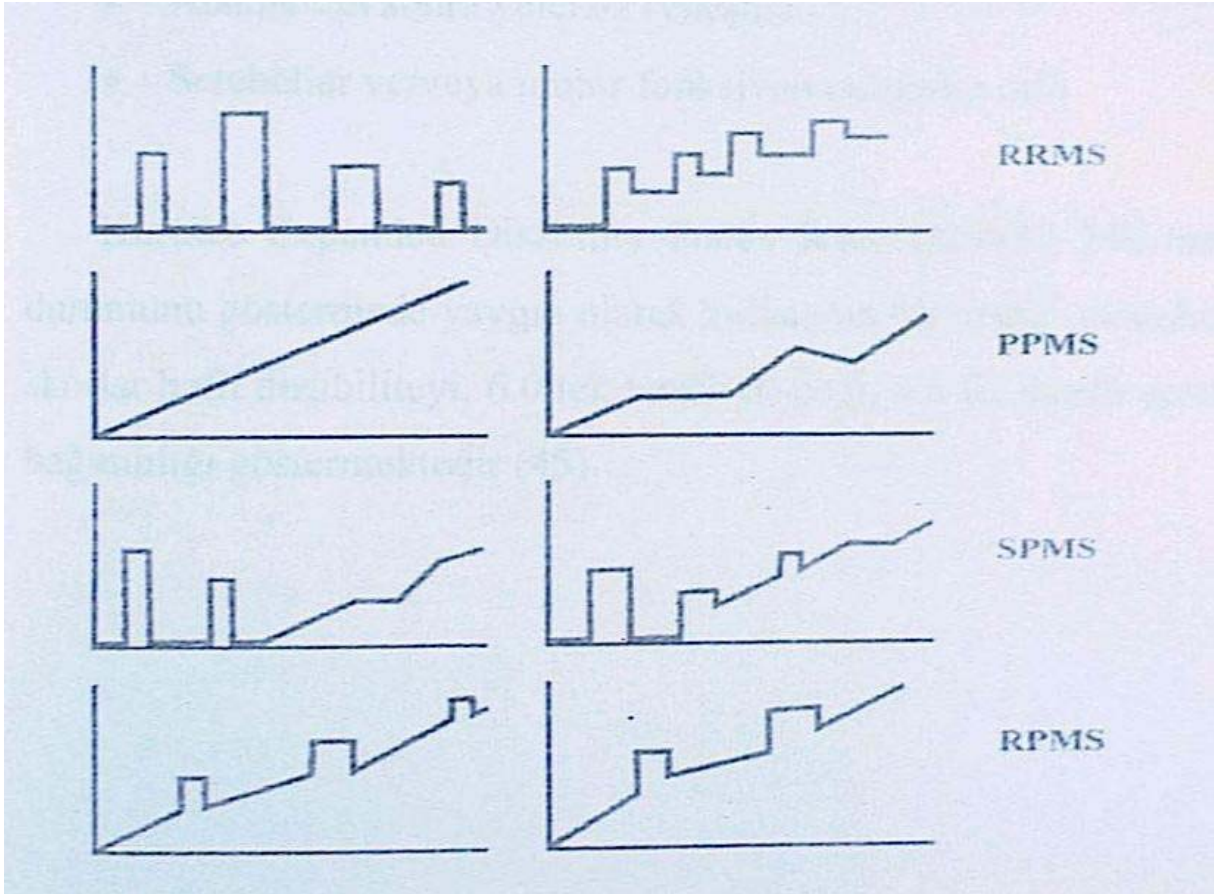
Yorgunluk ve uykusuzluk, MS semptomları arasında oldukça sık olarak görülür. Yorgunluğun daha çok santral orijinli olduğu bilinmektedir.

Vitamin B12'nin rolü spekülatif olup MS hastalarında bu vitamin eksikliği sık olmakla birlikte vitamin replasman tedavisinin hastalığın seyri üzerine herhangi bir etkisi olduğu gösterilmemiştir.

## 2.8. Hastalığın Klinik Tipleri ve Seyri

Hastalık 4 grupta incelenebilir: [67]

1. Relapsing-remmitting form (RRMS)
2. Primer progresif form (PPMS)
3. Sekonder progresif form (SPMS)
4. Relapsing-progresif-form (RPMS)



Şekil 2.6. MS'in klinik tipleri

### 1. Relaps ve remisyonlar ile seyreden multipl skleroz (RRMS)

(Ataklar ve düzelmelerle seyreden MS )

Akut ataklar ve bunları izleyen tam ya da tama yakın düzelme dönemleri ve ataklar arasında hastalığın stabil kalması ile karakterize en sık rastlanan formdur. İleriki ataklar tahmin edilemeyen aralar ile ortaya çıkar. Her bir ataktan sonra hastaya ait özürülük giderek artar. İlerleyen dönemde bu tipin sekonder progresif forma dönebilme eğilimi vardır.

## 2. Primer progresif multipl skleroz (PPMS)

Genellikle iyileşmelerin kaydedilmediği, başlangıçtan itibaren hastalığın ilerlemesi ile karakterize olan formdur. Progresyon hızı değişkendir, en ağır formunda MS birkaç yıl içinde ölüm ile sonuçlanabilir. Tam tersine daha kronik yavaş ilerleyici formlarında iyi huylu gidiş benzeri bir seyir olmaktadır

## 3. Sekonder progresif multipl skleroz (SPMS)

Erken dönemli relaps ve remisyonlar ile seyreden klinik form ortalama 5-6 yıl sonra sıklıkla bu forma dönüşebilmektedir. Ataklardan sonra tam düzelme gözlenmez ve her bir atakta eklenen sekeller ile hastanın özürüllüğü giderek artar.

## 4. Relapslarla seyreden progresif multipl skleroz (RPMS)

Hastalığın başlangıcından itibaren giderek ilerleyen ve arada akut relapsların da tabloya eklendiği formdur.

En sık rastlanan relaps ve remisyonlarla seyreden formdur.(%85) Relaps sıklığı hastadan hastaya değişiklik gösterir. Bu hastaların önemli bir yüzdesinde sonradan progresif forma dönüşüm söz konusudur (sekonder progresif form). Hastaların %50'sinde 10 yıl, %90'ında 25 yıl içerisinde sekonder progresif MS gelişir. Hastaların %10 kadarında ise seyir başlangıçtan itibaren progressiftir. Geri kalan %5'inde ise progresif relapsing seyir söz konusudur.

## 2.9. Klinik belirti ve bulgular

Multipl skleroz hastalığında en sık karşılaşılan ilk belirti duyuşsal belirtilerdir. Herhangi bir dağılım da olabilir. Daha az sıklıkla görme kaybı, motor bulgular, duruş anormallikleri, denge problemleri, mesane problemleri ilk bulgu olarak karşımıza çıkabilir [4,68].

### *Duyusal belirtiler;*

Karıncalanma, batma, yanma, iğnelenme, hissizlik şeklinde tarif edilen bulgular sıklıkla bir ekstremiteden başlayıp önce ipsilateral, sonra kontrateral ekstremiteye yayılır. Kalıcı duyu kusuru ise çoğunlukla alt ekstremitelerde derin duyu kusuru şeklindedir.

### *Motor belirti ve bulgular;*

Alt ekstremitelerde daha sık görülen kuvvet kaybı, paraparezi ya da parapleji şeklindedir. Nörolojik muayenede birinci motor nöron bozukluğuna işaret eden spastisite, artmış derin tendon refleksi ve ekstensör plantar yanıt saptanabilir.



### *Görme ile ilgili belirtiler;*

Vakaların %14-23'ünde başlangıç bulgusu olarak görülen optik nörit, ani görme kaybı ve göz hareketlerinde ağrı şikayetleri ile başlar. Genellikle tek taraflıdır. Görme korunduğunda ise santral veya parasantral skotomlar, renkli görme bozukluğu olabilir. Muayenede optik disk ödemi saptanabilir. Diplopi üçüncü, altıncı ve nadiren dördüncü kranial sinir tutulumu nedeniyle oluşur. İnternükleer oftalmopleji ise MS için oldukça patognomonik bir bulgudur .

### *Yürütücü işlevlerde bozukluk;*

Sıklıkla bellek bozulması, dikkatsizlik, kavramları özetlemede ve soyutlamada güçlük görülür . Hastalığın süresi ve fiziksel özürülük ile ilişkili değilken manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lezyon yükü bu bozukluk hakkında fikir verebilir.

### *Serebellar bulgular;*

Serebellar yollar sık etkilenir. Belirtiler gövde ataksisi, ekstremitte ataksisi, ardı sıra hareketlerde bozulma, tremor, dizartri şeklindedir.

### *Duygulanım bozuklukları;*

Duygulanım bozuklukları MS'de normal populyasyondan daha sık görülür. Anksiyete ve depresyon öncü tablolarıdır, kortikobulber liflerin kesilmesi nedeniyle anlamsız ağlama daha nadir gülme atakları görülebilir .

### *Otonomik bulgular;*

Hastalarda büyük oranda mesane, bağırsak fonksiyonlarının etkilendiği bildirilmektedir. Mesane fonksiyon bozukluğu sık idrara gitme, yetiştirememe ile kendini gösterir. Genellikle kalıcıdır. Bağırsak fonksiyon bozukluğu ise sıklıkla kabızlık olarak karşımıza çıkar. Hastaların 2/3'ünde cinsel işlev bozukluğu tarif edilmektedir. Cinsel işlev bozukluğu erkeklerde ereksiyon sağlamada ve sürdürmede güçlük, kadınlarda vajinal his azalması şeklinde ortaya çıkar .

Bu bulgular dışında hastalığın seyrinde yorgunluk, epileptik nöbetler, hemiataksi, Lhermitte bulgusu, trigeminal nevralsi, tonik spazmlar ve hemifasial spazm gibi belirtiler görülebilir.

## **2.10. Tanı Kriterleri**

MS tanısı başvuru belirtilerinin çok farklı olabilmesi ve hastalığın seyri nedeni ile zor olabilmektedir. MS esas itibariyle klinik bir tanıdır. Tanı, semptom ve bulgularla hastalığın klinik seyri dikkate alınarak konmaktadır.

MRG, nörofizyolojik testler ve BOS incelemesi tanıya ulaşmada önemli katkılar sağlar. Ancak kesin tanı koydurtacak bir laboratuvar bulgusu yoktur [67]. Bu tetkikler içerisinde sensitivite ve spesifitesi en yüksek olan MR'dır. Bunu BOS incelemesi izler. Eğer klinik tablo atipik ise ve MRG kriterleri yeterli değilse BOS bulguları önemlidir. Bunu görsel uyarılmış potansiyel (VEP) kayıtları izler [69]. Kesin tanıda, lezyonların dağılımını (zaman- alan) gösteren objektif kanıtlar esastır.

### **Tanısal algoritma**

Tanı, klinik özellikler ve tetkik bulgularına dayandırılmakta olup Tablo 2.4'te özet halinde gösterilmektedir. Tanı üç önemli özelliğe dayandırılmaktadır.

1. Zaman içerisindeki dağılım (Rekürren ataklar veya progressif klinik seyir)
2. Alan içerisindeki dağılım (Multifokal olma)
3. Klinik ve paraklinik bulgular için MS'den daha iyi bir açıklamanın olmaması

### **Tablo 2.4. Mc Donald tanı kriterleri [67]**

1. İki veya daha fazla atak, iki veya daha fazla lezyonun objektif klinik bulgusu
  - Ek araştırma şart değil
2. İki veya daha fazla atak, bir lezyonun objektif klinik bulgusu
  - Barkof kriterlerini tamamlayan MRG bulgusu veya
  - MS ile uyumlu 2 veya daha fazla MRG lezyonu + BOS bulgusu (oligoklonal band veya IgG artışı) veya
  - Farklı klinik bulgunun beklenmesi
3. Bir atak, iki veya daha fazla lezyonun objektif klinik bulgusu
  - MRG nin zamanla yayılma kriterlerini karşılaması veya
  - İkinci klinik atak
4. Bir atak, bir lezyonun objektif klinik bulgusu
  - Barkof kriterlerini tamamlayan MRG bulgusu veya
  - MS ile uyumlu 2 veya daha fazla MRG lezyonu + BOS bulgusu (oligoklonal band veya IgG artışı) veya
  - MRG nin zamanla yayılma kriterlerini karşılaması veya
  - İkinci klinik atak
5. MS düşündürülen nörolojik bulgular
  - BOS bulgusu (oligoklonal band veya IgG artışı) veya

- MRG bulguları: Beyinde 9 veya daha fazla T2 lezyonu veya 2 veya daha fazla spinal kord lezyonu veya 4-8 arası beyin lezyonuna ek olarak 1 spinal kord lezyonu veya
- Anormal VEP: MRG de 4-8 beyin lezyonu veya 4 ve altında beyin lezyonuna ek olarak 1 spinal kord lezyonu ile birlikte
- MRG'nin zamanla yayılma kriterlerini karşılması veya
- Bir yıldır devam eden ilerleyici bulgular

Tablo 2.4'teki bilgileri özetleyecek olursak:

1) Eğer hastada en az iki atak öyküsü varsa ve iki ayrı lezyon bulguları mevcut ise başka bir tetkike gerek kalmadan kesin MS tanısı konabilir.

2) Eğer iki veya daha fazla atak öyküsü ile tek lezyon ile açıklanabilecek muayene bulgusu/bulguları var ise MR ile alan içerisinde dağılım kriterleri gereklidir.

3) Tek bir atak öyküsü ve iki ayrı lezyon ile açıklanabilen muayene bulgusu/bulguları var ise MR ile zaman içerisinde dağılım kriterleri veya başka bir atak beklemek gereklidir.

4) Tek bir atak öyküsü ve tek bir lezyon bulgusu var ise (yani klinik olarak izole sendrom) MR ile hem alan ve hem de zaman içerisindeki kriterler gereklidir. Ya da başka bir atak ortaya çıkıncaya kadar beklemek gerekir. MR'ın yetersiz olduğu durumda önce BOS analizi yapılır. Anormal bulgu önemlidir. Ancak normal bulgu ile karşılaşıldığında diğer seçenek VEP kayıdır.

5) Klinik seyir progressif ise MR'de hem alan içerisindeki dağılım kriterlerinin (anormal BOS veya VEP bulgusu ile birlikte) ve hem de zaman içerisinde dağılım kriterlerinin (veya 1 yıl devam eden progresyon) bulunması gerekmektedir. Bulgular kesin tanı için yeterli olmadığında olası MS tanısı konur ve hasta daha sonra tekrar incelenir. Eğer bulgular kriterleri karşılamıyorsa hastalık 'MS değil' dir. Bu durumda diğer hastalıklar için gerekli incelemeler yapılır.

MS'de yanlış teşhis oranı %5-10'dur. Bazı hastalıklar MS'i taklit edebilir. Bu hastalıklar;

1. Enflamatuvar (SLE, Sjögren sendromu, vaskülit, sarkoidoz, Behçet hastalığı)
2. Enfeksiyöz (Lyme, sifiliz, progressif multifokal lökoensefalopati, HTLV1 enfeksiyonu)
3. Genetik (CADASIL, adrenolökodistrofi, mitokondrial hastalıklar)
4. Metabolik (vitamin B12 eksikliği)
5. Neoplastik (SSS lenfoması) şeklinde sıralanabilir.

## 2.11. Tedavi

### 2.11.1 Akut atak tedavisi

Akut atak, 24 saatten uzun süren, beyaz cevheri etkileyen bir fokal fonksiyon bozukluğudur. Tipik olarak birkaç gün boyunca ilerleme gösterir, kısa sürede maksimum seviyeye ulaşır, daha sonra ortalama 30 günde yavaşça azalır. Akut atak tedavisinde glukokortikoidler ve daha ender olarak adrenokortikotrofik hormon (ACTH) kullanılır. Her iki ilacın da anti-enflamatuvar ve immüsupresif etkileri olup MS de klinik relaps süresini kısaltırlar. Hastanın klinik durumuna göre karar verilir,. her atak tedavi gerektirmeyebilir [70].

MS'li hastalarda atak tedavisinde ilk defa 1961 yılında intramüsküler ACTH uygulanmış ve plasebo alan kontrol olgulara göre daha hızlı iyileşme gözlenmiştir. Bu çalışmadan 10 yıl sonra çok merkezli yapılan bir araştırma ile 2 haftalık ACTH tedavisinin akut atakta faydalı olduğu kabul edilmiştir.

1980 yılında Dowling tarafından yapılan yüksek doz intravenöz metilprednizolon (MP) çalışmasında, 500 mg/gün intravenöz (İV) MP 3 gün uygulanmış, daha sonra oral prednizon 100 mg/gün aşırı 3 ay süreyle verilmiştir. Tedavinin erken başlamasının, nörolojik bulgular üzerine daha etkili olacağı vurgulanmıştır. İntratekal steroid uygulaması yan tesirleri nedeniyle önerilmemektedir. Daha sonraki çalışmalarda MP'un 1 g/gün dozunda 5 gün süreyle uygulanmasının daha etkili olacağı bildirilmiştir. 2 g/gün MP uygulanan bir çalışmada MRG lezyonlarında daha hızlı küçülme gözlenmiştir.

Optik nörit atağı ile gelen ve 4 yıl izlenen hastalarda, IV MP olan grupta %7.5, oral prednizolon alan grupta %14 ve plasebo gurubunda %16.7 oranında MS geliştiği gösterilmiş olup, MP tedavisinin immun sistem üzerine uzun süreli etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kortikosteroidler, T hücre fonksiyonlarını modüle ederek, makrofajlar üzerinde sınıf II antijen ekspresyonunu azaltarak, proenflamatuvar sitokinlerin yapımını ve aktivitesini inhibe ederek, IL-1, IL-2, IL-6 yapımını azaltarak, lökotrien ve prostoglandinleri baskılayarak adezyon moleküllerinin artışıını inhibe ederek immun sistem üzerine etki etmektedirler.

MS'li hastaların %90'ında SSS'de, IgG sentezlenmekte ve BOS IgG düzeyleri yükselmektedir. MP, deksametazon ve prednizon BOS IgG sentezini önemli derecede azaltır. Yüksek doz intravenöz tedavi, düşük doz oral tedaviye oranla daha etkilidir. MP, IgG sentezini hızla düşürür.

MP tedavisi, BOS MBP düzeyini ve antiMBP antikörlerini da düşürmektedir. Hastaların %30'unda BOS'da immun komplekslere rastlanmaktadır, yüksek doz steroid

tedavisi ile bu kompleksler azalmaktadır. MP tedavisi ile MR lezyon sayısının da azaldığı gözlenmektedir.

Manyetik rezonans spektroskopik görüntüleme (MRSG) ile yapılan bir çalışmada, yüksek doz MP tedavisi alan hastalarda kolin, kreatin, laktat ve N asetilaspartat seviyelerinin tedaviden sonra önemli derecede azaldığının saptanması, steroidlerin hücre membran aktivasyonunda da önemli bir rol oynadıklarını düşündürmektedir.

Atak esnasında yükselen ve nöroenflamasyonda primer rol oynayan sitokin ve kemokinlerin düzeyleri, MP tedavisinden sonra azalmaktadır. Steroidlerin sitokin ve kemokin reseptör artışını inhibe ettikleri düşünülmektedir.

