

T1615

7



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**MULTİPL SKLEROZ’LU OLGULARDA IL-10 VE IL-12
POLİMORFİZMİNİN HASTALIĞA YATKINLIK, DİZABİLİTE
SKORU, HASTALIK SÜRESİ VE CİNSİYET İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Derya SEÇKİN

Uzmanlık Tezi

T 1615/1-1

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sevin BALKAN**

“ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANE

Antalya, 2004

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalında tezimin hazırlanmasında destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sevin Balkan başta olmak üzere, Yard. Doç. Dr. Hülya Aydın Güngör'e, İmmunoloji laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Olcay Yeğin ve Doç. Dr. Uğur Yavuzer'e, İmmunoloji laboratuvarı çalışanlarından biyolog Burçak Yurttaş, Mehtap Ülker'e ve uzmanlık eğitimimi borçlu olduğum tüm hocalarıma, ayrıca her zaman büyük destek gördüğüm aileme sonsuz teşekkürler...

Dr. Derya SEÇKİN
Antalya, 2004

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1- GİRİŞ ve AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Etyoloji ve Patogenez	4
2.3.1. İmmunopatogenez	4
2.3.2. Genetik	11
2.3.3. Diğer faktörler	14
2.4. Patoloji	14
2.5. Multipl Skleroz Sınıflandırılması	16
2.6. Klinik Özellikler	17
2.7. Laboratuvar Bulguları	19
2.8. Tanı	21
2.9. Tedavi	22
3. OLGULAR ve METOD	26
3.1. Olgular	26
3.2. Metod	27
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	35
ÖZET	38
KAYNAKLAR	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MS	Multipl Skleroz
SSS	Santral sinir sistemi
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
TNF	Tumor necrosis factor
TGF	Transforming growth factor
TCR	T hücre reseptörü
APC	Antijen sunan hücre
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
TH	T helper
Ig	İmmünglobulin
MMP	Matriks metalloproteniaz
MBP	Myelin basic protein
PLP	Proteolipid protein
MOG	Myelin oligodendrosit glikoprotein
MAG	Myelin asosiye protein
NK	Natural killer
HLA	Human leukocyte antigen
DNA	Deoksiribonükleik asit
APP	Amiloid prekürsör protein
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BBT	Bilgisayarlı beyin tomografisi
Gd	Gadolinium
KBB	Kan-beyin bariyeri
MRS	Manyetik rezonans spektroskopi
NAA	N-asetilaspartat
SUP	Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller
GUP	Görsel uyarılmış potansiyeller
BIUP	Beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyeller
IVIG	İntravenöz immünglobulin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP-PCR	Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction
ARMS-PCR	Allel spesific amplify refractory mutation system- polymerase chain reaction
rpm	Dakikadaki döngü sayısı
bp	Baz çifti
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
TE	Tris-HCL, EDTA, dH ₂ O
EDSS	Expanded Disability Status Scale

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil-1. Hücre yüzey molekülleri, antijen tanıma ve süper antijen	4
Şekil-2. T ve B hücreler ve sitokinler aracılı iletişim	6
Şekil-3. T lenfositlerin kan-beyin bariyerinden geçişi	7
Şekil-4. Multipl skleroz immunopatogenezi	8
Şekil-5. İnterferon-beta'nın etki mekanizması	24
Şekil-6. 18 hastanın IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi	30

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo-1.	McDonald Kriterleri	21
Tablo-2.	Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri	26
Tablo-3.	Hasta ve kontrol gruplarında IL-10 ve IL-12 polimorfizmi genotip frekansları	32
Tablo-4.	Hasta ve kontrol gruplarında allel frekansları	33
Tablo-5.	Hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre genotip dağılımı	33
Tablo-6.	EDSS ve hastalık süresine göre IL-10 genotip frekansı	34
Tablo-7.	EDSS ve hastalık süresine göre IL-12 genotip frekansı	34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz (MS); çoğunlukla genç erişkin yaşlarda başlayan, atak ve remisyonlarla veya progresif seyreden kronik demyelinizan hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Birçok sebep öne sürülmekle birlikte; bugün için en çok üzerinde durulan otoimmün mekanizmadır (1). Epidemiyolojik çalışmalar; MS'in, genetik yatkınlığı olan bireylerde, kritik bir yaş döneminde spesifik veya nonspesifik enfeksiyona bağlı anormal immün reaktivasyon sonucu oluştuğu fikrini desteklemektedir. Otoimmün hipoteze göre; otoantijene özgü T lenfositler; periferde duyarlı hale geldikten sonra santral sinir sistemine (SSS) göç ederler (2). T lenfositlerinin nasıl otoreaktif hale geldiği ve hedef antijenlerinin ne olduğu henüz tam açıklanamamıştır. SSS'ne geçen otoreaktif T hücreleri; interlekin-1 (IL-1), interlekin-2 (IL-2), interlekin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler salgılayarak myelin hasarına neden olur (2). Bunlardan IL-12 mRNA; özellikle relapsing-remitting MS (RRMS)'de relaps döneminde ve RRMS ve sekonder progresif MS (SPMS)'de aktive plak süresince artış göstermektedir. Bunun tersine; RRMS'li hastalarda özellikle aktif plak gelişimi ve relapstan önce interlekin-10 (IL-10) düzeyinde azalma olmaktadır. IL-10; anti-inflamatuvar özelliktedir ve IL-12'nin endojen inhibitörüdür. Yani; MS gelişiminde IL-10/IL-12 dengesindeki bozulma riski oluşturur (3). Yapılan bir çalışmada; RRMS'li erkeklerde pro-inflamatuvar TNF- α üreten hücrelerin, kadınlardan anlamlı derecede yüksek olduğu, kadınlarda ise IFN- γ üretiminin hastalık dizabilitesi ile korele olduğu gösterilmiştir (4). Yine aynı çalışmada; IL-10 düzeyinin cinsiyet ile ilişkisi saptanamamıştır (4).