MP, atak sırasında artış gösteren endotelin I (ETI) ve NO üzerine de etkilidir. Hastaların %96'sında MRG'da gözlenen lezyonları tedavi esnasında azalır. Bazı hastalarda tedavi bittikten kısa süre sonra lezyonlar artar. MP genellikle 0,5-1-2 g/gün olarak ve 3-5-7-10 gün süreyle uygulanmaktadır.

Kısa süreli yüksek doz MP tedavisi esnasında ciddi yan etkiler gözlenmese de oral prednizolon ile idame tedavi uygulanan hastalarda bazı yan etkiler görülmektedir. Femur başı aseptik nekrozu nadir olarak görülür. Osteoporoz diğer bir komplikasyon olup, MS hastalarında inaktiviteden dolayı görülmekte, uzun süreli kortikosteroid uygulaması bu olasılığı arttırmaktadır. Bu nedenle kısa süreli kortikosteroid uygulanması önerilmektedir. Nadiren, yüksek doz MP hızlı verilirse ani aritmilere neden olmaktadır. Bu nedenle 500 ml serum fizyolojik ile 1-2 saatte verilmesi önerilmektedir.

Steroid tedavisi esnasında enfeksiyonlara yatkınlık artmaktadır. Tüberküloz reaktivasyonu, viral ve fungal enfeksiyonlar görülebilmektedir. Yüzde ödem, elektrolit dengesizliği, hiperglisemi, hipertansiyon, peptik ülser, depresyon, manik reaksiyon, konvülsiyonlar, kognitif bozukluklar diğer gözlenebilecek yan etkilerdir.

### **2.11.2. İmmunmodülatuvar tedaviler**

Günümüzde etki mekanizmaları farklı üç önemli ilaç (interferon beta, glatiramer asetat ve intravenöz immün globulin) MS tedavisinde kullanılmaktadır [71-73].

1993 yılında Food and Drug Administration (FDA); IFN-1 (Betaferon®)'yı relapsing-remitting MS (RRMS) tedavisinde kullanılmak üzere onayladı. Ardından IFN -1 (Avonex®) ve glatiramer asetat (Copolimer-1=Copaxone®) tüm dünyada kullanım için onaylandı. 1997 yılında interferon -1 preparatı olan Rebif'in hastalık üzerine olumlu etkileri gösterildi.

### 2.11.3. MS'te immünosupresyon tedavisi

10-15 yıl öncesine kadar MS tedavisinde immünosupresif ajanlar en çok kullanılmakta iken immünomodülatuvar tedavilerin klinik uygulamaya girmesi ile MS tedavisinde büyük değişiklikler olmuştur. Ancak bu tedavi modellerinin hastalık üzerindeki etkinliklerinin sınırlı olduğunun görülmesi immünosupresif tedaviye ilgiyi yeniden artmıştır. Azatioprin, metotreksat, siklofosfamid bu alanda en çok kullanılan ilaçlar olmasına rağmen bu alanda onay almış tek ilaç mitaksantrondur. Genel olarak bakıldığında MS tedavisinde immünosupresiflerin %10 oranında tercih edildiği görülmektedir [73].

### 2.12. Seyir ve Prognoz

MS'li hastalarda klinik seyri önceden bilmek mümkün değildir. Kural olarak duyu belirtileri olan hastalarda seyir iyidir. Serebellar ve kortiko-spinal bulgular ise kötü prognoza işaret eder.

Relaps sıklığı büyük farklılık göstermektedir. Bu farklılık hem yaş, hem de hastalık süresi ile ilgili olup genç hastalarda ve hastalığın erken döneminde daha sıktır.

Özürlülükte ilerleme hastadan hastaya büyük farklılık gösterir. Hastanın yürüme bozukluğu aşamasına gelmesi için ortalama 10 yıl, tek yönlü destek aşamasına gelmesi için ortalama 15-20 yıl, ve tam malüliyet için ortalama 30 yıl geçmesi gerekmektedir [74].

Ülkelere göre mortalite oranları arasında büyük farklılık gözlenmektedir. Danimarka MS kayıtlarından elde edilen veriler hastalığın ortalama yaşam süresini 14 yıl kadar azalttığını gösterirken; Kanada' da bu süre 6-7 yıl' dır. MS hastalarının yaklaşık %50 kadarı hastalığın komplikasyonlarına bağlı nedenlerden ölmektedir.

**Tablo 2.5. Prognoz Üzerine Etkili Faktörler**

Faktörler	İyi prognoz kriterleri	Kötü prognoz kriterleri
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Başlama yaşı	Genç (< 25 yaş)	Geç (> 40 yaş)
Başlangıç semptomu	Duysal	Motor
Klinik gidiş	Ataklarla	Kronik progresif
EDSS 3 olmasına dek geçen zaman	Uzun	Kısa
İlk 2 yılda relaps oranı	Düşük	Yüksek

### 2.12.1.Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği

#### *Expanded Disability Status Scale (EDSS)*

MS’de gözlenen klinik progresyon oranı hastalar arasında değişkenlik gösterir. Klinik özürllülüğü değerlendirmek için kullanılan araçlar arasında en sık Kurtzke Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği (EDSS) kullanılmaktadır [14].

İlk kez 1955 yılında Kurtzke tarafından *Disability Status Scale* (DSS) olarak sunulmuş, daha sonra 1983 yılında tekrar düzenlenerek EDSS olarak kullanıma geçmiştir. Bu skalada MS’te görülen nörolojik bozukluklarla özürllülük birlikte değerlendirilebilmektedir.

0 normal muayenede elde edilen nörolojik değerlendirme sonucu iken, 10 MS’e bağlı ölüm olarak değerlendirilmektedir. 0’dan sonraki ilk puan 1’dir ve daha sonra 0.5 puan aralıkları ile klinik kötüleşme ifade edilir.

EDSS skorlaması, sekiz adet fonksiyonel sistemin nörolojik muayenesine göre yapılmaktadır.

Piramidal, serebellar, beyinsapı, duysal, görsel, bağırsak ve mesane ve mental fonksiyonların 0.0-4.0 arası derecelendirme esasına göre EDSS puanı hesaplanır. Bu skala ile özellikle 4 puanın üzerinde değerlendirilen durumlarda hastanın hastane ortamında tedavisinin gerekliliği hakkında değerli bilgiler verir.

Fonksiyonel sistemler; piramidal, serebellar, beyin sapı, duysal, mesane ve bağırsak, görsel, serebral ve diğerleri olarak sıralanmıştır.

Hastanın özürllülük derecesi özetlenirse;

2.0: Minimal özürllülük.

4.0: Orta derecede özürllülük, ancak hasta yardımsız yürüyebilmektedir.

6.0: Hastanın yürümeye yardımcı bir araç gereksinimi vardır.

8.0: Hasta tekerlekli sandalyeye bağımlıdır.

Derecelendirme, hastanın aşırı çaba göstermeden ortaya koyduğu en iyi performansa göre yapılır. Buna göre; 0-4 puan arası hasta bağımsızdır, 6.0 puan tek taraflı desteği, 6.5 puan çift taraflı desteği ve 7 puan ve üzeri bağımlılığı ifade eder.

## **2.13.MS'de enflamasyon göstergeleri**

### **2.13.1.Hücre adezyon molekülleri:**

Hücre adezyon molekülleri, hemen hemen tüm hücrelerin yüzeyinde yer alan glikoprotein moleküllerinden oluşur. Hücrelerin, özellikle lökositlerin, birbirlerine, endotel hücrelerine veya ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridirler [75].

Lökositlerin dokulara göçü doku hasarına ve kronik enflamasyona neden olmaktadır. Bu işlemlere immün ve enflamatuvar hücrelerde ve kan damarlarındaki endotel hücrelerde bulunan hücre adezyon molekülleri aracılık etmektedir.

Lökositler, dolaşımı terk edebilmek için, öncelikle damar duvar yüzeyine yapışmalı ve sonra endotel hücreler arasından dokulara geçebilmelidir. Lökositlerin damar duvarı boyunca kayma hareketi, damar duvarına yapışması ve transendotelial göç olmak üzere 3 adımda oluşur.

Kayma hareketi selektinler, yapışma ve göç ise integrinler ve immünglobulinler aracılığıyla gerçekleşir.

#### **Hücreler arası adezyon molekülü ( ICAM-1) :**

Endotelial hücrelerde, antijen sunan hücrelerden salınan bir Ig'dir. Lökositlerin yapışmasında, göçünde, immün ve enflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda önemli role sahiptir. ICAM-1'in inhibe edilmesi ile immün ve enflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve bu hücrelerin enflamasyon bölgesine geçişlerinin engellenebileceği düşünülmüştür.

#### **Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1):**

Primer olarak lenfositlerden, eozinofillerden ve bazofillerden salınan bir moleküldür. VCAM-1, ICAM-1, E-selektin gibi MS'de de önemli olan hücre adezyon moleküllerinin hücre migrasyonu ve enflamatuvar süreçte, özellikle de otoimmün demiyelinizasyon mekanizmasında önemli oldukları düşünülmektedir.

MS'in klinik relapsları sırasında serumda ve BOS'da ICAM-1'in yüksek saptandığı, yüksek doz kortikosteroid tedavisi sonrası oluşan remisyon tablosunda ise azaldığı bildirilmektedir. Relapslar sırasında eş zamanlı alınan serum ve BOS örneklerinde VCAM-1 düzeyleri de yüksek bulunmuştur [76].



### 2.13.2. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- )

TNF- $\alpha$ ; doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre düzenlemesi, farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip, polipeptid yapıda bir sitokindir.

TNF- $\alpha$ , aktive monositler, makrofajlar ve daha az çoğunlukta aktive T hücreler, B hücreler, mast hücreler, fibroblast, keratinosit, Kupffer hücreleri, düz kas, sinoviyal hücreler ve bazofil gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır. Aktive makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- $\alpha$  akut faz proteinlerinin artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybından sorumludurlar. Ayrıca lökosit adezyonu, prokoagülan aktivite ve trombosit aktive eden faktör (PAF) aktivasyonundan sorumludurlar. Kollagen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu artırır. Fibroblastların ve endotel hücrelerinin TNF- $\alpha$  aracılıklı proliferasyonu yara iyileşmesinde önemlidir. Ayrıca TNF- $\alpha$ , ICAM-1 sentezinde önemli bir uyarandır. TNF- $\alpha$  ve IL-8 kuvvetli kemoatraktif medyatör olup nötrofillerin kemotaksisi ve aktivasyonuna neden olur. Endotel hücrelerin bazı adezyon moleküllerinin üretimini artırarak enflamatuvar hücrelerin damar adezyonunu sağlar. Polimorfonükleer lökositlerin antikor bağımlı hücrel sitotoksitesini artırır. Serbest radikal oluşumuna neden olarak doğrudan antiparaziter etki gösterir [77-82].

TNF- $\alpha$ , immünoenflamatuvar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-9}$  M) lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicidirler. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ile kombinasyonu sitotoksiktir. Çalışmalar, TNF  $\alpha$ 'nın akut enflamasyonda ve antitümöral immünitede en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisi yönetir. TNF- $\alpha$  üretimi, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE, siklosporin A, deksametazon, ibuprofen, metilprednizolon ve pentoksifilin tarafından inhibe edilir.

TNF- $\alpha$ 'nın in vitro demiyelinizasyonu tetiklediği gösterilmiştir. TNF- $\alpha$ 'nın demiyelinizan etkisi mikroglia ve makrofajların bulunmasına bağlıdır ve oligodendrositlerin apoptozuna aracılık eder. Oligodendrositlerin zedelenme ve yıkılımı siliar nörotrofik faktörle engellenebilir. Hayvan modellerinde fokal demiyelinizasyona; T hücre aracılı enflamasyon, mikroglia aktivasyonu ve astroglial skar formasyonu eşlik etmektedir. Akut ve kronik aktif MS'de TNF- $\alpha$  protein ve mRNA'sı yoğun bir biçimde eksprese edilir. Bu sitokin yalnızca enflamatuvar yanıtı artırmaz aynı zamanda demiyelinizasyona yol açar.

## 2.14. MS'de oksidatif ve nitrozatif stres göstergeleri

### 2.14.1. Malondialdehit (MDA):

MDA; non-enzimatik oksidatif lipid peroksidlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden biridir. İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksidler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. Oksijen radikalleri hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açar, hidroksiperoksidlerin ve MDA'nın oluşumunu sağlar [83,84]. Kısa ömürlerinden dolayı reaktif oksijen moleküllerinin in vivo olarak doğru tespit edilmesi oldukça zordur. Bu yüzden hidroksiperoksidlerin ve/veya MDA'nın serum düzeyinin tespiti, klinik laboratuvar uygulamalarında, oksidatif stres göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır. MDA dokularda ve kanda iki formda bulunur: Serbest form ve proteinlerin, nükleik asitlerin veya lipoproteinlerin SH yada NH<sub>2</sub> gruplarına bağlı olan formu. Serbest MDA (F-MDA) kimyasal olarak aktif formdur, genellikle son zamanlarda oluşan hasarın belirteci olarak değerlendirilir. İdrarla atılan bağlı form ise inaktiftir ve önceki oluşan hasarların belirteci olarak değerlendirilir [63].

### 2.14.2. Nitrik oksit (NO):

Nitrik oksit; suda çözünürlüğü düşük olan lipofilik, kolaylıkla nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) okside olabilen renksiz, stabil bir gazdır [85]. Bir adet eşlenmemiş elektron içeren 30 Dalton ağırlığında oldukça reaktif bir moleküldür. Moleküler oksijen, süperoksit radikalleri ve Fe, Cu, Co gibi transizyon metalleri ile kolayca reaksiyona girer. Küçük boyutu ve nötral yükünden dolayı, hücre zarlarından rahatça geçebilir [86-89]

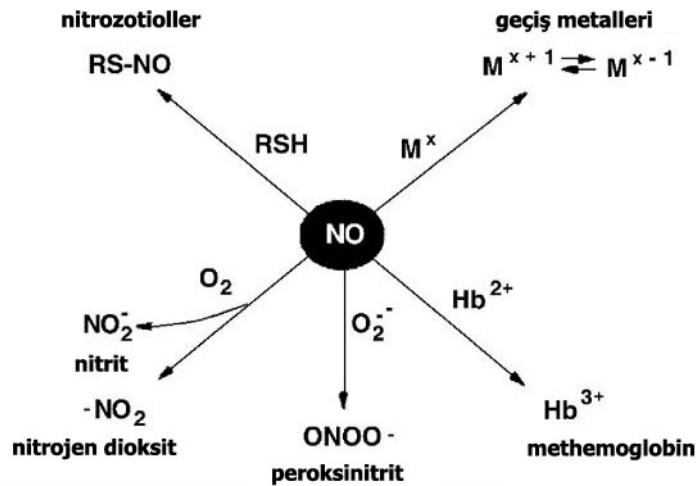
NO; damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arginininden sentezlenir. NO, lokal olarak endotelium ve sinir hücreleri başta olmak üzere makrofajlar, trombositler ve düz kas hücrelerinde üretilmektedir. NOS'un (EC 1.13.23) üç izoformu tanımlanmıştır. Bunlar indüklenbilir form (iNOS) ile endotelial ve nöronal olmak üzere iki tip konstitütif formlardır (cNOS) [90,91]. Endoteliumda bulunan eNOS, santral sinir sisteminden köken alan nNOS, makrofajlar tarafından indüklenen ise iNOS adını alır [92]. Hücre içinde artan Ca<sup>2+</sup> kalmodulinle bir kompleks oluşturarak cNOS enzimini uyarır. cNOS enzimi düşük miktarlarda (pikomol düzeyinde) ve kısa süreli NO sentezine yol

açar. cNOS tarafından üretilen NO nontoksik olup hücre içi sinyal iletiminde görevlidir. nNOS ise beyin ve periferik nöronlarda salınan  $Ca^{2+}$  bağımlı izoenzimidir [93].

iNOS kardiyomiyositler, hepatositler, makrofajlar, mikrogliya hücreleri, nötrofiller, damar endotel ve düz kas hücreleri gibi birçok farklı hücrede bulunur. Tetramerik yapıda olup, endotoksin, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 ve 2 ile indüklenebilir. Uyarılan iNOS, daha uzun süre aktive olur ve nanomolar konsantrasyonlarda NO sentezler. Aktivitesi diğer izoenzimlerden daha fazladır. Glukokortikoidler, IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- $\beta$  mRNA transkripsiyonunu engelleyerek iNOS'u inhibe ederler [94,95].

Yarılanma ömrü 30 saniyenin altındadır. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyararak damar gevşemesine yol açar. NO, tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarının da değişmesine yol açar.

NO, süperoksit radikali ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturur. Bu konjuge asit çok labildir ve hızla OH ve  $NO_2$  gibi reaktif radikaller üzerinden nitrata dönüşür [96]. Bu bağlamda NO serbest radikal temizleyicisi olarak kabul edilir. Fizyolojik pH'da peroksinitrit direkt olarak proteinlerde hasar oluşturur ve nitroniyum iyonu ( $NO_2^+$ ), azot dioksit gazı ve hidroksil radikali gibi toksik etkili bileşiklere parçalanır. Nitrotirozin ise peroksinitritle tirozin kalıntılarının nitrasyonu ile üretilir.



Şekil 2.6. Nitrik oksit (NO) ürünleri

NO; düşük konsantrasyonlarda kan akımının düzenlenmesi, nörotransmisyon, enflamasyon ve immün savunma mekanizması, koagülasyon ve hücre büyümesi gibi pek çok önemli olayda rol oynamaktadır [97]. İnflamasyon durumunda NOS enzimi aktive olur ve

NO düzeyi fizyolojik değerlerin çok üzerine çıkar. Yüksek konsantrasyonlarda üretilen NO proenflamatuvar etkili olup, komşu hücre ve dokulara zarar verir. NO; enflamasyonlu dokularda vasküler permeabilityi artırır, TNF , IL-1 gibi enflamatuvar sitokinleri indükler, peroksinitrit ve hidroksil gibi serbest radikallerin üretilmesine neden olur [98,99].

Beynin incelenen bütün bölgelerinde presinaptik uçlarda ve postsinaptik nöronlarda nNOS'ın var olduğu ve sinir iletimine katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur [100,101]. NO klasik nöromediyatörlerden farklı olarak nöronlarda veziküller içinde depo edilmez, üretilen NO hemen nöron dışına salıverilir ve lipofilik olması nedeniyle salıverildiği hücrenin çevresinde nispeten geniş bir alana yayılır; hücre ve sinir uçlarının içine kolaylıkla girerler. NO'nun insan vücudunda koruyucu ve düzenleme etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır [102].

NO ürünleri MS hastalarının kan ve serumlarında saptanabilir. Deneysel MS modellerinde erken dönemde saptanan bu ürünlerin oranı hastalık şiddeti, miyelin ve akson hasarıyla ilişkilidir. NO özellikle nöron apoptozisini indükler. Akson iletiminin invitro NO ile geçici olarak bloke olması NO'nun akson hasarına neden olabileceğini göstermektedir. Demiyelinize aksonlar NO'nun bu toksik etkisine iki kat daha çok maruz kalırlar. NO nöronda elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu ile mitokondriyal solunumun bozulması neticesinde enerji açığına yol açar. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz pompasında bozulma nedeniyle Na<sup>+</sup> kanallarında aktivasyon ve hücre içine devamlı Na<sup>+</sup> akışı gerçekleşir. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> değişim pompası aracılığıyla intrasellüler Ca<sup>2+</sup> miktarında artış fosfolipaz ve proteaz gibi enzimleri aktive ederek lipid ve protein yıkımına neden olur.