Son yıllarda; MS'in immünopatogenezinde rol oynayan bu sitokinlerden IL-10 ve IL-12'deki genetik polimorfizmin, hastalığın ortaya çıkışında ve hastalık şiddetinde önemi olduğunu destekleyen çalışmalar yapılmıştır (5, 6, 7). Polimorfizmler; türler içinde değişiklikler oluşmasını sağlayan genetik farklılıklardır. Bir gen lokusunda nadir allel(ler) en az 0,01 (%1) frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu allel(ler) için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfizm olarak tanımlanabilir (8). Bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır. Ancak bir genin promotor dizinindeki polimorfizm, anormal transkripsiyon düzenlenmesine neden olarak, hastalığın ortaya çıkmasına veya şiddetinin değişmesine katkıda bulunabilir (9). Hastalık şiddeti üzerine olan etkisi; hastalık süresi ile de ilişkili olabilir (10). Bir çalışmada; IL-10 geni promotor -1082 pozisyonundaki polimorfizmin AG

genotipi taşımasının şiddetli MS riskini azalttığı ve bu etkinin hastalık süresi uzun olanlarda daha belirgin hale geldiği gösterilmiştir (10) Bununla birlikte, IL-10 geni promotor -1082 pozisyonundaki A-G ve IL-12p40 geninin 1188 pozisyonundaki A-C polimorfizmi ile MS'e yatkınlık ve hastalık şiddeti üzerine etkisini araştıran çalışmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir (5, 6, 7, 10) Etyopatogenez tam olarak aydınlatılamadığı için, tedavide birçok ajan denenmekte ancak istenilen sonuç elde edilememektedir Son yıllarda kullanıma giren interferon- β tedavisi ile bazı hastalarda atak sıklığı ve şiddeti azaltılabilmekle birlikte bazı hastalarda anlamlı bir etkinlik gözlenmemektedir (11) Bu kişisel farklılıkların nedeni henüz aydınlatılabilmiş değildir

Bu çalışma; MS hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırmalı bir izlem çalışmasıdır Bu çalışmanın amaçlarını şöyle özetleyebiliriz

- 1 MS'li hastalarda ve kontrol grubunda; IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmlerinin varlığını araştırmak
- 2 Bu genlerdeki polimorfizmin; hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi üzerine etkisi ve cinsiyet ile ilişkisi üzerindeki etkisini saptamak

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tanım

Multipl skleroz (MS); santral sinir sisteminin (SSS) en sık rastlanan inflamatuvar demyelinizan hastalığıdır. Sıklıkla genç erişkin dönemde başlar.

Patolojik olarak santral sinir sisteminde birçok bölgede; demyelinizasyon, akson kaybı, oligodendrositlerde azalma ve astroglial skarlar ile karakterizedir (12).

Lezyonlar; santral sinir sisteminde, korteksten spinal korda kadar herhangi bir bölgede olabileceğinden; semptom ve bulgular oldukça değişkendir. Klinik gidiş; bulgu vermeyen benign bir hastalık şeklinde olabileceği gibi, hızlı, ilerleyici ve sekel bırakıcı olabilir. Sıklıkla, ataklar ve remisyonlar şeklinde seyreder ve ataklar tekrarladıkça sakatlık bırakma oranı artar (1).

Hastalığın; etyolojisi henüz bilinmemektedir. Genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve otoimmün mekanizmalar üzerinde durulmakta ve bu yönde pek çok araştırmalar yapılmaktadır (1).

2.2.Epidemiyoloji

MS; kadınlarda daha sık görülmekte olup, kadın/ erkek oranı 2 1/1 'dir. Yıllık insidansı 3.4/100.000'dir (13). En sık 30 – 33 yaşlarında görülür. Kırklı yaşlarda bu insidans azalır (14). Hastalığa ait üst yaş sınırı 59 olarak kabul edilse de 60 yaşın üzerinde geç başlangıçlı MS vakalarına da rastlanmıştır. Ancak, bu hastalar, muhtemelen semptomları dikkat çekmeyen, subklinik kalan ve semptomların geç izlendiği vakalardır (15). Hastalık çocuklarda oldukça nadirdir.

MS'in prevalansının ılıman iklimlerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek, orta ve düşük prevalansa sahip üç kuşak tanımlanmaktadır. 30/100 000'den yüksek prevalanslı bölgeler; kuzey ve güney yarım kürede 45 ve 65 enlemler arasında kalan; Kuzey Avrupa, Güney Kanada, Kuzey A.B.D., Yeni Zelanda ve Güney Avustralya'dır. 100.000' de 5-25 frekansına sahip, orta prevalanslı bölgeler ise; Güney Avrupa, Güney Amerika, Avustralya'nın tamamıdır. Asya, Afrika ve Güney Amerika'ya ait tropikal alanlarda ise prevalans 5/100.000'den azdır (14).

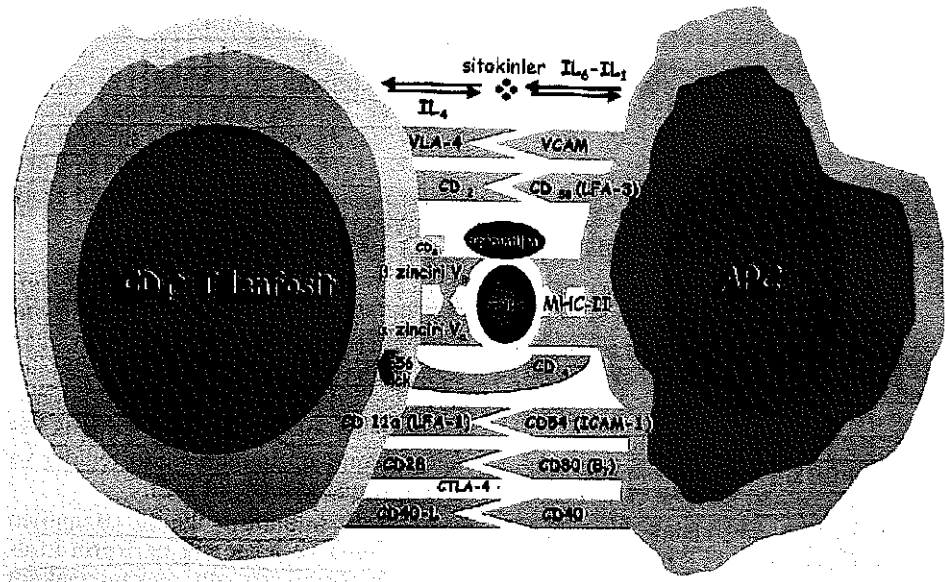
2.3.Etyoloji ve Patogenez

2.3.1.Immunpatogenez

MS'de tüm aktive demyelinizan lezyonların; T hücreleri, makrofaj ve aktive mikrogliyalardan oluşan inflamatuvar infiltrat içermesi; MS'in T hücre bağlantılı otoimmün bir hastalık olduğunu düşündürmektedir (3).

MS patogenezinde ilk adım supresse T hücrelerinin, SSS dışında periferde aktive olmalarıdır. İmmun olaylar kaskadı self ya da non self antijenin tanınması ve T hücrelerinin aktivasyonu ile başlar. Antijen tanıma ve hücreler arası ilişkide birçok yüzey molekülü ve sitokin rol alır (2)

T hücre reseptörü (T cell receptor, TCR), antijeni, ancak antijen sunan hücreler (antigen presenting cell, APC) dediğimiz, temelde monosit-makrofaj sisteminin hücreleri olan ancak değişik dokularda farklı adlar alan hücrelerin yüzeyinde sunuldukları zaman tanımaktadır. Dolaşımdaki lenfositlerin TCR'u; alfa ve beta ($V\alpha$, $V\beta$) olmak üzere iki farklı polipeptit zincirinden oluşur (Şekil-1). T hücrelerinin az bir kısmında; gamma ve delta zincirleri bulunur. Bu gamma-delta T hücrelerinin aktivitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Alfa ve beta zincirleri, hücre yüzeyinde, CD3 olarak adlandırılan 5 protein grubu ile birlikte bulunur. Yüzeyinde CD4 yüzey molekülü bulunduran T helper hücreler MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klas II molekülleri ile sunulan eksojen antijenleri tanırken, yüzeyinde CD8 yüzey molekülü bulunan T supressor hücreler MHC-Klas I molekülü ile sunulan endojen antijeni tanır (2).



Şekil-1: Hücre yüzey molekülleri, antijen tanıma ve süperantijen

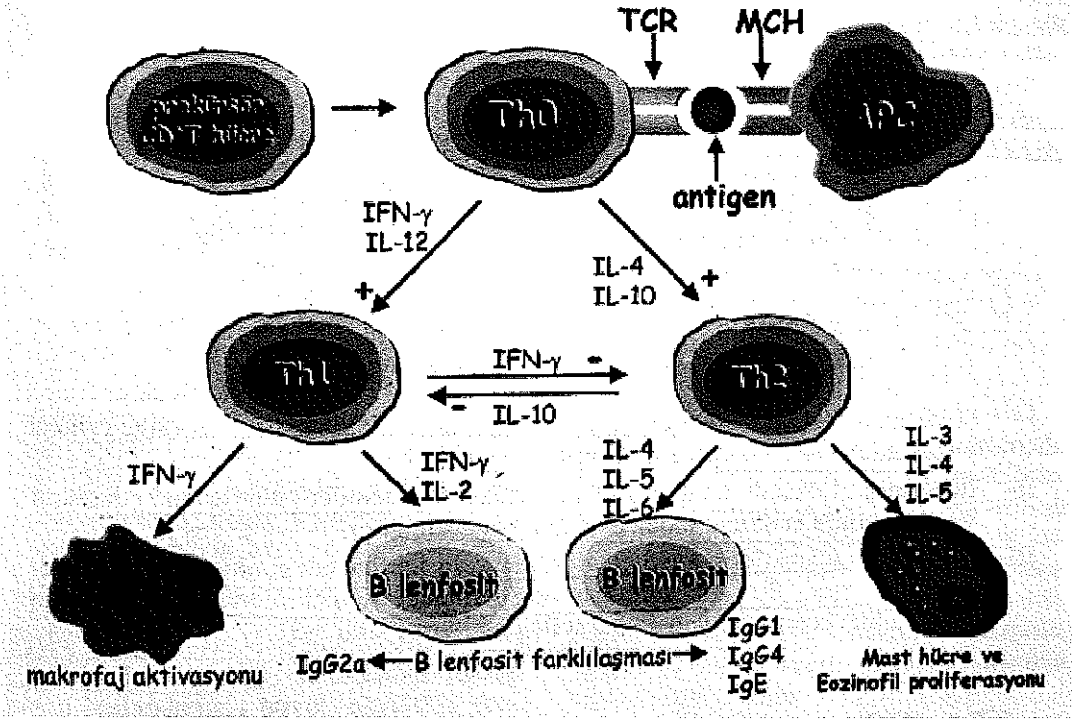
T lenfositlerin nasıl otoreaktif hale geldiği tam olarak bilinmemektedir Bu konuda öne sürülen 3 teori vardır :

a) Moleküler benzerlik: Oтореaktif T hücrelerin başlangıç aktivasyonu için olasılıklardan biri bakteriyel ya da viral enfeksiyon sırasındaki “moleküler benzerlik” yoludur Çoğu bakteriyel ve viral protein, otoantijenlerle kısa zincir türdeşliği paylaşır, ancak çok yakın benzerliğin gerekli olmadığı da bilinmektedir. Görünüşte ilişkisiz aminoasit zincirleri bile MHC molekülü ile birlikte sunulduğunda, otoantijenspesifik T hücreleri çapraz olarak uyarma yeteneğindedir. Bu durumda enfeksiyon sırasında; immün yanıt sadece enfeksiyöz etkene değil aynı zamanda benzer vücut antijenine sahip dokulara da yönelir (16)

b) Süperantijen teorisi: T hücreleri süperantijen ile de otoreaktif hale gelebilir Süperantijenler; T hücre reseptörünün V β bölgesine bağlanan bakteriyel toksinler, enterotoksinler veya virüslerdir V β segmentinin farklı tiplerinin sayısı diğer α/β reseptörlerinden çok daha azdır Yani, daha fazla T hücresinde benzer V β reseptörü mevcuttur Bu nedenle süperantijenler daha fazla sayıda anerjik T lenfosit uyarabilirler Eğer uyarılan bu T lenfositler SSS antijenlerine karşı otoreaktif iseler SSS’ni hedef alabilirler (17)

c) Sitokinler: Bunların dışında otoreaktif T hücreleri; bir inflamatuvar reaksiyon sırasında sekrete edilen lokal sitokinlere maruz kalarak da uyarılabilirler T hücreleri ile immün sistemin diğer hücreleri arasındaki kompleks hücresel ilişkiler, sitokin olarak adlandırılan bir grup sinyal molekülü aracılığı ile olur. Sitokinler, T hücrelerinin aktivasyon, differensiyasyon ve proliferasyonunu düzenler Sitokin etkisi ile T helper hücreler; T Helper-1 (TH-1) ve T Helper-2 (TH-2) olmak üzere iki temel hücreye dönüşüm gösterirler TH-1 hücreleri, birincil olarak interleukin-2 (IL-2), Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve İnterferon gamma (IFN- γ) salgılar Bu pro-inflamatuvar sitokinler; makrofaj aktivasyonu, hücre aracılı immunité ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarından sorumludur Ayrıca B hücrelerinin, plazma hücrelerine dönüşümüne yol açar Plazma hücreleri antikor yapabilme özelliğine sahiptir (2)