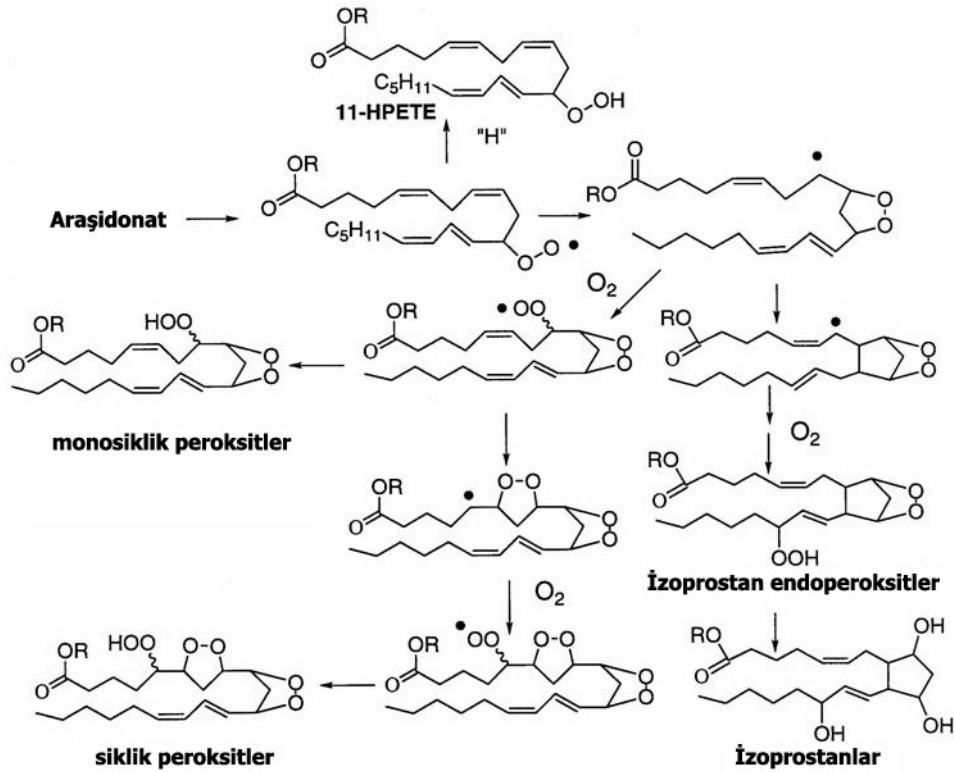
### 2.14.3. 8-izoprostan (PG F<sub>2</sub>):

İzoprostanlar (izoP) serbest radikallerin indüklediği, araşidonik asit gibi poliansatüre yağ asitlerinin nonenzimatik peroksidasyonu ile oluşan ürünlerdir. İnsanda izoprostanların in vivo oluşumu ilk kez Morrow ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [103]. İzoprostanların in vitro ve in vivo lipid peroksidasyonunun sensitif ve spesifik göstergesi olduğunu gösteren birçok kanıt bulunmuştur. İzoprostanlar, prostaglandinlerin kimyasal olarak stabil, yapısal izomerleridir. İzoprostanlar ve prostaglandinler arasındaki önemli yapısal fark; izoprostanlar özel olarak *cis* yan zincirine sahipken prostaglandinler prostan halkasına *trans* pozisyonunda yan zincirler içerirler. Bu maddeler siklooksijenaz (COX) ile oluşan prostaglandin F<sub>2α</sub>'nın izomerleri olması nedeniyle F<sub>2</sub> izoP'lar olarak adlandırılmaktadır. PGD<sub>2</sub> benzeri bileşik olarak

D<sub>2</sub> izoP'lar, PGE<sub>2</sub> benzeri bileşik olarak E<sub>2</sub> izoP'ların in vivo aynı yolla oluştuğu gösterilmiştir [104,105]. Araşidonik asit doku fosfolipidlerinden serbestleştğinde in situ F<sub>2</sub> izoP'lar oluşur ve hedef dokularda birikir. Hücrel aktivasyona yanıt olarak ve fosfolipaz bağımlı bir mekanizma ile kan dolaşımına geçer ve idrarla atılırlar [106].

İzoprostanlar lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak idrar, kan, safra [107], perikardiyal sıvı [108] ve beyin-omurilik sıvısı [109,110] gibi çeşitli vücut sıvılarında; beyin ve karaciğer dokusunda ölçülmüştür.

Oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan F<sub>2</sub> izoP'larla ilgili yapılan çalışmalarda kan, beyin omurilik sıvısı, perikard sıvısı gibi vücut sıvılarında kronik sigara içiminde, hiperkolesterolemi, koroner anjioplasti gibi kardiyovasküler hastalıklarda, kronik obstrüktif akciğer hastalığında, Tip I ve Tip II diabetes mellitusda, MS hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca izoP düzeyi yüksekliği sistemik lupus eritematozus, skleroderma ve çeşitli romatolojik hastalıklar gibi enflamatuvar durumlarda da gösterilmiştir [111-113].



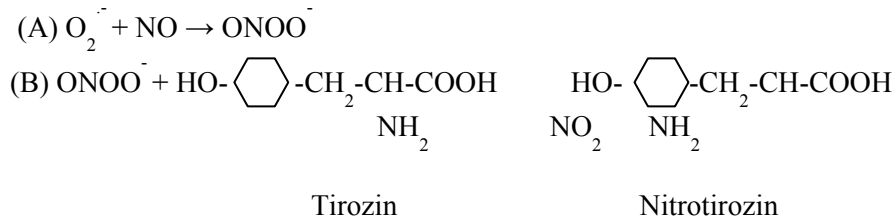
Şekil 2.7. İzoprostan oluşumu

#### 2.14.4.Konjuge dien:

İki çift bağ arasında bir tek bağ bulunuyorsa böyle dienlere konjuge dienler denir. Lipid-hidroperoksitleri 234 nm’de maksimum absorbands veren konjuge dien yapısındadırlar. Peroksidasyon sırasında oluşan konjuge dienlerin ölçümü in vivo lipid peroksitlerinin düzeyini yansıtmaktadır.

#### 2.14.5.Nitrotirozin:

Nitrotirozin oluşumu reaksiyon (A) ve (B)’de görülmektedir [114].



Peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot -}$ ), NO’nun,  $O_2^{\cdot -}$  ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir [115,116]. Peroksinitrit; süperoksit ve NO radikallerine göre daha reaktif bir türevidir. Normal koşullarda, süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir, ancak süperoksit düzeyleri çok artmışsa veya fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse peroksinitrit oluşur [117].

Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. Peroksinitritin proteinlerle etkileşiminin ana ürünü tirozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da nitrotirozin oluşumuna yol açar [114].

Nitrotirozin,  $ONOO^{\cdot -}$  oksidasyonunun stabil son ürünü olması nedeniyle NO bağımlı in vivo hasarın tespitinde spesifik bir belirteçdir [118,119].  $ONOO^{\cdot -}$ ; DNA’yı, proteinleri ve lipidleri okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir [120,121]. Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin düzenlenmesini ve sinyal ileti mekanizmalarının düzenlenmesini etkiler [122]. Bugünkü bilgilere göre,  $ONOO^{\cdot -}$  tek başına nitrik oksitten ve süperoksit radikalinden daha güçlü bir oksidan ve sitotoksik mediyatördür [123].

#### 2.14.6. Ürik asit:

Ürik asit insanlarda pürin katabolizmasının son ürünüdür. Ksantin oksidaz enzimiyle hipoksantin ve ksantinden oluşur. Ürik asitin normal düzeylerde toksik reaktanları temizlediği ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Organizmada oksidatif stres varlığında ürik asit düzeyleri artmaktadır. Normal düzeyinin üçte biri veya üzerinde artış olursa bir prooksidan olarak rol oynadığı tespit edilmiştir [124]. Suda çözünen bir antioksidan olduğundan radikaller tarafından başlatılan LDL oksidasyonunu bastırır, ancak zincir uzama reaksiyonlarını kırmak için LDL içindeki lipofilik radikalleri temizleyemez. Ürik asit sadece bir radikal temizleyicisi değildir, biyolojik sıvılarda askorbik asidi de stabilize eder. Ürik asit süperoksit radikali ile direkt olarak etkileşmez ,ancak hidroksil radikalinin inaktivasyonuna neden olur [125].

Peroksinitritin, MS ve EAE'nin patogeneğinde major bir faktör olarak belirlenmesi ve güçlü bir peroksinitrit temizleyicisi olan ürik asidin MS'nin hayvan modeli olan EAE'yi baskılaması MS hastalığı ile serum ürik asit düzeyleri arasındaki ilişkilere dikkat çekmiştir. Yakın dönemde yapılan çalışmalarda, MS hastalarında, serum ürik asit seviyesinin düşük olabileceği ve böylece peroksinitrit aktivitesinin artarak, progresif zedelenmeye neden olabileceği öne sürülmüştür. Ürik asidin bu hastalarda primer mi eksik olduğu, yoksa antioksidan aktivitesinden dolayı sekonder olarak mı düşük olduğu henüz belirlenmemiştir [126].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalardan imzalı olur ve bilgilendirme formu alınmıştır.

Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı Multipl Skleroz polikliniğine Ağustos 2006 – Eylül 2007 tarihleri arasında başvuran veya Nöroloji servisinde yatırılarak takip edilen McDonald kriterlerine göre Relapsing Remitting MS (RRMS) tanısı alan ve 5-10 günlük yüksek doz (1000mg/gün) metilprednizolon tedavisi uygulanan 20 hastada prospektif olarak gerçekleştirilmiştir.

Polikliniğe başvuran hastalar arasından, yukarıdaki kriterlere uygun olarak seçilen yaşları 17 ile 52 arasında değişen 13 kadın, 7 erkek hastanın fizik ve nörolojik muayeneleri yapıldı. Tanı amacı ile lomber ponksiyonları (LP) ve MRG'leri (kraniyal ve gerekli görülen olgularda spinal) yapıldı. Klinik, laboratuvar ve görüntüleme tetkikleriyle Mc Donald kriterlerine göre kesin MS tanısı konan hastaların Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği (Expanded Disability Status Scale 'EDSS') puanı hesaplandı.

Bulguları 24 saatten uzun süre devam eden hastalar akut atak olarak kabul edilerek 5-10 gün süreyle 1000 mg/gün metilprednizolon tedavisi uygulandı.

Serum analizi için kontrol grubunu hasta grubu ile yaş ortalamaları ve cinsiyetleri uyumlu 15 sağlıklı birey oluşturdu. BOS analizi için kontrol grubu nörodejeneratif hastalığı olmayan (normal basınçlı hidrosefali gibi) hastalar arasından seçildi. BOS incelemesi için örnek, ayırıcı tanı amacı ile lomber ponksiyon yapılan hastalardan alındı. Hastalardan araştırmada kullanılmak üzere ayrıca BOS örneği alınmadı.

Kontrol grubundan bir kez, hasta grubundan tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere iki kez kan örneği alındı. 10ml venöz kan örneği saat 8.00-10.00 arasında aç karnına alındı. EDTA'lı ve kuru tüplere alınan kanlar bekletilmeden santrifüj edilerek plazma ve serum ayrıştırıldı. -80 °C'de saklandı.

Çalışmaya dahil edilen MS hastalarına ait demografik bilgiler tablo 5'de gösterilmiştir.



Tablo 3.1. Demografik bilgiler

	<b>MS hastaları</b>	<b>Kontrol grubu</b>	<b>BOS kontrol grubu</b>
Hasta sayısı	20	15	15
Cinsiyet (E/K)	7/13	5/10	6/9
Yaş	31 ± 9,6	30,2 ± 5,51	28,33 ± 5,31
EDSS	1,7 ± 0,84	-	-

### 3.1. Kullanılan Gereçler

Spektrofotometre ( Schimadzu UV 2001)

Fluorometre (Bio-Rad VersaFlour)

ELISA okuyucu (ELX 800 UV)

ELISA yıkayıcı (Biotec trinity)

Santrifüj (Bifuge stratos Heraeus Instruments)

Etüv (Biyomed FN 500)

Derin dondurucu (-80<sup>0</sup>C Rua Instruments)

pH-metre (pH-meter CG840 Schott)

Vortex (Girdap Elektromag)

Hassas terazi (Schimadzu, Libror AEU-210)

### 3.2. Yöntemler

#### 3.2.1. Malondialdehit (MDA) ölçümü

Serum ve BOS MDA düzeylerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem uygulandı. (Northwest Life science Specialties, LLC, NWK-MDA01)

#### **Prensip:**

Lipid peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden biri olan MDA'nın asit ortamda tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyonlaşarak 532 nm'de absorbanı veren MDA-TBA kompleksi oluşturmasına dayanan spektrofotometrik yöntemle saptandı.

**Ayıracılar :**

1. 2-Tiyobarbitürik asit ( TBA)
2. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) asetonitril içinde
3. Asit ayıracı (1M fosforik asit)
4. Fosfat Tamponu pH: 7.0 EDTA'lı
5. Kalibratörler; 0,1,2,3,4 µM MDA içeren tetrametoksipropan

**İşlem:**

1. TBA ayıracı 10.5 ml deiyonize su ile sulandırıldı ve manyetik karıştırıcı ile iyice çözülmesi sağlandı.
2. 10µL BHT üzerine 250µL örnek eklendi.
3. Üzerine 250µL asit ayıracı ve 250 µL TBA eklenerek vorteksle karıştırıldı.
4. 60 dakika 60°C'de inkübe edildi.
5. 10.000xg'de 2-3 dakika santrifüj edildikten sonra berrak sıvının absorbansı distile suya karşı 532nm'de okundu.

**Hesap:**

Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı ve nmol/mL olarak verildi.

$$\text{MDA (nmol/mL)} = (\Delta A / 1,56 \times 10^5) \times (10^9 / 10^3) \times (\text{toplam hacim} / \text{örnek hacim})$$

**3.2.2. 8-izoprostan (PG F2 ) ölçümü**

Serum ve BOS 8-izoprostan düzeylerinin belirlenmesinde yarışmalı Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) yöntemi uygulandı. (Northwest Life science Specialties, LLC, NWK-IS001)

**Prensip:**

NWK ELISA kiti yarışma prensibini ve plakada ayrılmayı esas alarak ölçüm yapmaktadır. Örnekte bulunan 8-izoprostanın bilinmeyen bir miktarı ile 8-izoprostan konjugatının bilinen bir miktarı kuyucuklar içerisinde karıştırıldı ve kuyucuklarda kaplanmış olarak bulunan poliklonal antikorun bağlanma bölgeleri için yarıştırdı. Bağlanmayan konjugat yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Substrat çözeltisi eklendi ve 8-izoprostan miktarına

bağlı mavi renk oluşumu gözlemlendi. Örnekteki 8-izoprostan konsantrasyonu ile ölçülen optik dansite ters orantılıdır.

#### **Ayırıcılar :**

1. Anti-8-izoprostan ile kaplı 96 kuyucuklu plaka
2. 8-izoprostan standartı
3. Yıkama tamponu
4. Seyreltme tamponu
5. Tetrametilbenzidin (TMB) sustratı
6. 8-izoprostan horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı

#### **Örnek hazırlanması:**

Solid faz ekstraksiyonu ve fosfolipid hidrolizi ile örnekler aşağıdaki ön işleme tabi tutuldu.

1. 200 $\mu$ L örnek 50 $\mu$ L 10 N NaOH ile karıştırıldı ve 2 saat 45<sup>0</sup>C'de inkübe edildi.
2. Soğutulduktan sonra 50 $\mu$ L 12.1N HCl eklendi ve 14.000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

#### **Ayırıcıların hazırlanması:**

1. Yıkama tamponu 160mL deiyonize su ile 5 kat seyreltildi.
2. Seyreltme tamponu 400mL deiyonize su ile 5 kat seyreltildi.
3. 8-izoprostan HRP-Enzim konjugatı (90 $\mu$ L) 11,91 mL seyreltilmiş tampon ile sulandırıldı.

#### **Standart hazırlanması:**

Stok standart; 8-izoprostan 1 $\mu$ g/mL

Standart 7: 50 $\mu$ L stok standart + 450 $\mu$ L seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 100 ng/mL

Standart 6: 200 $\mu$ L Standart 7 + 200 $\mu$ L seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 50ng/mL

Standart 5: 100 $\mu$ L standart 6 + 400 $\mu$ L seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 10ng/mL

Standart 4: 200 $\mu$ L standart 5 + 200 $\mu$ L seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 5ng/mL

Standart 3: 100µL standart 4 + 400µL çalışma seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 1ng/mL

Standart 2: 100µL standart 3 + 900µL seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 0,1ng/mL

Standart 1: 500µL standart 2 + 500µL seyreltilmiş tampon eklenerek vortekslendi, konsantrasyonu: 0,05ng/mL

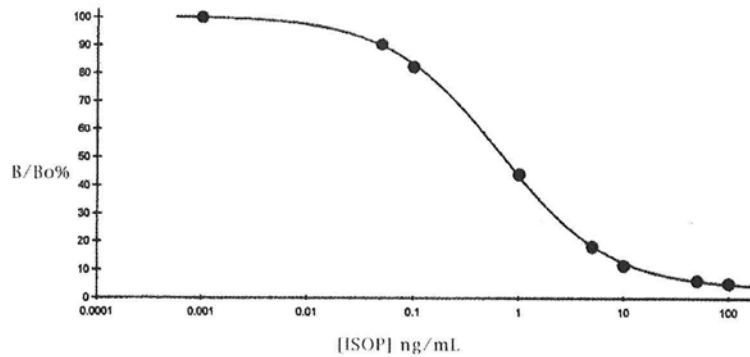
Standart 0: 500µL seyreltilmiş tampon kondu.

### İşlem:

1. Standart ve örneklerden 100µL sırasıyla kuyucuklara yerleştirildi.
2. HRP konjugatından kör kuyucuğu hariç 100µL eklendi. Kör kuyucuğuna 100µL seyreltilmiş tampon kondu.
3. 2 saat oda ısısında inkübe edildikten sonra plaka ters çevrildi ve kurutma kağıdı üzerinde iyice boşaltıldı.
4. 3 kez 400µL yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrar edildi.
5. 200µL substrat eklendi ve 20-30 dakika oda ısısında bekletildi.
6. 50µL 3M sülfirik asit eklenerek reaksiyon durduruldu.
7. Absorbanslar 450nm'de okundu.

### Hesap:

Dört parametre lojistik fonksiyona göre standart konsantrasyonu (X), standart absorbansı (Y) olmak üzere çizilmiş standart eğri üzerinde her örneğin absorbansı değerlendirilerek 8-izoprostan konsantrasyonları ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 3.1. 8-izoprostan standart eğrisi

$B_0$  (maksimum bağlanma): Serbest analit yokluğunda antikora bağlanabilecek maksimum konjugat miktarı

% B/B<sub>0</sub>: Örnekteki veya standarttaki 8-izoprostan konsantrasyonunun B<sub>0</sub>'a oranının yüzdesi

### 3.2.3. Konjuge dien ölçümü

#### **Prensip:**

Lipid ekstaksiyonu yapılarak saflaştırılmış örneğin sikloheksana karşı 234 nm ultraviyole ışıktaki verdiği absorbans ölçüldü [127].