TH-2 hücreler ise; IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayarak B lenfositlerden Ig (immünglobülin) G1, IgG2 ve IgE antikor ürünlenmesine yol açar Ayrıca, TH-2 hücreler T hücre toleransı, mast hücre ve eozinofil differansiyasyonunda rol alır (2) TH-2 hücreleri; anti-inflamatuvar özelliktedir. Ancak bazen pro-inflamatuvar özellik kazanabilirler MS immünopatogenezinde; TH-1 ve TH-2 hücreleri arasındaki denge bozulur ve atak sırasında TH-2 hücreleri inflamasyona katkıda bulunur (Şekil-2)

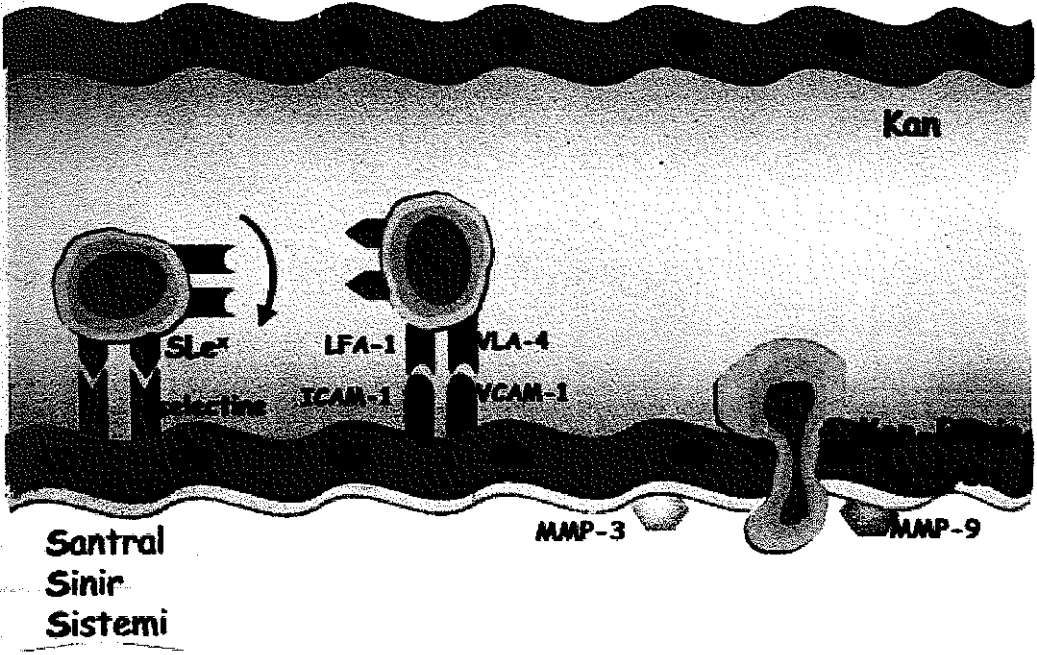


Şekil-2: T ve B hücreler ve sitokinler aracılı etkileşim

Sistemik dolaşımda otoreaktif hale gelen T hücreleri kan-beyin bariyerini aşarak SSS'ne girerler (Şekil-3). Bu karmaşık olayın başlangıcında, aktif T hücrelerinden salınan IFN- γ , TNF- α , IL-1, 2, 4, 6 gibi çeşitli sitokinler, endotel hücresi üzerindeki reseptörlerin hedef olarak gösterilmesinde ve adezyon moleküllerinin salınmasında rol oynarlar (18)

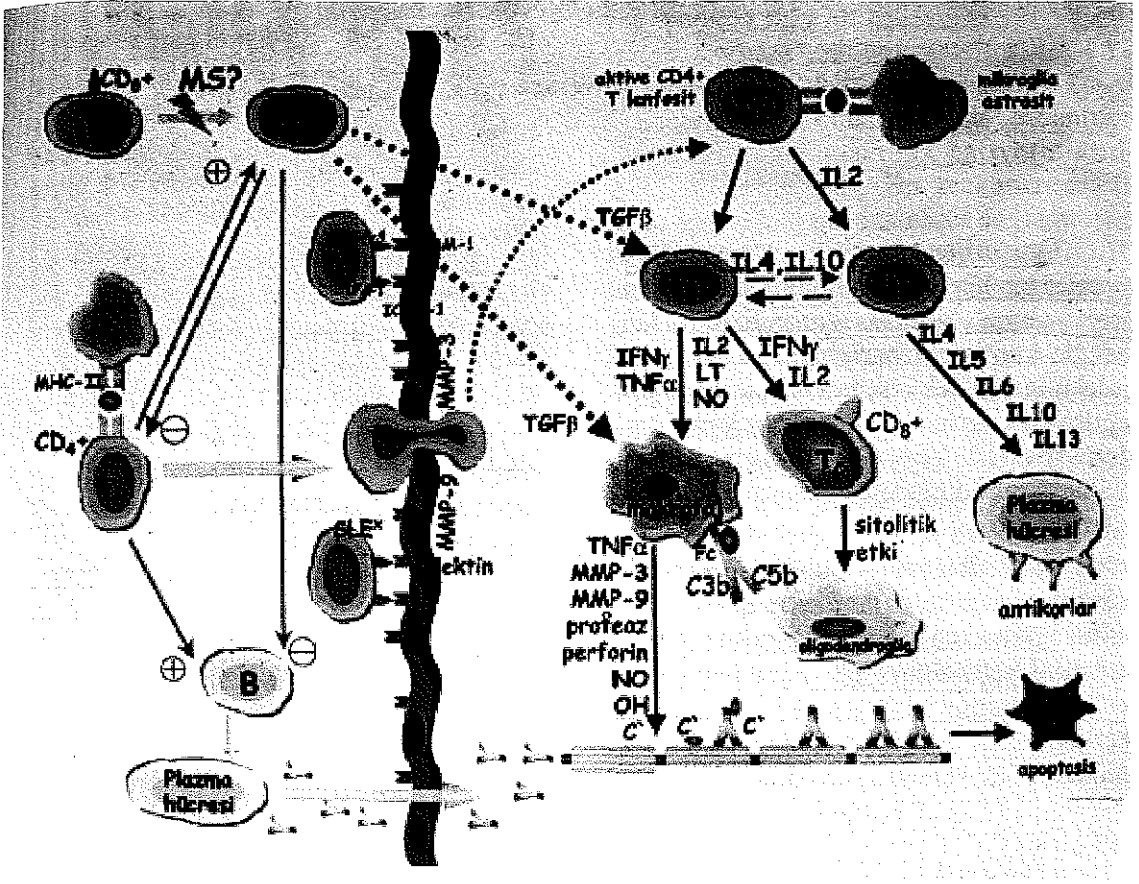
Adezyon molekülleri; yapısal olarak 3 grupta sınıflandırılır;