**Ayırıcılar:** \* Kloroform-metanol karışımı  
\* Sikloheksan

#### **İşlem:**

1. 0,25 ml örnek üzerine 3,75 ml kloroform / metanol (2:1) karışımı eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra süzüldü.
2. Bu lipid süzüntüsü kloroform / metanol karışımı ile 4 ml'ye tamamlandı.
3. Karışımdan 2 ml alınarak 37 C' su banyosunda azot altında uçuruldu.
4. Kuru kalıntı üzerine 3 ml sikloheksan eklenerek spektrofotometrede 234 nm'de sikloheksana karşı okundu.

#### **Hesap:**

Konjuge dien düzeyleri 234 nm'de hidroperoksitlerin ekstinksiyon katsayısından ( $=2.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Konjuge dien } (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A / 2.34 \times 10^4) \times (\text{toplam hacim} / \text{örnek hacim})$$

### 3.2.4. Nitrotirozin ölçümü

Plazma ve BOS nitrotirozin düzeylerinin belirlenmesinde sandviç prensibine dayananan solid-faz ELISA yöntemi uygulandı. (Hycult biotechnology b.v. Hbt HK501)

**Prensip:**

Örnek ve standartlar nitrotirozini tanıyan antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında nitrotirozin antikorlarla bağlandı, bağlanmayan kısım yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen sekonder antikor örnekteki nitrotirozine bağlandı. Bağlanmayan antikorlar yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen enzim kompleksi (Streptavidin-peroksidaz) sekonder antikor ile etkileşime girerek substrat ilave edilince nitrotirozin konsantrasyonu ile orantılı olarak renk reaksiyonu oluşturdu. Rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

**Ayıraçlar:**

1. Konsantre yıkama tamponu (Tween 20)
2. Konsantre seyreltme tamponu (PBS)
3. Dondurulmuş kuru nitrotirozin, konsantrasyonu 4µM,
4. Nitrotirozine karşı biyotinize antikor
5. Konsantre streptavidin peroksidaz konjugatı
6. Tetrametilbenzidin (TMB) sustratı
7. Durdurma çözeltisi; 2.0M sitrik asit
8. Nitrotirozin antikorlu ile kaplı 96 kuyucuklu plaka

**Örnek hazırlanması:**

Tüm örnekler oda ısısına getirilirdi ve 10µL örnek seyreltme tamponu ile 20 kez sulandırıldı.

**Ayıraçların hazırlanması:**

1. Tüm ayıraçlar oda ısısına getirildi. Konsantre seyreltme tamponunun tamamen çözülmesi için 37<sup>0</sup>C'ye kadar ısıtıldı.
2. Konsantre seyreltme tamponu distile su ile 10 kez seyreltildi.
3. Nitrotirozine karşı biyotinize antikor 1ml distile su ile karıştırıldı, üzerine 11ml seyreltme tamponu eklendi.
4. Konsantre streptavidin peroksidaz konjugatı 1ml distile su ile karıştırıldı, üzerine 23ml seyreltme tamponu eklendi.
5. Yıkama tamponu 800ml distile su ile 40 kez seyreltildi.

**Standartların hazırlanması:**

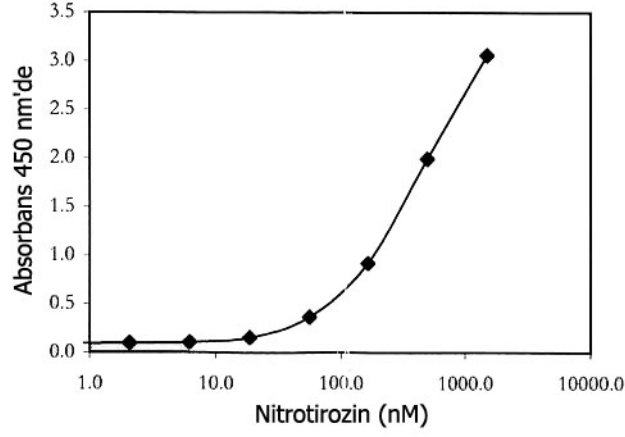
1. Standart 1ml distile su ile karıştırıldı.
2. 8 adet polipropilen tüp sırayla numaralandırıldı. 1. tüpe 125µL sulandırılmış standarttan kondu ve üzerine 742µL seyreltme tamponu eklendi.
3. 2-7 numaralı tüplere 250µL seyreltme tamponu kondu. 8. tüpe 500µL seyreltme tamponu kondu.
4. 1. tüpten 2. tübe 125µL aktarıldı ve bu işlem sırasıyla 7. tübe kadar uygulandı.

**İşlem:**

1. Standartlardan ve örneklerden 100 µL sırasıyla kuyucuklara yerleştirildi. Plaka üzeri kapatılarak oda ısısında (18-25<sup>0</sup>C) 1 saat inkübasyona bırakıldı.
2. Plaka dikkatle ters çevrilerek boşaltıldı. 3 kez 200µL yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrarlandı.
3. 100µL nitrotirozine karşı biyotinize antikor ilave edildi ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
4. Yıkama işlemi 2. basamaktaki gibi tekrarlandı.
5. 100µL streptavidin peroksidaz konjugatı ilave edildi ve 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
6. Yıkama işlemi 2. basamaktaki gibi tekrarlandı.
7. 100µL TMB substratı ilave edildi ve 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
8. 100µL durdurma çözeltisi ilave edildi, absorbanslar 450 nm'de okundu.

**Hesap:**

Dört parametre lojistik fonksiyona göre standart konsantrasyonu(X), standart absorbansı(Y) olmak üzere çizilmiş standart eğri üzerinde her örneğin absorbansı değerlendirilerek nitrotirozin konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan sonuçlar seyreltme faktörü olan 20 ile çarpılıp gerçek nitrotirozin konsantrasyonları nM olarak elde edildi.



Şekil 3.2. Nitrotirozin standart eğrisi

### 3.2.5. Nitrit-nitrat( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) ölçümü

#### Prensip:

Nitrit-nitrat düzeyi, nitratın nitrat redüktaz enzimi ile nitrite indirgenmesi sonrasında fluorometrik yöntemle ölçüldü [128].

2,3-diaminaftalen(DAN) ile nitritin reaksiyona girmesi sonucunda oluşan fluoresans maddenin (2,3-diaminonaftatriazol veya 1-(H)-naftatriazol) ölçülmesi esasına dayanır.

#### Ayırıcılar:

1. 2,3-Diaminonaftalen (0.62M HCl içinde)
2. Nitrat redüktaz
3. NADPH çözeltisi (20mM Tris tamponu içinde)
4. NaOH (2.8N)
5. Nitrit standartı

#### Örnek hazırlanması:

Örnekler EDTA'lı tüplere alındıktan sonra santrifüj edildi. Plazma kısmını 10.000 cutoff değerine sahip filtrelerden (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices Millipore) 15 dakika 14.000 rpm hızda santrifüj edilerek süzüldü.



### Standart hazırlanması:

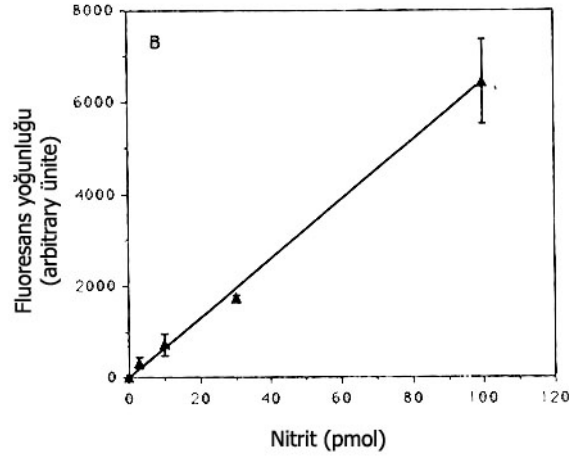
10, 30, 50, 70, 100 pmol/mL olarak hazırlanmış sodyum nitrit çözeltileri taze hazırlanmış DAN ile karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 5µL 2,8N NaOH ilave edildi ve flourometrik ölçüm yapıldı. (eksitasyon: 365nm, emisyon: 450nm)

### İşlem:

1. 100µL plazma, 50µL 20 mM tris tampon (40 µM NADPH ve 14mU nitrat redüktaz içeren) ile karıştırıldı.
2. Karışım oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
3. 50µL su ve 10µL DAN (0,05mg/ml, 0,62MHCl içinde) eklendi ve hemen karıştırıldı.
4. Karışım oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
5. 5µL 2,8N NaOH ilave edildi ve flourometrik ölçüm yapıldı. (eksitasyon: 365nm, emisyon: 450nm)

### Hesap:

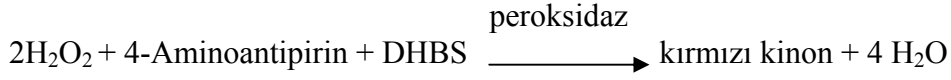
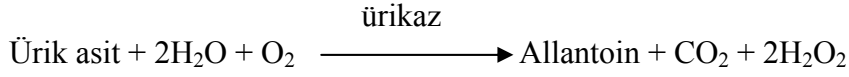
Standart çözeltileri kullanılarak oluşturulan grafikten, örnek absorbanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar µmol/L olarak hesaplandı.



Şekil 3.3. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> standart eğrisi

### 3.2.6. Ürik asit ölçümü

Serum ve BOS örneklerinde ürik asit düzeylerinin ölçümü için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı.(Futura System S.r.l.)

**Prensip:**

Oluşan renk direkt olarak ürik asit konsantrasyonu ile orantılıdır.

**Ayırıcılar:**

1. Tampon; pH:8.0                      80 mmol/L

Dikloro-2- hidroksibenzensulfonik asit (DHBS) 2,6 mmol/L

EDTA-Na<sub>2</sub> 6,1 mmol/L

Sodyum azid < %0.1

**2. Enzimler**

Peroksidaz                                      5000 U/L

Ürikaz    1000 U/L

Potasyum Ferro Siyanid                      0,25 mmol/L

4-Aminoantipirin                              6,1 mmol/L

EDTA-Na<sub>2</sub>                                        6,1 mmol/L

**3. Kalibratör**

ürrik asit                                         6 mg/dL

**İşlem:**

1. Tüm ayırıcılar oda ısısına getirildi.
2. Enzimler tampon ile 5 kez seyreltildi.

	Kör	Örnek	Kalibratör
Distile su	25µL	-	-
Örnek	-	25µL	-
Kalibratör	-	-	25µL
Çalışma çözeltisi	1ml	1ml	1ml

Karışım 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Kalibratör ve örneklerin absorbanları 510 nm'de köre karşı okundu.

**Hesap:**

Ürik asit (mg/dL)=  $A_{\text{örnek}} / A_{\text{kalibratör}} \times \text{kalibratör değeri}$

**3.2.7. TNF ölçümü**

Serum ve BOS TNF düzeylerinin belirlenmesinde sandviç prensibine dayananan solid-faz ELISA yöntemi uygulandı.(Biosource Immunoassay Kit, cat no: KHC3011)

**Prensip :**

Örnek ve standartlar TNF 'yı tanıyan antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında TNF antikorlarla bağlandı, bağlanmayan kısım yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen monoklonal spesifik anti-TNF antikorları örnekteki TNF 'ya bağlandı. Bağlanmayan antikorlar yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen enzim kompleksi (streptavidin-peroksidaz) sekonder antikor ile etkileşime girdi ve substrat ilave edilince TNF konsantrasyonu ile orantılı olarak renk reaksiyonu oluştu. Rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

**Ayıracılar:**

1. TNF standartı
2. Standart seyreltme tamponu
3. İnkübasyon tamponu
4. TNF antikoru kaplı 96 kuyucuklu plaka
5. TNF biyotin konjugatı
6. 100 kat konsantre streptavidin peroksidaz (1,3 mM timol)
7. Streptavidin peroksidaz çözücü
8. 25 kat konsantre yıkama tamponu
9. Tetrametilbenzidin (TMB)
10. Durdurma çözeltisi

**Ayıracıların hazırlanması:**

1. Streptavidin peroksidazın (100 kat konsantre) 10 $\mu$ L'si 1mL streptavidin peroksidaz çözücü ile sulandırıldı.
2. Yıkama tamponu deiyonize su ile 25 kez seyreltildi.

**Standartların hazırlanması:**

Standart 1: 0.300 mL standart + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 1000 pg/mL  
Standart 2: 0.300 mL standart 1 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 500 pg/mL  
Standart 3: 0.300 mL standart 2 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 250 pg/mL  
Standart 4: 0.300 mL standart 3 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 125 pg/mL  
Standart 5: 0.300 mL standart 4 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 62.5 pg/mL  
Standart 6: 0.300 mL standart 5 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 31.2 pg/mL  
Standart 7: 0.300 mL standart 6 + 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 15.6 pg/mL  
Standart 8: 0.300 mL seyreltme tamponu, konsantrasyonu: 0 pg/mL

**İşlem :**

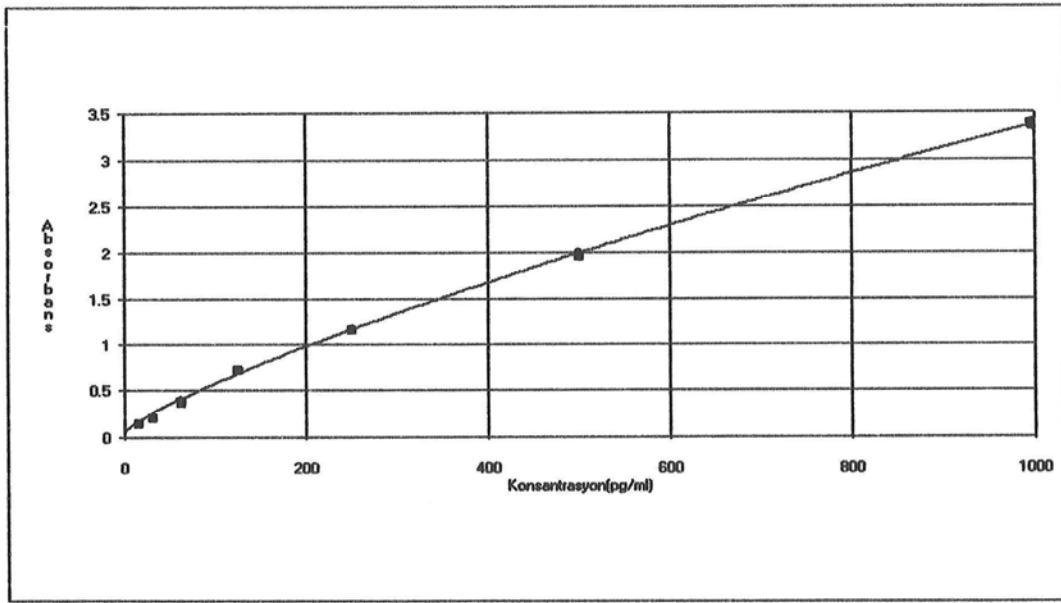
1. Kromojen körü için ayrılan kuyucuk hariç her kuyucuğa 50 $\mu$ L inkübasyon tamponu kondu.
2. Standart ve örneklerden 100 $\mu$ L sırasıyla plakaya yerleştirildi.
3. Plaka kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
4. Ters çevrilip boşaltıldıktan sonra 4 kez 400 $\mu$ L seyreltilmiş yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Kromojen körü hariç diğer kuyucuklara 100 $\mu$ L anti-TNF (biyotin konjugatı) eklendi.
6. Plaka kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
7. Ters çevrilip boşaltıldıktan sonra 4 kez 400 $\mu$ L seyreltilmiş yıkama tamponu ile yıkandı.
8. Kromojen körü hariç diğer kuyucuklara 100 $\mu$ L Streptavidin-HRP çalışma çözeltisi eklendi.
9. Plaka kapatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
10. Ters çevrilip boşaltıldıktan sonra 4 kez 400 $\mu$ L seyreltilmiş yıkama tamponu ile yıkandı.
11. Tüm kuyucuklara 100 $\mu$ L kromojen (TMB) eklendi.
12. Plaka kapatılarak 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi.

13. Tüm kuyucuklara 100µL durdurma çözeltisi eklendi.

14. Absorbanslar 450nm’de okundu.

### Hesap:

Dört parametre lojistik fonksiyona göre standart konsantrasyonu (X), standart absorbansı (Y) olmak üzere çizilmiş standart eğri üzerinde her örneğin absorbansı değerlendirilerek TNF konsantrasyonları pg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 3.4. TNF standart eğrisi

### 3.2.8. Hücreler arası adezyon molekülü (ICAM-1) ölçümü

Serum ve BOS ICAM-1 düzeylerinin belirlenmesinde yarışmalı (kompetitif) Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) yöntemi uygulandı. (Biosource Immunoassay Kit, cat no: KHS5412)

### Prensip :

Örnek ve standartlar sICAM-1’i tanıyan antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında sICAM-1 antikorlarla bağlandı, bağlanmayan kısım yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen monoklonal spesifik anti- sICAM-1 antikorları örnekteki sICAM-1’e

bağlandı. Bağlanmayan antikorlar yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen enzim kompleksi (streptavidin-peroksidaz) sekonder antikor ile etkileşime girdi ve substrat ilave edilince sICAM-1 konsantrasyonu ile orantılı olarak renk reaksiyonu oluştu. Rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

#### **Ayıraçlar:**

1. sICAM-1 monoklonal antikorlu kaplı 96 kuyucuklu plaka
2. HRP-konjugatı
3. sICAM-1 standartı (10 ng/mL)
4. Yıkama tamponu (PBS %1'lik Tween 20 ile birlikte)
5. Örnek çözücü
6. Ölçüm tamponu (PBS %1'lik Tween 20 ve %10'luk BSA ile birlikte)
7. Substrat çözeltisi (tetrametilbenzidin)
8. Durdurma çözeltisi (1M fosforik asit)
9. Renk verici ayıraçlar: Blue-Dye, Green-Dye

#### **Ayıraçların hazırlanması:**

1. 50 mL yıkama tamponu 950 mL deiyonize su ile karıştırıldı.
2. 5 mL ölçüm tamponu 95 mL deiyonize su ile karıştırıldı.
3. 0.1 mL HRP-konjugatı 5.9 mL ölçüm tamponu ile karıştırıldı.
4. Blue-Dye ve Green-Dye renklendirici ayıraçları; HRP-konjugatına eklenerek kullanıldı.

#### **Standartların hazırlanması:**

1. 5 adet polipropilen tüp sırayla numaralandırıldı.
2. Tüplere 100µL örnek çözücü kondu.
3. sICAM-1 standartından 100µL 1. tüpe aktarıldı.
4. İlk tüpten başlayarak bir sonrakine 100'er µL aktarıldı, konsantrasyonlar sırasıyla 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/mL 'dir.

#### **Örnek hazırlanması:**

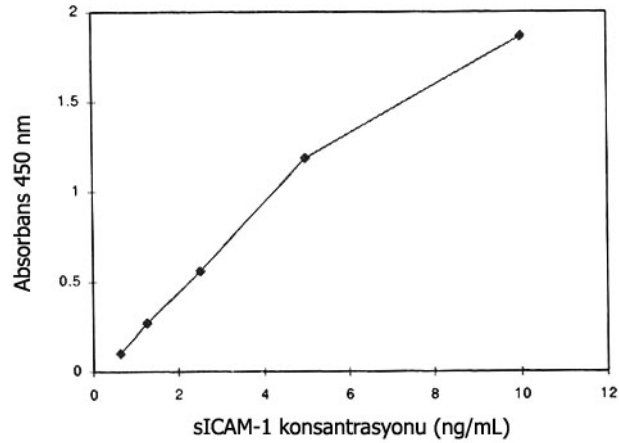
Örnekler 1:100 oranında örnek çözücü ile sulandırıldı. 10µL örnek + 90µL örnek çözücü karıştırıldı ve bu karışımdan 50µL alınarak 450µL örnek çözücü eklendi.

**İşlem:**

1. 100µL örnek çözücü kör kuyucuğuna kondu.
2. Standart ve örneklerden 100µL sırasıyla plakaya yerleştirildi.
3. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 50 µL HRP-konjugatı eklendi.
4. Plaka kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
5. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve 3 kez 300µL yıkama tamponu ile yıkandı.
6. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 100 µL TMB-substrat eklendi.
7. Plaka kapatılarak 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
8. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 100 µL durdurma çözeltisi eklendi.
9. Absorbanslar 450nm'de okundu.

**Hesap:**

Dört parametre lojistik fonksiyona göre standart konsantrasyonu(X), standart absorbansı(Y) olmak üzere çizilmiş standart eğri üzerinde her örneğin absorbansı değerlendirilerek ICAM-1 konsantrasyonları ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 3.5. ICAM-1 standart eğrisi

**3.2.9. Vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ölçümü**

Serum ve BOS VCAM-1 düzeylerinin belirlenmesinde yarışmalı (kompetitif) Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) yöntemi uygulandı. (Bender MedSystems, cat no: BMS232)

### **Prensip :**

Örnek ve standartlar sVCAM-1'i tanıyan antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında sVCAM-1 antikorlarla bağlandı, bağlanmayan kısım yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen monoklonal spesifik anti- sVCAM-1 antikorları örnekteki sVCAM-1'e bağlandı. Bağlanmayan antikorlar yıkama işlemiyle uzaklaştırıldı. Eklenen enzim kompleksi (streptavidin-peroksidaz) sekonder antikor ile etkileşime girdi ve substrat ilave edilince sVCAM-1 konsantrasyonu ile orantılı olarak renk reaksiyonu oluştu. Rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

### **Ayırıcılar:**

1. sVCAM-1 monoklonal antikorlu kaplı 96 kuyucuklu plaka
2. Streptavidin-HRP ile birlikte biyotin-konjugatı
3. Liyofilize sVCAM-1 standardı (200 ng/mL),
4. Liyofilize pozitif kontrol
5. Yıkama tamponu (PBS %1'lik Tween 20 ile birlikte)
6. Ölçüm tamponu (PBS %1'lik Tween 20 ve %10'luk BSA ile birlikte)
7. Substrat çözeltisi (tetrametilbenzidin)
8. Durdurma çözeltisi (1M fosforik asit)
9. Renk verici ayırıcılar: Blue-Dye, Green-Dye

### **Ayırıcıların hazırlanması:**

1. 50 mL yıkama tamponu 950 mL deiyonize su ile karıştırıldı.
2. 5 mL ölçüm tamponu 95 mL deiyonize su ile karıştırıldı.
3. 0,06 mL biyotin-konjugatı / streptavidin HRP karışımı 5,94 mL ölçüm tamponu ile karıştırıldı.
4. Blue-Dye ve Green-Dye renklendirici ayırıcıları; biyotin-konjugatı / streptavidin HRP karışımına eklenerek kullanıldı.

### **Standartların hazırlanması:**



5. 6 adet polipropilen tüp sırayla numaralandırıldı.
6. Tüplere 250µL ölçüm tamponu kondu.
7. Liyofilize olan sVCAM-1 standartı distile su ile sulandırıldı. Bundan 250µL 1.tübe aktarıldı.
8. İlk tüpten başlayarak bir sonrakine 250'er µL aktarıldı, konsantrasyonlar sırasıyla 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2 ng/mL 'dir.

**Örnek hazırlanması:**

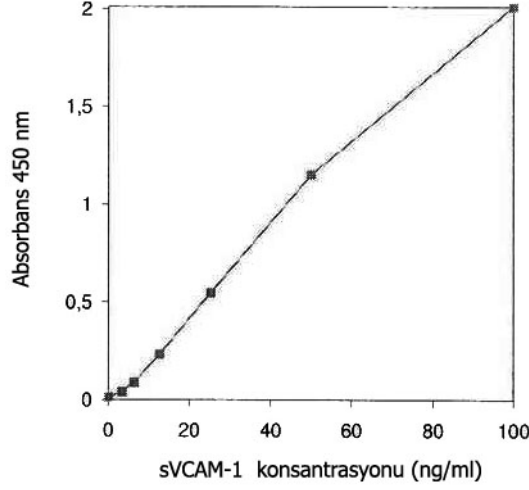
1. 10µL örnek + 490µL ölçüm tamponu ile seyreltildi.

**İşlem:**

1. 50µL biyotin-konjugatı / streptavidin HRP karışımı kör kuyucuk hariç diğerlerine eklendi.
2. Standart ve örneklerden 100µL sırasıyla plakaya yerleştirildi.
3. 100 µL ölçüm tamponu, kör kuyucuğa eklendi.
4. Plaka kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
5. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve 3 kez 300µL yıkama tamponu ile yıkandı.
6. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 100 µL TMB-substrat çözeltisi eklendi.
7. Plaka kapatılarak 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
8. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 100 µL durdurma çözeltisi eklendi.
9. Absorbanslar 450nm'de okundu.

**Hesap:**

Dört parametre lojistik fonksiyona göre standart konsantrasyonu(X), standart absorbansı(Y) olmak üzere çizilmiş standart eğri üzerinde her örneğin absorbansı değerlendirilerek VCAM-1 konsantrasyonları ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. VCAM-1 standart eğrisi

### 3.2.10. İstatiksel değerlendirme

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 10.0 istatistik paket programı kullanıldı.

MS hastalarının metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında incelenen kan parametrelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında Student T testi ve Mann Whitney- U testi kullanıldı.

MS hastaları ve kontrol grubu BOS parametrelerinin istatiksel değerlendirilmesinde nonparametrik Wilcoxon Rank testi kullanıldı.

Gruplar içinde incelenen parametreler arasındaki ilişkileri saptamada Pearson korelasyon analizi uygulandı.

$p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

MS hastalarının (n=20) ve kontrol grubunun (n=15) kan (serum, plazma) ve BOS örneklerinde incelenen parametreler:

- a) oksidatif stres göstergesi olarak;
  - MDA (EDTA'lı plazma, BOS)
  - 8-izoprostan (serum, BOS)
  - konjuge dien (serum, BOS)
- b) nitrozatif stres göstergesi olarak;
  - nitrotirozin (EDTA'lı plazma, BOS)
  - nitrit-nitrat (EDTA'lı plazma, BOS)
  - peroksinitrit tutucusu olan ürik asit (serum, BOS)
- c) enflamasyon belirteci olarak;
  - ICAM-1 (serum, BOS)
  - VCAM-1 (serum, BOS)
  - TNF (serum, BOS)

İncelenen parametrelere ait bulgular tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'de , istatistiksel anlamlılıklar tablo 4.6 ve 4.7'de ve korelasyon analizi bulguları tablo 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.

#### 4.1. İstatistik anlamlılık

**Metilprednizolon tedavi öncesi MS ve kontrol grubu kan parametrelerinin istatistiksel deęerlendirmesi (Tablo 4.6);**

Oksidatif stres göstergelerinden 8-izoprostan ve konjuge dien düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$  sırasıyla).

Nitrozatif stres göstergelerinden nitrotirozin ve nitrit-nitrat düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$  sırasıyla).

**Metilprednizolon tedavi sonrası MS ve kontrol grubu kan parametrelerinin istatistiksel deęerlendirmesi (Tablo 4.6);**

Oksidatif stres göstergelerinden konjuge dien düzeyi MS hastalarının tedavi sonrası grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,01$ ).

Nitrozatif stres göstergelerinden nitrotirozin düzeyi MS hastalarının tedavi sonrası grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,001$ ).

**MS hastalarının metilprednizolon tedavi öncesi ve sonrası kan parametrelerinin istatistiksel değerlendirmesi (Tablo 4.6);**

Oksidatif stres göstergelerinden 8-izoprostan düzeyi MS hastalarının tedavi sonrası grubunda, tedavi öncesi grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,05$ ).

Ürik asit düzeyi MS hastalarının tedavi sonrası grubunda, tedavi öncesi grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,05$ ).

**MS hastaları ve kontrol grubu BOS parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi (Tablo 4.7);**

Nitrozatif stres göstergelerinden nitrotirozin ve nitrit-nitrat düzeyleri MS hastalarının BOS örneklerinde, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,001$ ).

Enflamasyon göstergelerinden TNF düzeyi MS hastalarının BOS örneklerinde, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,05$ ).

**4.2. Korelasyon analizi bulguları**

**Kontrol grubu (Tablo 4.8):**

- Ürik asit ile MDA arasında (+) korelasyon ( $r = 0.720, p<0,05$ )
- 8-izoprostan ve konjuge dien arasında (-) korelasyon ( $r = -0.556, p<0,05$ )
- Nitrotirozin ile TNF arasında (+) korelasyon ( $r = 0.584, p<0,05$ )

**MS hastaları tedavi öncesi (Tablo 4.9):**

- Yaşla 8-izoprostan ve konjuge dien arasında (+) korelasyon ( $r = 0.444, r = 0.446, p<0,05$ ),
- 8-izoprostan ile nitrotirozin arasında (-) korelasyon ( $r = -0.510, p<0,05$ )
- Nitrotirozin ile ICAM-1 arasında (+) korelasyon ( $r = 0.496, p<0,05$ )
- Ürik asit ile yaş, konjuge dien ve MDA arasında (+) korelasyon ( $r = 0.445, r = 0.474, r = 0.493, p<0,05$ )

**MS hastaları tedavi sonrası (Tablo 4.10):**

- Konjuge dien ile MDA ve ICAM-1 arasında (+) korelasyon ( $r = 0.450$ ,  $r = 0.445$ ,  $p < 0,05$ )

**BOS kontrol grubu (Tablo 4.11):**

- Ürik asit ile TNF arasında (-) korelasyon ( $r = -0.689$ ,  $p < 0,05$ )
- Ürik asit ile ICAM-1 arasında (+) korelasyon ( $r = 0.668$ ,  $p < 0,05$ )
- TNF ile ICAM-1 arasında (-) korelasyon ( $r = -0.519$ ,  $p < 0,05$ )
- VCAM-1 ile ICAM-1 arasında (+) korelasyon ( $r = 0.575$ ,  $p < 0,05$ )

**MS hastaları BOS bulguları (Tablo 4.12):**

- 8-izoprostan ile MDA ve konjuge dien arasında (-) korelasyon ( $r = -0.486$ ,  $r = -0.589$ ,  $p < 0,05$ )
- Nitrit-nitrat ile ürik asit arasında (+) korelasyon ( $r = 0.452$ ,  $p < 0,05$ )

**Tablo 4.1: Kontrol grubu kan örneklerinde incelenen biyokimyasal parametrelere ait bulgular (n= 15)**

Hasta adı	yaş	cinsiyet	MDA nmol/ml	8-izoprostan ng/ml	Konjuge dien µmol/L	Nitrotirozin nM	Nitrit-nitrat µmol/L	Ürik asit mg/dl	TNF pg/ml	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml
MA	33	K	3,13	150,00	187,20	715,8	95,46	3,08	9,48	2,23	13,69
CA	36	E	7,03	172,39	210,60	965,6	84,70	6,45	10,36	3,40	18,09
SF	32	K	4,40	261,10	23,40	840,8	55,30	5,61	10,63	3,37	16,08
HG	30	K	3,05	247,55	163,80	1051	43,32	6,34	12,58	3,32	24,68
HÇ	27	K	5,90	88,15	163,80	1017,4	61,45	6,39	10,90	2,56	17,24
SA	26	K	5,06	123,45	187,20	1230,8	56,87	5,89	12,31	2,88	16,15
BY	27	K	2,53	186,32	140,40	645,8	100,78	3,42	9,30	2,80	35,97
BD	27	K	3,77	175,63	257,40	816,4	65,10	5,10	9,30	3,19	14,29
SG	27	K	4,36	92,97	210,60	892,6	102,34	4,93	9,30	2,99	15,38
E	28	E	5,92	190,34	46,80	856	62,62	6,22	8,95	2,37	24,59
C	26	E	5,82	261,10	46,80	755,4	91,09	8,36	10,19	3,14	25,81
B	26	E	5,22	187,36	117,00	1581	119,17	4,99	10,99	5,60	15,92
E	25	K	3,37	234,69	23,40	743,7	70,07	3,59	10,63	3,76	13,24
FG	42	K	2,92	156,14	23,40	898,6	58,90	4,15	10,54	3,48	12,52
GC	41	E	4,87	141,26	140,40	993	81,93	4,99	11,25	3,60	14,24

**Tablo 4.2: Multipl skleroz hastalarında metilprednizolon tedavisi öncesi incelenen kan parametrelerine ait bulgular (n= 20)**

Hasta adı	yaş	cinsiyet	EDSS	MDA nmol/ml	8-izoprostan ng/ml	Konjuge dien µmol/L	Nitrotirozin nM	Nitrit-nitrat µmol/L	Ürik asit mg/dl	TNF pg/ml	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml
YT	24	K	2	2,74	121,90	93,60	993	55,30	4,87	11,34	2,50	16,42
YK	41	K	2,5	5,63	153,25	210,60	810,4	72,23	3,64	10,63	3,46	23,18
GA	26	K	2	6,79	306,39	187,20	288,8	52,79	5,66	10,28	2,24	43,01
NK	30	K	3	6,09	290,48	187,20	391,4	44,80	5,49	10,01	1,98	38,83
HG	38	K	0	7,30	247,55	444,60	336,4	59,22	8,07	9,66	1,67	19,94
SB	49	E	2,5	5,10	400,00	187,20	403,4	72,07	6,84	9,04	2,43	10,27
HA	28	E	1	5,08	200,00	187,20	513,2	72,23	7,86	9,74	2,24	10,76
AÇ	29	K	1	3,66	164,07	234,00	594,4	55,93	4,10	12,67	2,23	17,98
HHÖ	52	E	1	7,57	210,95	374,40	929,2	56,40	7,90	12,58	3,36	16,19
İİ	34	K	2	6,54	234,69	327,60	572,8	70,99	6,06	10,01	3,44	14,78
HŞ	28	K	1,5	6,13	275,40	257,40	441,6	68,20	4,71	10,63	1,91	18,48
NU	32	K	2,5	4,61	181,14	163,80	654	46,21	3,87	9,83	3,60	28,49
HÖ	47	E	3,5	3,77	323,17	234,00	649,2	91,56	6,78	9,04	2,75	27,72
FS	23	E	1	6,56	222,51	187,20	1255	64,48	6,95	10,63	4,29	19,29
BN	22	K	1	7,30	200,00	163,80	525	77,19	4,32	8,41	4,30	23,86
BB	17	K	1,5	6,54	148,60	234,00	1075,4	57,50	4,82	9,30	2,02	20,01
NI	26	K	1	2,92	190,34	210,60	608,6	55,49	3,03	9,48	1,15	12,01
PŞ	34	K	2	2,47	227,67	234,00	1087,6	49,19	3,76	9,21	4,08	13,21
HY	25	E	1	4,71	247,55	187,20	758,6	66,34	4,32	10,90	1,81	13,26
ŞK	23	E	2	3,03	234,69	234,00	907,8	73,31	4,77	8,86	4,11	19,18



**Tablo 4.3: Multipl skleroz hastalarında 5-10 günlük 1g/gün metilprednizolon tedavi sonrası incelenen kan parametrelerine ait bulgular (n= 20)**

Hasta adı	yaş	cinsiyet	EDSS	MDA nmol/ml	8-izoprostan ng/ml	Konjuge dien µmol/L	Nitrotirozin nM	Nitrit-nitrat µmol/L	Ürik asit mg/dl	TNF pg/ml	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml
YT	24	K	2	5,62	259,54	280,80	377	58,35	7,35	11,34	2,10	18,46
YK	41	K	2,5	4,44	190,34	257,40	1322,2	81,62	4,26	8,86	3,22	15,59
GA	26	K	2	7,52	190,34	257,40	779,8	47,39	5,38	10,54	3,50	20,46
NK	30	K	3	4,38	172,39	257,40	1063,2	48,72	4,65	10,54	3,53	21,19
HG	38	K	0	7,59	200,94	257,40	725	37,27	8,07	12,31	2,56	27,93
SB	49	E	2,5	5,70	164,07	210,60	779,8	83,16	8,30	9,83	1,31	18,42
HA	28	E	1	5,90	190,23	327,60	740,2	141,75	8,64	9,57	4,27	13,75
AÇ	29	K	1	3,38	183,25	304,20	396,2	87,01	5,83	10,10	5,80	17,12
HHÖ	52	E	1	5,14	162,48	280,80	334,2	38,17	6,78	9,92	4,33	18,15
İİ	34	K	2	7,38	148,60	327,60	391,4	56,40	5,83	9,30	5,97	20,05
HŞ	28	K	1,5	4,07	156,14	304,20	761,6	65,10	5,66	10,01	1,68	19,72
NU	32	K	2,5	5,28	210,95	327,60	709,8	67,27	4,09	10,36	4,39	36,71
HÖ	47	E	3,5	4,89	171,32	187,20	362,8	68,42	8,92	11,43	3,36	11,57
FS	23	E	1	3,72	181,14	163,80	494	55,18	7,40	11,52	3,19	17,33
BN	22	K	1	4,11	261,10	70,20	355,6	80,85	4,54	11,16	3,35	36,93
BB	17	K	1,5	4,48	110,41	140,40	358	42,61	4,09	9,92	2,29	18,28
NI	26	K	1	2,04	222,51	23,40	491,6	58,59	4,26	9,30	2,64	19,41
PŞ	34	K	2	2,90	186,87	210,60	731	40,57	4,77	9,83	3,71	15,76
HY	25	E	1	4,79	210,95	23,40	489,2	45,43	6,11	11,07	2,31	20,54
ŞK	23	E	2	3,17	153,18	234,00	310,2	30,00	5,16	10,81	3,48	35,20