1. Selektinler: (L, P ve E selektinler): Lenfositlerin vasküler endotel yüzeyinde yavaşlama ve yuvarlanmasından sorumludurlar Selektin aracılı adezyon zayıftır
2. İntegrinler: (VLA-4, LFA-1): Lenfosit yüzeyinde bulunurlar ve lenfositlerin endotele sıkıca bağlanmasını sağlarlar
3. İmmünoglobülin süpergen: (ICAM-1: interselüler adezyon molekülü, VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekülü): Endotel hücresinin adezyon molekülleridir (18).



Şekil-3: T lenfositlerin kan-beyin bariyerinden geçişi

Otoreaktif T lenfositler; adezyon molekülleri ile etkileştikten sonra matriks metalloproteinazlar (MMP) yardımı ile kan-beyin bariyerini geçerler ve SSS'ne ulaşırlar. MMP'lerin klinikle ilişkili olduğunun düşünülmesinin nedeni; MS hastalarının beyin omurilik sıvısında, bu molekül ailesinin bazı üyelerinin tespit edilmiş olmasına rağmen kontrol grubunda saptanmamış olmasıdır (19) Zn+2 endopeptidaz ailesinden olan MMP'lerin önemli fonksiyonları pro-inflamatuar sitokin artışı, ekstrasellüler matriks proteinlerinin harabiyeti ile kan-beyin bariyerinin açılması, hücre göçü ve direkt myelin harabiyetidir. MS'de kan mononükleer hücrelerinde MMP-2, MMP-9 ve mRNA artışı gösterilmiştir (19).



Şekil-4: Multipl skleroz immunopatogenezi

Aktive T lenfosit göçü ve ekstrasvazyonunda rol oynayan diğer bir molekül grubu ise; kemokinler ve onların reseptörleridir. Kemokinler; küçük serum proteinleridir. Kemotaktik sitokinler olarak bilinirler. Çeşitli mikroorganizmalar, antijenler, allejenler ile temas ve yaralanmalar sonrasında konakçı yanıtının ilk fazında, farklı hücre tipleri tarafından salgılanırlar. Lökositlerin enfeksiyon ve inflamasyon bölgesine göçü, kemik iliğinde lökosit maturasyonu, doku onarımı ve vaskülarizasyon, hematopoezis ve lökosit sirkülasyonunun yenilenmesinde rol alırlar (19). Yapılarında bulunan sisteinin pozisyonu temel alınarak; alfa (C-X-C), beta (C-C) ve gamma (C) subgruplarına ayrılır. B grubu kemokinler; mononükleer hücrelerin migrasyonunu ve aktive T hücrelerin inflamasyon kapasitesini artırır. Deneysel otoimmün ensefalomyelit (experimental allergic / autoimmune encephalomyelitis, EAE) modelinde; aktif demyelinizan plakta, B grubu kemokinlerden olan CCR1 reseptöründe artış olduğu gösterilmiştir (20). Ayrıca; lezyon kaynaklı T hücreleri ve periferik T hücrelerinde, CCR5 ve CXCR3'ün de dahil olduğu bazı kemokin reseptörlerinin fazla miktarda üretildiği saptanmıştır (21, 22).

Aktive otoreaktif T hücreleri; SSS'ne geçtiklerinde, antijen sunan hücreler (astrozit, mikroglia) tarafından SSS otoantijenleri ile tekrar aktive (reaktivasyon) edilir. (Şekil-4). Bu otoantijenlerin neler olduğu henüz kesin olarak bilinmemektedir. EAE modellerinde sinir sisteminin birçok proteininin potansiyel olarak ensefalitogenik olduğu gösterilmiştir (2). Bunlardan en çok üzerinde durulanlar; myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrosit glikoprotein (MOG), myelin asosiye glikoprotein (MAG) ve nonmyelin antijen olan S100'dür (2). MBP ve PLP, kalın myelin kılıflı alanlardaki lezyonlarda önem taşır. Tersine MOG, myelin yüzeyinde yoğun bulunan bir antijen olduğu için, ince myelin kılıflı alanlarda bile yüksek konsantrasyonda bulunur. MOG spesifik T hücrelerle tetiklenen inflamasyon daha çok periventriküler bölge ve serebellar beyaz cevherde, S100 spesifik T hücrelerle tetiklenen inflamasyon ise beyaz cevhere ek olarak serebral korteks, retina ve uvea gibi alanlardadır. Aynı antijene bireysel farklı yanıtlar olabileceği gibi MS'in farklı dönemlerinde farklı otoantijenlerin devreye girdiği varsayılmaktadır (19).