**Tablo 4.4: Kontrol grubu BOS örneklerinde incelenen biyokimyasal parametrelere ait bulgular (n= 15)**

Hasta adı	yaş	cinsiyet	MDA nmol/ml	8-izoprostan ng/ml	Konjuge dien µmol/L	Nitrotirozin nM	Nitrit-nitrat µmol/L	Ürik asit mg/dl	TNF pg/ml	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml
SB	35	K	1,16	128,09	70,20	477,4	58,12	0,73	9,83	1,86	8,56
KY	27	E	0,76	110,41	46,80	632,4	65,87	0,79	8,77	4,62	13,94
AA	38	K	0,48	121,90	187,20	613,4	54,59	1,85	9,12	6,17	10,61
SK	28	K	0,50	156,14	23,40	322,2	68,42	1,63	8,95	2,48	11,25
CŞ	27	E	0,46	222,51	117,00	467,8	20,92	0,34	10,63	1,15	7,01
HB	23	K	0,52	200,00	93,60	689,8	50,60	0,11	10,36	2,21	6,65
AÖ	33	E	0,51	141,42	46,80	482,2	68,42	0,73	10,18	0,93	7,57
BA	19	K	0,41	181,14	70,20	790	77,61	0,39	10,63	1,37	8,63
İY	26	E	0,43	121,90	163,80	582,4	25,35	0,22	11,87	0,90	12,03
FA	25	E	0,66	64,33	70,20	508,4	63,55	0,39	10,63	0,87	6,44
CT	22	K	1,11	72,97	23,40	374,6	41,20	0,50	10,28	1,41	6,86
Cİ	34	E	0,41	128,09	46,80	644,4	33,90	0,62	11,07	4,28	13,23
DB	29	K	0,56	172,39	163,80	491,6	54,59	0,17	11,69	2,02	6,79
ZA	28	K	0,52	156,14	93,60	782,8	44,49	0,28	12,85	0,95	9,83
ES	32	K	0,43	141,42	46,80	743,70	60,14	0,28	10,18	0,91	9,24

**Tablo 4.5: Multipl skleroz hastalarında metilprednizolon tedavi öncesi incelenen BOS parametrelerine ait bulgular (n= 20)**

Hasta adı	yaş	cinsiyet	EDSS	MDA nmol/ml	8-izoprostan ng/ml	Konjuge dien µmol/L	Nitrotirozin nM	Nitrit-nitrat µmol/L	Ürik asit mg/dl	TNF pg/ml	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml
YT	24	K	2	0,91	148,60	23,40	482,2	103,75	0,67	9,83	0,78	15,97
YK	41	K	2,5	0,62	110,41	140,40	932,2	41,98	0,06	10,10	0,71	10,05
GA	26	K	2	0,52	105,08	210,60	413	51,07	0,11	9,83	1,28	6,29
NK	30	K	3	0,25	181,14	210,60	874,4	102,34	0,22	8,59	3,02	8,56
HG	38	K	0	0,23	210,95	70,20	1032,8	111,45	0,39	8,68	1,53	16,56
SB	49	E	2,5	0,17	210,95	93,60	877,4	88,39	0,62	9,12	0,84	14,02
HA	28	E	1	0,17	141,42	23,40	746,4	93,59	0,34	9,21	2,93	5,80
AÇ	29	K	1	0,23	172,39	210,60	1069,2	52,95	0,28	10,72	1,59	6,72
HHÖ	52	E	1	0,27	181,14	23,40	877,4	157,50	0,73	10,63	1,03	5,02
İİ	34	K	2	0,41	110,41	140,40	1069,2	97,50	0,34	8,59	2,57	5,52
HŞ	28	K	1,5	0,87	153,18	46,80	828,6	68,42	0,17	9,30	1,80	5,66
NU	32	K	2,5	0,60	141,42	23,40	1108,8	72,23	0,67	9,92	1,49	13,73
HÖ	47	E	3,5	0,41	153,18	46,80	1084,4	68,42	0,45	8,95	0,70	7,99
FS	23	E	1	0,46	210,95	23,40	917	92,34	0,28	10,28	3,40	7,21
BN	22	K	1	0,29	164,07	327,60	813,4	100,46	0,28	8,15	1,10	18,28
BB	17	K	1,5	0,89	25,46	280,80	1288,6	72,38	0,62	9,92	2,00	6,44
NI	26	K	1	0,48	164,07	187,20	743,2	172,42	0,67	11,16	1,93	5,52
PŞ	34	K	2	0,31	153,18	46,80	1252	68,42	0,34	10,36	2,37	9,20
HY	25	E	1	0,40	172,39	23,40	764,6	41,51	0,67	9,74	2,15	6,93
ŞK	23	E	2	0,56	88,15	304,20	1383	68,42	0,28	9,12	1,68	5,80

**Tablo 4.6: Metilprednizolon tedavisi öncesi ve sonrasında MS ve kontrol grubunun kan parametrelerinin değerlendirilmesi (ortalama  $\pm$  SD) ve istatistik anlamlılık**

	Kontrol grubu (n=15)	MS grubu (n=20)	
		tedavi öncesi	tedavi sonrası
MDA(nmol/ml)	4,49 1,34	5,23 1,67	4,83 1,51
8-izoprostan (ng/ml)	177,90 55,48 a*	229,02 66,69	186,34 35,87 c*
Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	129,48 78,54 a*** b**	226,98 78,20	222,30 95,27
Nitrotirozin (nM)	933,59 233,33 a*** b***	689,79 276,39	598,64 270,53
Nitrit-nitrat ( $\mu$ mol/L)	76,61 21,68 a*	63,07 11,79	61,69 25,18
Ürik asit (mg/dl)	5,30 1,40	5,39 1,55	6,00 1,61 c*
TNF (pg/ml)	10,45 1,08	10,11 1,14	10,39 0,88
ICAM-1 (ng/ml)	3,25 0,79	2,78 0,97	3,35 1,21
VCAM-1 (ng/ml)	18,53 6,47	20,34 8,69	21,13 7,29

a: Kontrol vs MS hastaları tedavisi öncesi

b: Kontrol vs MS hastaları tedavisi sonrası

c: MS hastaları tedavisi öncesi vs MS hastaları tedavisi sonrası

\*p<0.05

\*\*p<0.01

\*\*\*p<0.001

**Tablo 4.7: MS hastaları ve kontrol grubu BOS parametreleri (ortalama  $\pm$  SD) ve istatistik anlamlılık**

	<b>BOS kontrol grubu (n=15)</b>	<b>MS hastaları tedavi öncesi BOS örnekleri (n=20)</b>
MDA(nmol/ml)	0,59 0,24	0,45 0,23
8-izoprostan (ng/ml)	141,26 42,83	149,93 45,39
Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	84,24 52,17	122,85 104,61
Nitrotirozin (nM)	573,54 142,86 ***	927,89 244,84
Nitrit-nitrat ( $\mu$ mol/L)	52,52 16,50 ***	86,28 34,10
Ürik asit (mg/dl)	0,60 0,51	0,41 0,21
TNF (pg/ml)	10,47 1,11 *	9,61 0,81
ICAM-1 (ng/ml)	2,14 1,62	1,75 0,80
VCAM-1 (ng/ml)	9,24 2,49	9,06 4,23

\*p<0.05

\*\*\*p<0.001

**Tablo 4.8: Kontrol grubunda incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]**

	MDA (nmol/ml)	8- izoprostan (ng/ml)	Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	Nitrotirozin (nM)	Nitrit- nitrat ( $\mu$ mol/L)	Ürik asit (mg/dl)	TNF (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
	r	r	r	r	r	r	r	r
8-izoprostan (ng/ml)	-,147							
Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	,066	-,556*						
Nitrotirozin (nM)	,358	-,209	,156					
Nitrit-nitrat ( $\mu$ mol/L)	,091	-,174	,174	,122				
Ürik asit (mg/dl)	,720	,223	-,040	,217	-,251			
TNF (pg/ml)	,039	,099	-,017	,584*	-,425	,270		
ICAM-1 (ng/ml)	,064	,255	-,182	,671	,347	-,038	,338	
VCAM-1 (ng/ml)	-,057	,333	-,078	-,271	,120	,223	-,168	-,250

\*p<0.05

**Tablo 4.9: MS hastalarında tedavi öncesi incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]**

	YAŞ	EDSS	MDA (nmol/ml)	8- izoprostan (ng/ml)	Konjuge dien (µmol/L)	Nitrotirozin (nM)	Nitrit- nitrat (µmol/L)	Ürik asit (mg/dl)	TNF (pg/ml)	ICAM- 1 (ng/ml)
	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
EDSS	,300									
MDA	,103	-,296								
8-izoprostan (ng/ml)	,444*	,348	,156							
Konjuge dien (µmol/L)	,446*	-,395	,429	,125						
Nitrotirozin (nM)	-,194	-,040	-,269	-,510*	-,152					
Nitrit-nitrat (µmol/L)	,223	,139	,042	,284	,036	-,070				
Ürik asit (mg/dl)	,445*	-,168	,493*	,404	,474*	-,162	,257			
TNF (pg/ml)	,145	-,256	,078	-,329	,134	,158	-,338	,066		
ICAM-1 (ng/ml)	,057	,181	,033	-,141	-,094	,496*	,200	-,038	-,161	
VCAM-1 (ng/ml)	-,092	,435	,305	,198	-,155	-,333	-,231	-,047	-,066	,013

\*p<0.05

**Tablo 4.10: MS hastalarında tedavi sonrası incelenen kan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]**

	YAŞ	EDSS	MDA (nmol/ml)	8- izoprostan (ng/ml)	Konjuge dien (µmol/L)	Nitrotirozin (nM)	Nitrit- nitrat (µmol/L)	Ürik asit (mg/dl)	TNF (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
EDSS	,300									
MDA	,262	-,007								
8-izoprostan (ng/ml)	-,176	-,202	-,036							
Konjuge dien (µmol/L)	,298	,221	,450*	-,263						
Nitrotirozin (nM)	,233	,297	,126	-,005	,271					
Nitrit-nitrat (µmol/L)	,060	,005	,055	,204	,228	,228				
Ürik asit (mg/dl)	,433	-,084	,424	,001	,198	-,171	,309			
TNF (pg/ml)	-,154	-,189	,205	,328	-,180	-,317	-,330	,402		
ICAM-1 (ng/ml)	,078	,007	,093	-,102	,445*	-,166	,173	-,130	-,257	
VCAM-1 (ng/ml)	-,295	-,148	,010	,297	-,068	-,157	-,244	-,398	,325	,033

\*p<0.05



**Tablo 4.11: Kontrol grubunda incelenen BOS parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]**

	MDA (nmol/ml)	8- izoprostan (ng/ml)	Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	Nitrotirozin (nM)	Nitrit- nitrat ( $\mu$ mol/L)	Ürik asit (mg/dl)	TNF (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
	r	r	r	r	r	r	r	r
8-izoprostan (ng/ml)	-,497							
Konjuge dien ( $\mu$ mol/L)	-,317	,252						
Nitrotirozin (nM)	-,448	,232	,160					
Nitrit-nitrat ( $\mu$ mol/L)	,075	-,134	-,370	,086				
Ürik asit (mg/dl)	,028	-,206	-,014	-,345	,307			
TNF (pg/ml)	-,260	,175	,330	,339	-,479	-,689**		
ICAM-1 (ng/ml)	-,041	-,135	,201	,069	,069	,668**	-,519*	
VCAM-1 (ng/ml)	-,213	-,192	-,059	,228	-,063	,397	-,192	,575*

\*p<0.05

\*\*p<0.01

**Tablo 4.12: MS hastalarında incelenen BOS parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları [r]**

	YAŞ	EDSS	MDA (nmol/ml)	8-izoprostan (ng/ml)	Konjuge dien (µmol/L)	Nitrotirozin (nM)	Nitrit-nitrat (µmol/L)	Ürik asit (mg/dl)	TNF (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
EDSS	,300									
MDA	-,438	,169								
8-izoprostan (ng/ml)	,400	-,240	-,589**							
Konjuge dien (µmol/L)	-,431	,014	,045	-,476*						
Nitrotirozin (nM)	,079	,120	-,048	-,280	,212					
Nitrit-nitrat (µmol/L)	,174	-,327	-,207	,340	-,056	-,183				
Ürik asit (mg/dl)	,152	-,117	,059	,118	-,324	,000	,452*			
TNF (pg/ml)	-,020	-,200	,187	-,020	-,208	-,060	,133	,293		
ICAM-1 (ng/ml)	-,445*	-,233	-,185	,062	-,064	,145	,071	-,188	-,011	
VCAM-1 (ng/ml)	,078	-,012	-,064	,330	-,015	-,128	,040	,128	-,394	-,430

\*p<0.05

\*\*p<0.01

## 5. TARTIŞMA

Hidroksil radikali (OH), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) gibi radikaller ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi radikal olmayan reaktif metabolitler, reaktif oksijen metabolitleri (ROM) olarak tanımlanır. Aktif enflamatuvar hücrelerden salınan ROM; demiyelinizasyonda ve akson hasarında önemli rol oynar. ROM'nin antioksidan sistem tarafından yok edilmesi yetersiz kaldığında oksidatif stres oluşur. Bu durum DNA, protein ve lipid gibi hücresel yapıları okside ederek hücre hasarına yol açar [129]. Kanser, yaşlanma, diabet ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde oksidatif stresin etkili olduğu bildirilmiştir [130,131].

Enflamasyon, serbest radikal oluşumunun arttığı en önemli patofizyolojik olaylardan biridir. Enflamasyonda polimorf nüveli nötrofiller; sitokinler ve komplemanlar (C3,C4) aracılığıyla uyarılarak,  $O_2^-$  ve diğer radikalleri serbestleştirir ve oksidatif stres artışına yol açarlar [131].

MS; SSS'nin çeşitli bölgelerinde, kronik enflamasyon, demiyelinizasyon ve sklerozisle karakterize ataklarla seyreden kronik bir hastalıktır. MS'te SSS'nde en sık görülen patoloji miyelin hasarıdır. Oligodendrositler ve miyelin kılıf oksidatif hasara karşı özellikle hassastır. MS'in patogeneğinde immun sistemin kontrolü ve oligodendrositlerin serbest radikal üretimi önemlidir. Miyelin yıkılımı başladığında miyelin kılıfta yoğun olarak bulunan demir iyonları açığa çıkar. Hidroksil radikali oluşumu için gerekli öncü maddeler sağlanmış olur. Miyelin lipidleri hidroksil radikaline karşı dayanıksızdır ve çeşitli lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkar [132].

MS lezyonlarında yoğun olarak bulunan makrofajlar; enflamasyonun alevlenmesi sırasında proenflamatuvar sitokinler, serbest radikaller, glutamat, matriks metaloproteinazlar gibi medyatörler salgılayarak oligodendrosit ve akson hasarına neden olabilirler. Ayrıca aktif makrofajlar kan beyin bariyerini bozar, monosit göçü ve infiltrasyonu ile enflamasyon daha da şiddetlenir. Makrofajlar özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi sitokinleri salgırlar. İn vitro çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın nörotoksik olduğu ve özellikle oligodendrosit ölümüyle gelişen demiyelinize alanlarda akson hasarı yaptığı tespit edilmiştir.

Enflamasyonda artan serbest radikallerin etkisiyle oluşan oksidatif hasarın en önemli belirtisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyon ürünlerinin düzeyleri nötrofil aracılı enflamatuvar hasarın şiddetini yansıtır. Kontrol altına alınmadığında primer olarak membrana bağlı doymamış yağ asitleri, DNA ve proteinler olmak üzere farklı hücre bileşenlerini etkileyerek hasara neden olabilir [63-133].

Lipid peroksidasyonunu ölçmede en geçerli yöntemler, primer peroksidasyon ürünlerinin analizidir. Bu amaçla en sık kullanılan parametreler MDA ve konjuge diendir [134]. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA oluşur. MDA'nın tiyobarbitürik asitle reaksiyonlaşan maddeler (TBARS) ile ölçümünün lipid peroksidasyonunu gerçek seviyesinden düşük olarak yansıttığı ve lipid peroksidasyonunun zayıf bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür [135,136]. Buna karşılık konjuge dien; lipid peroksidasyonunun erken dönemine ait bir gösterge olarak doku homojenatlarında ve hücre alt fraksiyonlarında ROM oluşumunu yansıtan iyi bir belirteçtir [134,137]. Bu nedenle lipid peroksidasyon düzeyini belirlerken karşılaştırma yapabilmek için her iki yöntemle de çalışmayı uygun bulduk.

8-izoprostanlar; serbest radikallerin uyardığı, araşidonik asit gibi poliansatüre yağ asitlerinin nonenzimatik peroksidasyonu ile oluşan ürünlerdir [103]. İzoprostanların in vitro ve in vivo lipid peroksidasyonunun hassas ve spesifik belirteci olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. 8-izoprostan ölçümü demiyelinizan hastalıklarda lipid peroksidasyon belirteci olarak ve antioksidan tedavilerin etkinliğinin takibinde önerilmektedir.

Çalışmamızda serum 8-izoprostan ve konjuge dien düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$  sırasıyla). 5-10 günlük yüksek doz (1000mg/gün) metilprednizolon tedavisi sonrasında 8-izoprostan düzeyleri tedavi öncesine göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,05$ ). Konjuge dien düzeylerinde ise tedavi sonrasında anlamlı bir düşme saptanmadı, değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek kaldı ( $p<0,01$ ). Serum MDA düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre yüksek saptandı, ancak istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildi. MS hastalarının BOS 8-izoprostan ve konjuge dien düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır.

MS hastalarında lipid peroksidasyon göstergelerine ilişkin sonuçlar birbiriyle uyumlu değildir. Naidoo ve ark. [138], MS hastalarında serum MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptarken, BOS bulgularında farklılık gözlememişlerdir. Hunter ve ark. [139] ise BOS MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptarken, serum MDA düzeylerinde anlamlı fark olmadığını bildirmiştir. Keles ve ark. [140], serum ve BOS MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmışlardır ve kortikosteroid tedavi sonrasında değerlerde düşme olduğunu belirtmişlerdir.

MS hastalarının serum örneklerinde konjuge dien düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanmıştır. Ancak sonuçlar MS alt grupları arasında ve antioksidan parametrelerle korelasyon göstermemektedir [141-143]

Greco ve ark. [144], RRMS hastalarının BOS örneklerinde 8-epi PGF2 $\alpha$  düzeylerinde kontrol grubuna göre 8-9 kat yükselme, steroid tedavisi sonrasında ise anlamlı azalma saptamışlardır. Sonuçların lezyon aktivitesinin MRG bulguları ve relaps sıklığı ile uyumlu olmaması 8-izoprostanların enflamatuvar belirteç olarak kullanılamayacağını, ancak akson hasarıyla ilişkili olabileceğini gösterir. 8-izoprostan düzeyleri ile sekel kalma derecesi arasında korelasyon bulunması dejeneratif fenomenin göstergesi olabileceğini düşündürür.

MS hastalarının sağlıklı kardeşlerinde yüksek 8-izoprostan düzeyleri oksidatif stres artışını ve klinik bulgu vermeden MS gelişme ihtimalini göstermektedir. Bu kişilerde 8 yıl süresince MS gelişmemesi oksidatif stresin potansiyel pozitif etkileriyle, peroksidasyonun immun sistem modülasyonuna neden olabileceğini gösterir [145]

Enflamasyonda NO'nun rolü iki taraflıdır. Bir taraftan antibakteriyel, antiparazitik antiviral ve tümörisidal ajan olarak etki gösterirken, diğer taraftan peroksinitrit oluşumu ile oligodendrositler ve nöronlar üzerine sitotoksik etki yapar ve DNA hasarına yol açar [146]. NO'nun in vivo yarı ömrü çok kısa olduğundan doğrudan ölçümü son derece zordur. Endojen nitratın başlıca kaynağının NO olduğu bildirilmiştir. NO; moleküler O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve oksijene hemoglobin ile okside olarak hızla nitrite, sonra da nitrata dönüşür [147,148]. Bu nedenle NO düzeyi, serum ve BOS'ta nitrit-nitrat (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) düzeylerinin ölçümü ile belirlenir.