SSS'de; otoantijenler ile karşılaşan TH hücreleri, sitokinler aracılığı ile TH-1 ve TH-2 hücrelerine dönüşür. TH-1 hücreleri salgıladıkları pro-inflamatuar sitokinlerin etkisi ile myelin ve oligodendrositlerin hasarlanmasına neden olabileceği gibi direkt olarak apoptoz veya nekroz ile de oligodendrosit hasarına yol açabilir. T lenfositler ayrıca makrofaj aktivasyonuna neden olurlar (23). Makrofajlar; myelini fiziksel olarak harap edebildikleri gibi serbest oksijen radikalleri, TNF, nitrik oksit, bazı proteazlar ve kompleman aracılığı ile de demyelinizasyona neden olurlar. MS'de aktif demyelinizasyon bölgesindeki makrofajlarda, nitrik oksit sentetaz artışı saptanmıştır (2, 19).

MS patogeneğinde özellikle demyelinizasyonda B hücrelerin ve antikorların rolü en az T hücreler kadar önemlidir. TH-2 hücrelerinden salınan sitokinler aracılığı ile plazma hücrelerinden otoantikorlar salınır. Yapılan çalışmalar; T hücrelerin inflamasyonu başlattığı ve kan-beyin bariyerini açtığını, myelin ve oligodendroglianın yüzey antijenine karşı oluşan otoantikorların ise demyelinizasyon için gerekli olduğunu desteklemiştir (2). Özellikle kronik lezyonlarda, otoreaktif T helper hücrelerin, anti-myelin antikor ürünlenmesinde otoreaktif B hücreler ile işbirliği yaptığına dair kanıtlar vardır (2). MS hastalarının çoğunun BOS'unda; yüksek düzeyde intratekal sentezlenmiş immunglobulin tesbit edilmiştir (19). Antikorlar; kompleman fiksasyonu ve/veya makrofaj fagositozunu kolaylaştırma gibi farklı mekanizmalarla myelin hasarına yol açabilirler (19).

Otoreaktif T hücrelerinin birçoğu, SSS'deki lokal uyarımdan sonra apoptoz yolu ile ölür. Apoptoz için Fas/Fas L bağlanması gerekir. Her iki molekül aktive T hücreler tarafından artırılır. Apoptoz diğer dokularda da oluşmasına rağmen SSS'de çok belirgindir. Lezyonu başlatan otoreaktif T hücreleri kısmen veya tamamen bu mekanizma ile yok edilebilir (24)

Ayrıca lezyon gelişimi sırasında karşı düzenleyici veya koruyucu mekanizmaların güç kazandığı ve pro-inflamatuar faktörleri yendiği görülür. Bazı durumlarda, aynı faktör çift yönlü rol (anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar) oynayabilir ve hastalık dönemine bağlı olarak tetikleyici ya da koruyucu olabilir (2)

Yukarıda özetlenen bu MS immunpatogenezinde, periferde ve santralde T hücrelerinin uyarılması ile salınan sitokinlerden IL-12 ve IL-10'un önemi birçok çalışmada ele alınmıştır (25, 26, 27)

IL-12: MS patogenezinde majör rolü olduğu düşünülen bir pro-inflamatuar sitokin olup hücrel immün yanıtın düzenlenmesinde kritik rol oynar. Fonksiyonel sitokin, IL-12p70 olup, IL-12p40 ve IL-12p35'den oluşur (28). Dendritik hücreler, monosit, makrofajlar, B hücrelerinin alt tipleri ve nötrofiller tarafından salınır. Mikroglia ve astrositler de IL-12 salgılar. IL-12'nin aktivasyonu ise iki subünit içeren reseptör kompleksi aracılığı ile olur. Bu kompleks; IL-12 reseptör $\beta 1$ ve IL-12 reseptör $\beta 2$ 'den oluşur (29)

IL-12, TH-1 polarizasyonu için en potent faktördür (29). IL-12'nin T ve natural killer (NK) hücreleri üzerine birçok biyolojik etkisi (IFN- γ salgılanması gibi) olup, normal bakterial enfeksiyona karşı savunma sisteminde de önemli rolü vardır (30, 31). Ancak IL-12'nin MS, üveit, diyabet ve romatoid artrit gibi otoimmün inflammatuar hastalıklarda, T hücre cevabının TH-1'e kayması şeklinde santral patojen rolü de vardır (32). MS'de viral ve bakterial enfeksiyonların hastalığın seyrini değiştirip, kötüleştirdiği bilinmektedir (33). İşte bu kötüleşmede IL-12'nin rolü, mekanizmalardan biri olabilir (34). Literatürde; MS'de IL-12 düzeyleri ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. RT-PCR ile yapılan araştırmalarda IL-12 düzeyleri kontrollere göre yüksek bulunmuşken, ELISA ile farklı bulunmamıştır. IL-12 reseptör (IL-12R) sistemi de araştırılmış ve MS'de IL-12/IL-12R sisteminde bir disregülasyon olduğu yolunda kanıtlar elde edilmiştir (34)

IL-12'nin MS'de hastalık dizabiteli veya aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda araştırma vardır. Van-Boxel-Deziare ve ark. MR'da aktivite saptanan MS hastalarında periferik kanda mononükleer hücrelerde IL-12p40 artışı olduğunu

göstermişler ve hatta IL-12'nin bir prediktör olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (26).

Diğer bir araştırmada da aktif lezyonu olan hastalarda beyin omurilik sıvısında IL-12p40 artışı saptanmıştır (35) Progresif MS hastalarında da IL-12 üreten monositlerin yüzdesi normallere göre yüksek bulunmuştur (36)

MS tedavisinde kullanılan IFN- β 'nın IL-12/IL-12R sistemi üzerine iki yönlü etkisi vardır. Bu ilaçların majör etki mekanizmalarından biri IL-12 üretimini azaltmaktır (37, 38)

IL-10: Aktive makrofajlar ve T lenfositleri tarafından salınan, hem enfeksiyöz hem de otoimmün hastalıklardaki immün cevapda önemli rol oynayan bir immün regülatuar sitokindir. Bu anti-inflamatuar etkisini; TNF- α , IFN- γ , IL-12, MHC molekülleri, IL-1, IL-6, reaktif nitrik oksit metabolitleri gibi birçok pro-inflamatuar immün aktif moleküllerin üretimini azaltarak ve antijen spesifik sitotoksik T hücrelerini inhibe ederek sağlar (5, 6, 39, 40)

IL-10, IL-12'nin dominant endojen inhibitörüdür (41). MS'de IL-10'un immunosupressif fonksiyonları oldukça fazla çalışılmıştır. IL-10mRNA'nın düzeyindeki azalmaların hastalığın aktivitesindeki artış ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (21). Stabil seyirli MS hastalarında ise IL-10mRNA düzeylerinde, IL-10 salınımını yapan lökositlerde artış gösterilmiştir (42, 43). Bu sonuçlar, IL-10'un MS'in progresyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (6). IL-10'un MS'de relaplardan önce azaldığı da gösterilmiştir (26).