Çalışmamızda serum NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük (p<0,05), BOS örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0,001).

MS hastalarının serum NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeylerine ilişkin sonuçlar çelişki göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak de Bustos ve ark. [149] düşük serum NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeyleri, Nazheli ve ark. [150] ve Gionvannoni ve ark. [151] ise yüksek serum NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeyleri bildirmişlerdir. MS hastalarının BOS örneklerinde NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeylerinde bulgularımızla uyumlu olarak artış bulunmuştur [151-155].

Danilov ve ark. [146], BOS'ta nitrit düzeylerini MS hastalarının remisyon döneminde düşük, progresyon döneminde artmış ve atak dönemde en yüksek olarak tespit etmişlerdir. BOS nitrat değerlerinde ise anlamlı fark bulunmamıştır. BOS'nun; nitritin nitrata okside olduğu oksijen içeren aköz bir çözeltiye benzediğini ve nitritin hasarlanmış kan-beyin bariyerinden pasif olarak sızmasının mümkün olmadığı sonucuna varmışlardır.

Yuceyar ve ark. [156], BOS NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> düzeylerinin, serum düzeylerine göre çok daha fazla artış gösterdiğini saptamışlardır. BOS ile serum değerleri arasında korelasyon bulunmaması nedeniyle bu değerlerin birbirinden bağımsız olduğunu belirtmişlerdir.

Yamashita ve ark. [154], metilprednizolon tedavisi sonrasında BOS  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  düzeylerinde azalma saptamışlardır. Atak döneminde salınan sitokinlerin iNOS'ı aktifleyerek NO artışına yol açtığı belirtilmiştir. BOS  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasında korelasyon tespit etmişlerdir.

$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ile ilişkili çelişkili sonuçlar; ölçümde farklı tekniklerin kullanılmasına, hastanın diyetine, gastrointestinal bakterilerin etkisine, farmakoterapinin etkileşimine ve endotel kaynaklı NO'ye bağlıdır [156]. Kandaki arginin miktarı ve diyetdeki nitrojen;  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  düzeylerinde değişime yol açtığı için BOS değerlerinin ölçümü daha güvenlidir [154]. BOS  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  düzeylerinin hastalık aktivitesini ve tedavi etkinliğini yansıtan iyi bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

NO; süperoksit anyonu ile birleşerek peroksinitrit oluşumuna yol açar. Peroksinitrit mitokondri disfonksiyonuna ve miyelin yıkılımına yol açar [157]. Peroksinitritin proteinlerle etkileşiminin ana ürünü tirozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da nitrotirozin oluşumuna yol açar. Nitrotirozin; peroksinitrit oksidasyonunun stabil son ürünü olarak NO-bağımlı in vivo hasarın belirtecidir.

Çalışmamızda serum nitrotirozin düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi ve tedavi sonrası grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p<0,001$ ), BOS örneklerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,001$ ).

Calabrese ve ark. [158], Western blot yöntemi ile BOS nitrotirozin, total NOS aktivitesi,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ve peroksinitrit düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek olarak saptamışlardır. Kan-beyin bariyerinin semipermeabl bir membran olduğu göz önüne alınarak SSS dokularından BOS'a iNOS, nitrotirozin gibi maddelerin geçişinin mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Sağlıklı kişilerde BOS ve plazma örneklerinde serbest ve proteine bağlı nitrotirozin tespit edilmesi fizyolojik koşullarda da tirozin nitrasyonunun ve nitrotirozin oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir [159].

Oleszac ve ark. [157], SSS doku örneklerinde nitrotirozin ve nitrit/nitrat düzeylerini yüksek olarak saptamışlardır. NO ve reaktif metabolitlerinin astrositler ve monosit/makrofajlar tarafından salınarak akut MS ataklarında demiyelinizasyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Ürik asitin normal düzeylerde toksik reaktanları temizlediği ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Suda çözünen bir antioksidan olduğundan radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonunu önlemede etkilidir. Hidroksil radikali inaktivasyonu ve askorbik asit stabilizasyonu ile antioksidan etki gösterir.

Çalışmamızda serum ürik asit düzeyi MS hastalarının tedavi sonrası grubunda, tedavi öncesi grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,05$ ).

Sonuçlarımızla uyumlu olarak; MS hastalarında yüksek doz metilprednizolon ve immunomodülatuar tedavi sonrasında serum ürik asit düzeylerinde yükselme olduğu tespit edilmiştir [160-162]. Bulgularımızdan farklı olarak MS hastalarının serum ürik asit düzeyleri kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır [160-166]. Ürik asit düzeyleri özellikle atak dönemlerinde remisyon dönemlerine göre düşük olarak tespit edilmiştir [161,162,166] Serum ürik asit düzeyleri ile hastalık aktivitesi, atak dönemi ve tedavi etkinliği arasında korelasyon bildirilmiştir [161,166]

Hooper ve ark. [163], deneysel hayvan modelinde ürik asit verildiğinde EAE başlamasının geciktiğini, klinik semptomların azaldığını ve enflamatuvar hücrelerin SSS'ne invazyonunun engellendiğini gözlemişlerdir. Ürik asitin kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü korumada önemli olduğunu belirtmişlerdir. Antioksidan kapasitenin azalması ile beraber ürik asit tüketiminin artışı MS gelişimi açısından bireysel yatkınlık oluşturabilir.

Hücre adezyon molekülleri; özellikle lökositlerin, birbirlerine, endotel hücrelerine ve ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridir. Lökositlerin yapışmasında, göçünde, immün ve enflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda önemli role sahiptir. Tümör nekrozis faktör; doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu, farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip polipeptid yapıda bir sitokindir. TNF $\alpha$  akut enflamasyonda rol oynayan en önemli sitokindir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisi yönetir.

Çalışmamızda MS hastalarının serum ICAM-1, VCAM-1 ve TNF düzeyleri tedavi öncesi ve sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. BOS örneklerinde TNF düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,05$ ). ICAM-1 ve VCAM-1 değerlerinde ise anlamlı farklılık bulunamadı.

MS hastalarında serum adezyon moleküllerinin düzeyleri çelişki göstermektedir. Serum ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmeyen[167-169] ve yüksek sonuçlar elde edilen çalışmalar vardır [170-176]. Elovaara ve ark., RRMS grubunda serum adezyon moleküllerini anlamlı düşük saptamışlardır [177].

MS hastalarının BOS ICAM-1 ve VCAM-1 düzeyleri yüksek olarak saptanmıştır. BOS değerlerinin serum değerlerine oranla hastalık aktivitesiyle daha uyumlu olduğu belirtilmiştir [167,168,171,178].

Gelati ve ark. [179], Franciotta ve ark. [180], metilprednizolon tedavisi sonrasında serum ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunda azalma gözlemişlerdir.

Adezyon moleküllerine ilişkin çelişkili sonuçlar farklı metodların kullanılmasına, örnek toplama zamanına ve hastaların takip zamanının kısa olmasına bağlıdır [179,181] Klinik hasta grubunun dikkatli seçimi, iki örnek alınması arasında en az ataksız 2 ay olması, hasta sayısının artırılması ve teknikler arasında uyum sağlanması sonuçların doğruluğunu arttıracaktır [182].

ICAM-1 düzeyi yüksek saptanırken adezyon moleküllerinin yüzey ekspresyonunun azalması, adezyon moleküllerinin enflamatuvar hücre infiltrasyonunu sınırlandıran feedback inhibitör etki yapabileceğini düşündürür [182]

Sharief ve ark. [170], Alves-Leon ve ark. [176], TNF düzeylerini serum ve BOS örneklerinde yüksek saptamışlar, Ukkonen ve ark. [183], ise anlamlı farklılık olmadığını bildirmişler.

TNF 'nın proteazlara karşı dayanıksız olması, dolaşımdaki doğal inhibitörler ve lipopolisakkaritten arındırılmamış örnek tüplerinde ex vivo TNF oluşumu serum düzeylerinin doğru değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır [181].

Çalışmamızda MS'te serum ve BOS örneklerinde 8-izoprostan ve konjuge dien düzeylerinde artış lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Tedavi sonrası grupta 8-izoprostan düzeylerinin tedavi öncesi gruba göre düşük bulunması metilprednizolon tedavisinin oksidatif stresi azaltmak yönünde etkili olduğunu göstermektedir. MS hastalarının BOS  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ve nitrotirozin düzeylerinin yüksek saptanması enflamasyon ortamında iNOS aktivasyonu nedeniyle NO yapımında ve dolayısıyla peroksinitrit ve nitrotirozin oluşumunda artış olduğunu gösterir.

İnflamasyon belirteçleri olarak incelediğimiz ICAM-1, VCAM-1 ve TNF düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmemesi RRMS hastalarında atak döneminde enflamatuvar etkilerden çok nörodejeneratif olayların ön planda olduğunu düşündürmektedir.

Oksidan/antioksidan dengenin bozulması MS lezyonlarının temel nedenlerinden biri olduğundan özellikle ataklar sırasında peroksinitrit tutucularının, iNOS spesifik inhibitörlerinin ve antioksidanların kullanılmasını önermekteyiz. Ürik asit gibi antioksidanlar akson hasarının önlenmesinde ve nöronların korunmasında etkili olduklarından yeni tedavi protokollerinde yer alabileceklerini düşünmekteyiz.



## 6. ÖZET

Çalışmamızda Multipl Skleroz (MS) hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda lipid peroksidasyon göstergeleri olarak malondialdehid (MDA), konjuge dien ve 8-izoprostan düzeyleri, nitrozatif stres göstergesi olarak nitrit-nitrat ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) ve nitrotirozin düzeyleri, peroksinitrit tutucusu olarak ürik asid; ayrıca enflamatuvar belirteçler olarak TNF , ICAM-1 ve VCAM-1 düzeyleri ölçüldü.

McDonald kriterlerine göre Relapsing Remitting MS (RRMS) tanısı alan ve 5-10 günlük yüksek doz (1000mg/gün) metilprednizolon(MP) tedavisi uygulanan 20 hasta ( E/K: 7/13, yaş:31 ± 9,6) ve 15 sağlıklı birey ( E/K: 5/10, yaş:30,2 ± 5,51) çalışmaya dahil edildi. Nörodejeneratif hastalığı olmayan 15 hastadan (E/K: 6/9, yaş:28,33 ± 5,31) alınan BOS örnekleri kontrol grubunu oluşturdu.

Serum 8-izoprostan ve konjuge dien düzeyleri MS hastalarının tedavi öncesi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$  sırasıyla). MP tedavisi sonrasında 8-izoprostan düzeyleri tedavi öncesine göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).

MS hastalarının tedavi öncesi grubunda serum  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p<0,05$ ), BOS örneklerinde ise anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p<0,001$ ). Kontrol grubuna göre; MS hastalarının tedavi öncesi ve sonrası döneminde nitrotirozin düzeyleri serumda anlamlı derecede düşük ( $p<0,001$ ), BOS'ta ise yüksek saptandı ( $p<0,001$ ).

MS hastalarının BOS örneklerinde TNF düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p<0,05$ ) saptandı.

MS hastalarında serum ve BOS örneklerinde 8-izoprostan ve konjuge dien düzeylerindeki artış lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Tedavi sonrasında 8-izoprostan düzeylerindeki anlamlı düşme MP tedavisinin oksidatif stresi azaltmadaki etkisini göstermektedir. BOS  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ve nitrotirozin düzeylerinin yüksek saptanması enflamasyon ortamında iNOS aktivasyonu ile NO, peroksinitrit ve nitrotirozin artışını gösterir.

Enflamatuvar belirteçlerde anlamlı farklılık gözlenmemesi RRMS hastalarının atak döneminde nörodejeneratif olayların hakimiyetini düşündürmektedir.

## 7. SUMMARY

In this study, we examined malondialdehyde (MDA), conjugated diene and 8-isoprostane levels as markers of lipid peroxidation, nitrite-nitrate ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) and nitrotyrosine levels as nitrosative stress markers and uric acid as a peroxynitrite scavenger. TNF, ICAM-1 and VCAM-1 were also analysed as inflammation markers in MS patients and healthy control group.

Relapsing and Remitting MS (RRMS) patients (M/F:7/13, age:  $31 \pm 9,6$ ), diagnosed on the basis of Mc Donald's Diagnostic Criteria, were included in the study. All patients received methylprednisolone (MP) 1000 mg/day for 5-10 days. 15 healthy aged matched individuals (M/F:5/10, age:  $30,2 \pm 5,51$ ) formed the control group. 15 patients (M/F:6/9, age:  $28,33 \pm 5,31$ ), without a neurodegenerative disease formed the control group for CSF analysis.

There were statistically significant increases in serum 8-isoprostane and conjugated diene levels in MS patients before therapy in comparison to control group. 8-isoprostane levels were significantly decreased after MP therapy ( $p < 0.05$ ).

In pre-therapy MS group; significantly decreased serum and CSF  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  levels ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ) were observed compared to control group. In pre- and post-therapy MS groups nitrotyrosine levels were significantly decreased in serum ( $p < 0,001$ ), whereas increased ( $p < 0,001$ ) in CSF compared to control group. Serum uric acid levels were significantly increased after therapy ( $p < 0.05$ ). There was a significant decrease in CSF TNF levels in MS patients compared to control group.

Increased 8-isoprostane and conjugated diene levels in MS patients both in serum and in CSF reflect increased lipid peroxidation and oxidative stress. Significantly decreased 8-isoprostane levels in post-therapy MS patients indicate effectiveness of MP therapy in the relief of oxidative stress.

High CSF  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and nitrotyrosine levels reflect increased NO, peroxynitrite and nitrotyrosine production due to iNOS activation,. No significant changes in inflammatory markers may indicate the dominance of neurodegenerative events during acute attack in RRMS patients.

## 8. KAYNAKLAR

- [1] Siva A. The spectrum of multiple sclerosis and treatment decisions. Clin Neurol Neurosurg. 2006; 108: 333-338.
- [2] Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, et al. MRI in the diagnosis of MS:A prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding and CT. Neurology. 1988, 38: 180-185.
- [3] Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R et al. Assessment of MRI criteria for diagnosis of MS. Neurology. 1993; 43: 2625-2631.
- [4] Victor M, Ropper H. A. Adams and Victor's Principles of Neurology. 7th Edition, Mc Graw-Hill, New York. 2001; 954-979.
- [5] İdiman E. Multipl Skleroz'un İmmunopatogenezi. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi. 2004; 2: 171-176.
- [6] Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. Multiple Sclerosis in Clinical Practice. Martin Dunitz press, UK, 2003; 1-15.
- [7] Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. J. Exp. Med. 1993; 58: 39-53.
- [8] Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathological cerebrospinal fluid by immunochemical methods. Am.J.Med. 1948; 4: 653-662.
- [9] Kabat EA, Freedman DA, Murray JP et al. A study of the crystalline albumine, gamma globulin and the total protein in the cerebrospinal fluid of one 68 hundred cases of multiple sclerosis and other diseases. Am. J. Med. Sci. 1950; 219: 55- 64.
- [10] Tunalı G. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi Multipl Skleroz Özel Sayısı. Cilt:2, Sayı:3, 2004; 205-209.

- [11] Azzimondi G, Stracciari A, Rinaldi R, et al. Multiple sklerosis with very late onset: report of six cases and review of literature. *Eur Neurol.* 1994; 34: 332.
- [12] Rowland PL. Meritt's Textbook of Neurology. Tenth Edition, Section XIX., Chapter 133: 773-792.
- [13] Zivadinov R, Iona L, Monti Bragadin L et al. The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on Multiple Sclerosis. *Neuroepidemiology.* 2003; 22: 65-67.
- [14] Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983; 33: 1444-1452.
- [15] Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. Multiple Sclerosis in Clinical Practice. Martin Dunitz press, UK. 2003; 31-35.
- [16] Eraksoy M. Multipl skleroz'un genetiđi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi.* 2004; 2: 166-170.
- [17] Warren KG, Catz I, Johnson E et al. Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of MS. *Ann Neurol.* 1994; 35: 280.
- [18] Gilroy J. Basic Neurology Çeviri ed: Rana Karabudak. 3.baskı, Güneş Yayınevi. Ankara. 2002; 199-219.
- [19] Sav A. Multipl Skleroz'un Patolojik Bulguları. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Multipl Skleroz Özel Sayısı, Cilt:2, Sayı:3, 2004; 177-182.*
- [20] Ellison D, Love S, Chimelli L et al. Multiple Sclerosis In Neuropathology. A reference text of CNS Pathology. 2nd edition. Chapter 19. Mosby, Edinburgh, 2004.
- [21] Altıntaş A, Benbir G. Miyelinizasyon, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon mekanizmaları. *Türk Nöroloji Dergisi* 2005; cilt:11 sayı:2 sayfa:123-130.

- [22] Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 1998; 18: 601-609.
- [23] Benjamins JA. Molecular structure of the myelinated axon; Multiple sclerosis: immunology, pathology and pathophysiology. Demos Medical Publishing, New York. 2003; 31-50.
- [24] Lefebvre S, Vartanian T. Molecular basis of myelination; disorders of myelin in the central and peripheral nervous system. Woburn MA, Butterworth Heinemann. 2002; 49-56.
- [25] Edgar JM, Garbern J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res*. 2004; 76: 593-598.
- [26] Imitola J, Makhlouf K, Khoury SJ. Role of neural stem and oligodendrocyte progenitor cells in demyelinating diseases: insights into disease mechanisms and therapeutic potential; Disorders of myelin in the central and peripheral nervous system. (Dangond F., eds) Woburn MA, Butterworth Heinemann. 2002; 57-81.
- [27] Lucchinetti C, Brück W, Noseworthy J. Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging, and treatment. *Curr Opin Neurol*. 2001; 14: 259-269.
- [28] Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C. Remyelination in multiple sclerosis. *J Neuro Sci* 2003; 206: 181-185.
- [29] Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001; 7: 116-121.
- [30] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis, *Lancet*. 2002; 359: 1221-1231.
- [31] Giulini F, Yong VW. Immune-mediated Neurodegeneration and Neuroprotection in MS. *The International MS Journal*. 2003; 10.