2.3.2. Genetik:

Bugüne kadarki bilgiler; MS'de kalıtımın rolü olduğunu göstermiştir (19). MS başlıca, Kafkas ırkını etkilemektedir. Zencilerde ve Asya ırkında daha nadirdir. Hastalık karakteristik coğrafik dağılım göstermektedir. Kafkas ırkının bulunduğu yerlerdeki yüksek prevalansa karşılık, Asya ve Afrikada daha az oranda görülür. Ayrıca bazı popülasyonlarda daha çok görülmektedir. Örneğin, Sardunya ve İzlanda gibi bölgelerde diğer yerlere kıyasla hastalık görülme oranı artmıştır (44).

MS prevalansı, farklı coğrafik bölgelerde 1/100 000'den 100/100 000'e kadar değişmektedir. Prevalansın yüksek olduğu bölgelerde, genel popülasyonda MS görülme riski yaklaşık 125/100 000'dir (19).

Aile ve geniş popülasyon çalışmaları sonucunda 1 derece akrabasında MS olan olgularda %3-5, 2 derece akrabasında MS olan olgularda ise %1,5-2,5 oranında risk

artışı saptanmıştır. Geniş bir hasta popülasyonunda yapılan bir çalışmada; MS'li olguların yaklaşık %20'sinin 1,2 yada 3. dereceden yakınlarında MS olduğu bulunmuştur (45, 46).

İkiz çalışmaları MS riskinin monozigot ikizlerde %30, dizigot ikizlerde ise sadece %3-5 olduğunu göstermiştir (47, 48).

1990 yılında A.B.D., İngiltere ve Kanada'da yapılan üç büyük genetik çalışmada, birden fazla MS'li bireyin olduğu aileler incelenmiş ve bu çalışmaların sonucunda; hastalığa yatkınlık sağlayacak 60 kadar genomik bölge olduğunu göstermiştir. Bu veriler; MS'in poligenik bir hastalık olduğunu düşündürmektedir (19).

Genetik yatkınlığın; MHC, diğer ismi ile insan lökosit antijen sistemi (HLA) ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. HLA; 6. kromozomun kısa kolunda lokalize gen kümelerinin birleşmesinden meydana gelir. Bu gen kümelerinin tamamı 4 milyon çifttir. HLA molekülleri; hücre yüzeyinin glikoproteinleridir ve kısa antijenik peptit parçalarını, peptit/MHC-spesifik T hücrelerine sunarak immün yanıtta primer rol oynar. HLA-DR-DQ haplotiplerinden DR15, DQ6, DW2'nin MS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (1). HLA-DW2 en sık Avrupa ve Kuzey Amerika'da görülmektedir. DW2 haplotipinde MS riski 4 kat artmaktadır. Ancak diğer muhtemel genetik faktörler karşılaştırıldığında önemi pek açık değildir (13). Primer progresif MS (PPMS) ile DR4 ve RRMS ile DR3'ün ilişkili olduğu öne sürülmüştür, ancak İsveç'te yapılan bir çalışmada; hastalığın seyri veya sonucu üzerine HLA'nın etkisi gösterilememiştir (49).

MS'li hastalarda ayrıca 2, 3, 5 ve 7. kromozomların kısa kolunda, 2, 17 ve 19. kromozomların uzun kolunda lokus tesbit edilmiştir. Eraksoy ve ark.ları; Türk popülasyonunda 197 hastada hastalık ile ilişkili olabilecek genomik bölgeleri incelemişler ve 5. kromozomun uzun kolundaki 15 bölgesinin hastalıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (50). Yine aynı araştırmacılar tarafından 42 Türk ailesinde (birden fazla üyesinde MS bulunan) yapılan çalışmada; 13. ve 18. kromozomun kısa kollarındaki genomik bölgeler ile MS arasında ilişki saptanmıştır (51). Hastalığın seyri ve şiddeti üzerine non-HLA genlerinin (IL-1R, TNF, APOE, CTLA4 ve CCR5 gibi) etkisi ile ilgili çalışmalar yapılmakla birlikte henüz kanıtlanmamıştır (19).

Son yıllarda MS'in immünopatogenezinde rol oynayan sitokinlerdeki genetik polimorfizmin, hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Polimorfizm: Doğada, aynı türden organizmalar genellikle, bazı görünümleri ile farklıdır. Bu farklılık genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak adlandırılır. Birçok gen lokusunda iki yada daha fazla allel yer alabilir (genetik polimorfizm).

Genetik polimorfizm; bir popülasyonda farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki yada daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Bir gen lokusunda nadir allel(ler) en az 0.01 (%1) frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu allel(ler) için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfizm olarak tanımlanabilir. Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA (deoksiribonükleik asit) düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir (8)

Polimorfizm sıklığına en iyi yaklaşım, DNA'nın direkt analizi ile sağlanır (8)

Belli bir allelin varlığı yada yokluğu herhangi bir avantaj yada dezavantaj sağlamıyorsa doğal polimorfizm kabul edilir (8). Bir genin promotor dizinindeki polimorfizm anormal transkripsiyon düzenlenmesine neden olarak, hastalığın ortaya çıkmasına veya şiddetinin değişmesine katkıda bulunabilir (9).