- [32] Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. Epidemiology and genetics. Multiple Sclerosis in Clinical Practise. London-New York. Martin Dunitz Publishing. 2003; 31-53.
- [33] Kurne A, Karabudak R, Aydın ÖF. Multipl skleroz patogenezinde basamaklar-1: Nöroenflamasyondan nörodejenerasyona. Türk Nöroloji Dergisi 2006; cilt:12 sayı:1 sayfa:5-13.
- [34] Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. Trends Neurosci 1988; 11:273-277.
- [35] Piehl F, Lidman O. Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. Immunol Rev. 2001; 184: 212-225.
- [36] Bezzi P, Domercq M, Brambilla L et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat Neurosci. 2001; 4: 702-710.
- [37] Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T. Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. Neurosci Lett. 2001; 307: 171-174.
- [38] Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature. 2000; 403: 316-321.
- [39] Martino G, Adorini L, Rieckmann P et al. Inflammation in multiple sclerosis:the good, the bad, and the complex. Lancet Neurology. 2002; 1: 499-509.
- [40] Martino G. How the brain repairs itself: new therapeutic strategies in inflammatory and degenerative CNS disorders. Lancet Neurology 2004; 3: 372-378.
- [41] Lucchinetti CF, Bruc W, Rodriguez M et al. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicate heterogeneity on pathogenesis. Brain pathol. 1996; 6: 259-274.
- [42] Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M et al. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. Brain Res Rev. 2005; 48: 16-42.

- [43] Anthony DC, Miller KM, Chandler S, Gearing AJ, Perry VH. Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol.* 1998; 87: 62-72.
- [44] Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999; 189: 865-870.
- [45] Kotter MR, Setzu A, Sim FJ et al. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia.* 2001; 35: 204-212.
- [46] Arnett HA, Mason J, Marino M et al. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination . *Nat Neurosci.* 2001; 4: 1116-1122.
- [47] Bieber AJ, Warrington A, Asakura K et al. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice. *Glia.* 2002; 37: 241-249.
- [48] Serafini M, Baynes JW Del Rio D. Role of oxidative stress in development of Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report.* 2004; 9: 145-52.
- [49] Deby C, Pincemail J. Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökän (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer-Verlag, Berlin pp1988; 57-70.
- [50] Murray RK. Harper's Biochemistry 23 th ed. Appleton and Lange. 1990; 13: 110-115.
- [51] Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995; 3-10.
- [52] Kehre J P, Smith J V. Free radicals in biology: Sources, reactivites and roles in etiology of human diseases; İn Frei B(ed): Natural Antioxidants İn Human Health and Disease. San Diego: Academic Pres, 1994: 25-62.

[53] Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.*1993; 23: 21-48.

[54] Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.

[55] Harman D. Free radicals in aging. *Mol Cell Biochem.* 1988; 84: 155-161.

[56] Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819-1828.

[57] Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-503.

[58] Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: Reactive nitrogen species, reactive oxygen species transition metal ions and the vascular system. *Pharm Res.* 1996; 13: 649-662.

[59] Davies MG, Fulton GJ, Happens PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1995; 82: 1598-1610.

[60] Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 1998; 11: 336-341.

[61] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Oxford University Press, 1999.

[62] Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayiroğlu F. Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Sağlık. Bil. Derg* 1995; 2: 137-142.



- [63] Cighetti G, Paroni R, Marzorati S et al. Evaluation of Oxidative Stress in Serum of Critically Ill Patients by a Commercial Assay and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Clinchem*. 2005; 51: 1515-1517.
- [64] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Res*. 1996; 25: 57-74.
- [65] Nakazawa H, Genka J, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996; 46: 15-32.
- [66] Tunalı G. *Epidemiyoloji. Turkiye Klinikleri Noroloji Dergisi*.2004; 2:161-165.
- [67] McDonald WI, Compston A, Edan G et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001; 50: 121-127.
- [68] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M et al. Multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2000; 343: 938-52.
- [69] Traoulosee A, Li D, Frank J et al. Consortium of MS centers MRI protocol for the diagnosis and follow-up of MS. Consortium of multiple sclerosis centers. 2003.
- [70] Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. *Multiple Sclerosis in Clinical Practice*. Martin Dunitz Press, UK; 2003: 1-15.
- [71] Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta augments suppressor cell function in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990; 27: 207-210.
- [72] Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology*. 1998; 50: 701-108.
- [73] Hartung H.P. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Frontiers in multiple sclerosis Clinical Research and therapy*. Ed by O Abramsky, H Ovadia. London 1997; 45-59.

- [74] Brex P, Ciccarelli O, O'Riordan JI et al. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Eng J Med.* 2002; 346: 158-64.
- [75] Frenete PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part 2. *N Engl J Med.* 1996; 335: 43-5.
- [76] Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B et al. Soluble and cell surface ICAM-3 in blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: influence of methylprednisolone treatment and relevance as markers for disease activity. *Acta Neurol Scand.* 2000; 101: 135-139.
- [77] Bienvenu J. Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil.* 1995; 189: 45-55.
- [78] Takabayashi T, Vannier E, Clark BD. A new biologic role for C 3a and C3a des Arg: Regulation of TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  synthesis. *J Immunol.* 1996; 156: 570-583.
- [79] Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC et al. Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68: 495-510.
- [80] Park EJ, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American J Surgery.* 2004; 187: 11-16.
- [81] Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M. Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 ra but down-regulates ex vivo TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  production. *J Appl Physiol.* 1995; 79: 1497-1503.
- [82] Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 regulation of TNF- $\alpha$  from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax.* 1996; 51: 143-149.
- [83] Yagi K. Lipid Peroxides and Human Diseases. *Chem. and Phy of Lipids.* 1987; 45: 337-351.

- [84] Slater TF. Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation Methods in Enzymology. 1984; 105: 283-293.
- [85] Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM et al. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. Ulus Travma Dergisi. 1994; 10: 149-159.
- [86] Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine. 1995; 210: 93-101.
- [87] Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. Osteoarthritis and Cartilage. 2003; 11: 747-755.
- [88] Jang D, Murrell GA. Nitric oxide in arthritis. Free Radic Biol Med. 1998; 24: 1511-1519.
- [89] Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005; 4: 471- 479.
- [90] Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed in synovial fluid granulocytes. Clin Exp Immunol. 2002; 130: 150-155.
- [91] Veihelmann A, Hofbauer A, Krombach F. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. Rheumatology. 2002; 41: 509-517.
- [92] Garvey EP, Furfine ES, Shernian PA et al. Purification and inhibitor screening of human nitric oxide synthase isoenzymes. Methods Enzymol. 1996; 268: 339-349.
- [93] Mabley JG, Liaudet L, Pacher P. Part II: beneficial effects of the peroxynitrite decomposition catalyst FP15 in murine models of arthritis and colitis. Molecular Medicine. 2002; 8: 581-590.
- [94] Mazzetti I, Grigolo B, Pulsatelli L et al. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Clinical Science.

2001; 101: 593-599.

[95] Grabowski PS, Wright PK, Van't Hof RJ et al. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheum.* 1993; 36: 651-655.

[96] Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J et al. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992; 258: 1898-1902.

[97] Moncada S, Higgs A. The L-arginine pathway. *N Eng J Med.* 1993; 329: 2002-2012.

[98] Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet Oncology.* 2001; 2: 149-156.

[99] Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite subsequent biological effects. *Nitric Oxide.* 1997; 1: 373-385.

[100] Bredt TS, Snyder SH. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* 1994; 63: 175-195.

[101] Brenman JE, Bredt TS. Synaptic signalling by nitric oxide. *Current Opinion in Neurobiology.* 1997; 7: 374-378.

[102] Matthew BG, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 1999; 276:315-321.

[103] Morrow JD, Hill KE, Burk R et al. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 9383-9387.

[104] Morrow JD, Awad JA, Wu A et al. Nonenzymatic free radical, catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23185-23190.

- [105] Harrison KA, Murphy RC. Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 17273-17278,.
- [106] Morrow JD, Awad JA, Boss HJ et al. Non-cyclooxygenase derived prostanoids ( $F_2$ -isoprostanes) are formed in situ in phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 10721-10725.
- [107] Pratico D, Rossi E, Merli M et al. Portal levels of the isoprostane  $iPF_{2\alpha}$ -III, a marker of lipid peroxidation, do not correlate with increased portal pressure in cirrhoric patients. *J. Invest. Med.* 1998; 46: 430-434.
- [108] Mallat Z, Nakamura T, Ohan J et al. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and  $F_2$ -isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 421-427.
- [109] Pratico D, Lee VMY, Trojanowski JQ et al. Increased  $F_2$ -isoprostanes in Alzheimer's disease: Evidence of enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J.* 1998; 12: 1777-1783.
- [110] Montine TJ, Beal MF, Cudcowick ME et al. Increased CSF  $F_2$ -isoprostanes concentration in probable AD. *Neurology.* 1998; 52: 562-565.
- [111] Reilly MP, Pratico D, Delanty N et al. Increased formation of distinct  $F_2$ -isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998; 98: 2822-2828.
- [112] Pratico D, Delanty N. Oxidative injury in the central nervous system-focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 2000; 109: 577-585.
- [113] Basu S, Whiteman M, Matthey DL et al. Raised level of  $F_2$ -isoprostanes and prostaglandin  $F_2a$  in different rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60: 627-631.

- [114] Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 385-391.
- [115] Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 2000; 319: 428-436.
- [116] Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899: 191-208.
- [117] Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 392-403.
- [118] Gow AJ, Duran D, Malcolm S et al. Effect of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 1996; 385: 63-66.
- [119] Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. *FEBS Lett.* 1995; 364: 279-282.
- [120] Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. *FEBS Lett.* 1997; 411: 157-160.
- [121] Ter Steege JCA, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA et al. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 953-963.
- [122] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20313-20316.
- [123] Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 1996; 6: 79-88.
- [124] Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. *Nutr. Metab.* 2004; 1: 1-10.

[125] Yardım Z, Sargin H, Torun M, et al. Serum Beta Karoten Düzeyleri ve Kardiyovasküler Hastalıklar. *Biokimya Dergisi Özel Sayı*. 1992; C: 65.

[126] Candan F, Işık N, Cantürk İ A et al. Multipl Skleroz ve Endojen Antioksidan Serum Ürik Asit Arasındaki İlişki. *Türk Nöroloji Dergisi* 2007; 13: 409-414.

[127] Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Method in Enzymology*. 1984; 105: 283-293.

[128] Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*. 1993; 214: 11-16.

[129] Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2006; 253: 483-487.

[130] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 20313-20316.

[131] Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18: 872-879.

[132] LeVine SM. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 1992; 39: 271-274.

[133] Masotti L, Casali E, Gesmundo N et al. Lipid peroxidation in cancer cells. Chemical and physical studies. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1998; 551: 47-57.

[134] Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990; 15: 129-135.

[135] Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation

of Fe<sup>+2</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an idiometric method. *Lipids*, 1991; 26: 853-856.

:

[136] Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S et al. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*. 1995; 44: 1054-1058.

[137] Cramer GL, Miller JF, Pendleton RB et al. Iodometric measurement of lipid hydroperoxides in human plasma. *Analytical Biochemistry*. 1991; 193: 204-211.

[138] Naidoo R, Knapp ML. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clin Chem*. 1992; 38: 2449-2454.

[139] Hunter MI, Nlemadim BC, Davidson DL. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochem Res*. 1985; 10: 1645-1652.

[140] Keles MS, Taysi S, Sen N et al. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 2001; 28: 141-3.

[141] Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2006; 253: 483-487.

[142] Ramsaransing GS, Fokkema MR, Teelken A et al. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77: 189-192.

[143] Koch M, Mostert J, Arutjunyan A et al. Peripheral blood leukocyte NO production and oxidative stress in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008; 14: 159-165.

[144] Greco A, Minghetti L, Puopolo M et al. Cerebrospinal fluid isoprostanes are not related to inflammatory activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2004; 224: 23-27.



- [145] Mattsson N, Haghghi S, Andersen O et al. Elevated cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels indicating oxidative stress in healthy siblings of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett.* 2007; 414: 233-236.
- [146] Danilov A, Andersson M, Bavand N, Wiklund N, Olsson T, Brundin L. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 112–8.
- [147] Kashanian GRM. Nitrite level of serum as a diagnostic and prognostic tool in patients with rheumatoid arthritis. *Archives of Iranian Medicine.* 1999; 2: 1-6.
- [148] Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology.* 1995; 268: 699-722.
- [149] de Bustos F, Navarro JA, de Andrés C et al. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 1999; 41: 44-47.
- [150] Nazliel B, Taşkıran D, Irkeç C et al. Serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2002; 9: 530-2.
- [151] Giovannoni G, Heales SJ, Silver NC. Raised serum nitrite and nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997; 145: 77-81.
- [152] Sellebjerg F, Giovannoni G, Hand A et al. Cerebrospinal fluid levels of nitric oxide metabolites predict response to methylprednisolone treatment in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol.* 2002; 125: 198-203.
- [153] Johnson AW, Land JM, Thompson EJ et al. Evidence for increased nitric oxide production in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1995; 58: 107-112.

- [154] Yamashita T, Ando Y, Obayashi K et al. Changes in nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997; 153: 32-34.
- [155] Brundin L, Morcos E, Olsson T, Wiklund NP, Andersson M. Increased intrathecal nitric oxide formation in multiple sclerosis; cerebrospinal fluid nitrite as activity marker. *Eur J Neurol.* 1999; 6: 585-590.
- [156] Yuceyar N, Taskiran D, Sagduyu A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2001; 103: 206–211.
- [157] Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee M et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5:438-445.
- [158] Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A et al. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J Neurosci Res.* 2002; 70: 580-587.
- [159] Frost MT, Halliwell B. Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J.* 2000; 3: 453-458.
- [160] Rentzos M, Nikolaou C, Anagnostouli M et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2006; 108: 527-31.
- [161] Toncev G, Milicic B, Toncev S et al. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol.* 2002; 9: 221–226.
- [162] Guerrero AL, Martín-Polo J, Laherrán E. Variation of serum uric acid levels in multiple

sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol.* 2008; 15: 394-397.

[163] Hooper DC, Scott GS, Zborek A et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.* 2000; 14: 691-698.

[164] Sotgiu S, Pugliatti M, Sanna A et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2002; 23: 183-188.

[165] Spitsin S, Hooper DC, Mikheeva T et al. Uric acid levels in patients with multiple sclerosis: analysis in mono- and dizygotic twins. *Mult Scler.* 2001; 7: 165–166.

[166] Drulovic J, Dujmovic I, Stojsavljevic N et al. Uric acid level in sera from patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2001; 248: 121–126.

[167] Dore-Duffy P, Newman W, Balabanov R et al. Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Ann Neurol.* 1995; 37: 55-62.

[168] Droogan AG, McMillan SA, Douglas JP, Hawkins SA. Serum and cerebrospinal fluid levels of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: predominant intrathecal release of vasculae cell adhesion molecule 1. *J Neuroimmunol.* 1996; 64: 185-191.

[169] McDonnell GV, McMillan SA, Douglas JP et al. Raised CSF levels of soluble adhesion molecules across the clinical spectrum of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1998; 85: 186-192.

[170] Sharief MK, Noori MA, Ciardi M et al. Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis: correlation with TNF- $\alpha$  and blood-brain barrier damage. *J Neuroimmunol.* 1993; 43: 15-21.

- [171] Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I et al. Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology*. 1994; 44: 2367-2372.
- [172] Hartung HP, Reiners K, Archelos JJ et al. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 1995; 38: 186-193.
- [173] Giovannoni G, Lai M, Thorpe J et al. Longitudinal study of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: correlation with gadolinium enhanced magnetic resonance imaging. *Neurology*. 1997; 48: 1557-1565.
- [174] Trojano M, Avolio C, Ruggieri M et al. Serum soluble intercellular adhesion molecule-1: relation to clinical and Gd-MRI activity and to rIFN beta-1b treatment. *Mult Scler*. 1998; 4: 183-187.
- [175] Matsuda M, Tsukada N, Miyagi K et al. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in the cerebrospinal fluid and sera of patients with multiple sclerosis and human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*. 1995; 59: 35-40.
- [176] Alves-Leon SV, Batista E, Papais-Alvarenga R et al. Determination of soluble ICAM-1 and TNFalphaR in the cerebrospinal fluid and serum levels in a population of Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59: 18-22.
- [177] Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnäs M et al. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch Neurol*. 2000; 57: 546-551.

[178] Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K et al. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1993; 43: 2679-2682.

[179] Gelati M, Corsini E, Dufour A et al. High-dose methylprednisolone reduces cytokine-induced adhesion molecules on human brain endothelium. *Can J Neurol Sci*. 2000; 27: 241-244.

[180] Franciotta D, Bergamaschi R, Martino G et al. Tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in plasma and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients treated with methylprednisolone. *Eur Cytokine Netw*. 1999; 10: 431-436.

[181] Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA et al. Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2001; 248: 487-495.

[182] Durán I, Martínez-Cáceres EM, Río J et al. Immunological profile of patients with primary progressive multiple sclerosis. Expression of adhesion molecules. *Brain*. 1999; 122: 2297-2307.

[183] Ukkonen M, Wu K, Reipert B et al. Cell surface adhesion molecules and cytokine profiles in primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007; 13: 701-707.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Mahmure Aslan

Doğum Yeri : Razgrat/Bulgaristan

Doğum Tarihi : 02.09.1974

Medeni Hali : Evli

Eğitim:

İlkokul: Kuleli İlköğretim Okulu (1980-1985)

Ortaokul: Cağaloğlu Anadolu Lisesi (1985-1989)

Lise: Cağaloğlu Anadolu Lisesi (1989-1992)

Üniversite: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (1992-1998)

Tıpta Uzmanlık Eğitimi: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı  
(12.12.2003 – 06.10.2008)

Çalıştığı Kurumlar: Eskil Devlet Hastanesi/Aksaray, Ortaköy Devlet Hastanesi/ Aksaray

Üye Olduğu Meslek Kuruluşları: İstanbul Tabipler Odası, Türk Biyokimya Derneği, Klinik  
Biyokimya Uzmanları Derneği, Türk Klinik Biyokimya Derneği

Yabancı Dil: İngilizce,almanca

## 10. BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

### Uluslararası Makaleler

1. Bolayirli Ibrahim Murat, Aslan Mahmure, Balci Huriye , Altug Tuncay, Hacibekiroglu Munire, Seven Arzu. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. Life Sci. 2007 Jun 20;81(2):121-7.

2. Arzu Seven, Mahmure Aslan. Biochemical and Immunological Markers of Multiple Sclerosis. Turkish Journal of Biochemistry. 2007; 32(3); 112-119

3. Arzu Seven, Savaş Güzel, Mahmure Aslan, Vedat Hamuryudan. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. Clin Biochem. 2008 Feb 15.

### Ulusal Kongrelerde Sunulan Bilimsel Çalışmalar

1. Uncu M, Aslan M, Seven A, Cantaşdemir M, Numan F, Burçak G. İliofemoral aterosklerotik hastalarda lipid oksidasyonu ve aterojenez. IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 5-9 Eylül 2004 Marmaris.

2. Bolayırılı İ.M, Aslan M, Balcı H, Altuğ T, Hacibekiroğlu M, Seven A. Hiperkolesterolemik tavşan modelinde atorvastatin tedavisinin oksidatif stres, nitrik oksit yolu ve homosistein üzerine etkileri. VII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 19-22 Nisan 2007 Antalya.

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bilimsel Çalışmalar

1. Guzel S,Aslan M, Hamuryudan V, Seven A Oxidant Status in Rheumatoid Arthritis. 31. Febs Congress, 24-29 June 2006, İstanbul, Turkey.

2. Guzel S,Aslan M,Hamuryudan V, Seven A Oxidant/ Antioxidant Status in Familial Mediterranean Fever. 31. Febs Congress, 24-29 June 2006, İstanbul, Turkey.