Literatürde; MS immünopatogenezinde rol oynayan anti-inflamatuar etkili IL-10 ve pro-inflamatuar etkili IL-12 arasındaki dengedeki sapmaları araştıran çalışmaların bir kısmı da, genetik polimorfizm ile ilgilidir (5, 6, 7, 39, 52). Bu çalışmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir. Myhr ve ark ları tarafından yapılan bir çalışmada; IL-10 düzeyinin artması ile; IL-10 geninin promotor bölgesindeki - 1082 (G/A), -819 (T/C) ve -592 (A/C) polimorfizmlerinin ilişkili olduğu öne sürülmüş ve bu polimorfizmlerin hastalığa yatkınlığı ve hastalığın seyrini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Çalışma sonunda primer progresif MS (PPMS)'de; düşük IL-10 ekspresyonu haplotipinin, orta veya yüksek ekspresyon haplotipinden daha kötü klinik sonuçlar doğurduğu gözlenmiştir. RRMS'li hastalarda, polimorfizm ile klinik seyir arasında ilişki saptanmamıştır (5). Bu üç noktadaki polimorfizmle yapılan başka bir çalışmada ise; IL-10 polimorfizminin MS ile veya hastalığın progresyonu ile ilgili olmadığı gösterilmiştir (6, 7). De Jong ve ark larının yaptığı bir çalışmada ise; IL-10'un - 2849 bölgesinde guanin yerine adenin bulunmasının, IL-10'un düşük üretilmesine neden olduğu saptanmıştır. Bu polimorfizmin sıklığı; PPMS'de; RRMS ve kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (39). Nguyen ve ark ları ise, RRMS ve SPMS'li 47 hastada IL-10 üreten hücre düzeyinin, kadın ve erkekde farklı olmadığını göstermişlerdir (4).

IL-12p 40 geninde ise 1188 bölgesinde polimorfizm saptanmış ancak MS ile ilişkisi kanıtlanamamıştır (52).

2.3.3. Diğer Faktörler

MS’de; viral enfeksiyonlar, demyelinizasyonu başlatabilir. Kızamık, kızamıkçık, kabakulak, coronavirüs, parainfluenza, herpes simplex ve Ebstein-Barr virüsün MS’in ortaya çıkmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (1). Bazı araştırmacılar; akut MS plağı çevresinde Herpes virüs -6 aktivitesinin artmış olduğunu göstermiştir (1). Bazı çalışmalarda; klamidya pnömonia ve mikoplazma pnömonia, MS hastalarının kan ve beyin omurilik sıvısında yüksek bulunmuştur (53). Ancak, bu ajanların MS üzerine etkisi kesin olarak kanıtlanmamış değildir.

Kafa travması, cerrahi, anestezi ve lomber ponksiyon sonrası hastalığın aktive olduğu öne sürülmüş ancak yapılan kontrollü çalışmalarda, ilişki saptanamamıştır (1).

Psikolojik stresin, MS atağını başlattığı veya arttırdığı yönünde güçlü kanıtlar vardır (54).

Postpartum dönemde MS’in kötüleştiği kanıtlanmıştır. Ancak, bunun hormonal değişikliklere mi yoksa diğer etkenlere mi bağlı olduğu bilinmemektedir (1).

Bunların dışında; son yıllarda, D vitamini eksikliğinin MS için risk faktörü olabileceği ve D vitamini preparatları ile MS progresyonunun önlenilebileceği öne sürülmektedir (55, 56).

2.4. Patoloji

MS; SSS’de demyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterizedir. Beyin dış yüzeyinin genel görünümü çoğunlukla normaldir. Uzun süreli vakalarda; sıklıkla atrofi ve sulkuslarda derinleşme ile birlikte lateral ve 3. ventriküllerde genişleme gözlenir (1). Serebral hemisferlerden yapılan kesitlerde; eski lezyonlar; küçük, sınırları düzensiz, gri alanlar şeklinde, akut lezyonlar ise; pembe alanlar şeklinde görülür. Bunlara “MS plakları” denir (1). Bu lezyonlar, beyin ve spinal kordda herhangi bir yerde görülebilmekle birlikte; sıklıkla beyaz cevhere yerleşirler (57). En sık görüldükleri yerler; lateral ve 3. ventrikül çevresi, periaquaduktal bölge, korpus kallozum, optik sinir, kiazma ve beyin sapıdır (58).

Spinal kordun dış yüzeyi de genellikle normaldir. Bazı vakalarda; kordda hafif incelme ve kısalma, araknoid ve pia’da kalınlaşma görülebilir (1).

MS lezyonları içinde; değişik derecelerde myelin yıkımı ve nöron hasarı, glial hücre proliferasyonu, kan damarlarında değişiklikler gözlenir. Demyelinizasyon alanları; myelin kılıfı boyaları ile soluk renkte görülür. Zemin yapısı ise nispeten iyi korunmuştur (1). Nöron hasarının, şiddeti farklılıklar gösterir. Akson tamamen yıkıma

uğrayabilir. Ancak böyle ciddi hasar nadirdir. Genellikle küçük değişiklikler görülür. Bununla birlikte; aksonal kayıp çok erken MS plaklarında dahi bulunur (1). Aktif MS lezyonlarında aksonlarda amiloid prekürsör protein (APP) birikimi, yine akson terminalinde APP benzeri oluşumlar gösterilmiştir (13). Son zamanlarda; irreversibl klinik disfonksiyon için; aksonal kayıp ve sonucunda ortaya çıkan beyin atrofisinin, plak sayısı ve boyutundan daha önemli olduğu ileri sürülmektedir (1).

Erken dönem veya akut lezyonlarda; ven ve venüllerin etrafında lenfosit ve makrofajların oluşturduğu perivasküler göllenme, astrosit ve plazma hücrelerinde artış ve ödem vardır. Myelin kılıfı parçalanır ve myelinin yapısı bozulur. Hücresel yanıt, myelin bozulmasına mı yol açıyor, yoksa myelin bozulmasına yanıt olarak mı ortaya çıkıyor, henüz bilinmemektedir (1).

Bu lezyonlar; makrofaj ve astrosit hiperaktivitesi ve myelin bozulmasının devam etmesiyle birkaç ay aktif kalabilir. Fagositik hücreler myelin yıkım ürünleri ile yüklenir. Zamanla plak; inaktif hale gelir. Demyelinizasyon belirginleşir, oligodentrositlerin hemen hemen tamamı kaybolur ve gliosis genişler. İnaktif lezyonlar; hiposelülerdir ve myelin yıkım ürünlerinden yoksundur (19).

MS plaklarında; özellikle erken akut fazdan sonraki remyelinizasyonun; sıklıkla TipII astrositler ve oligodentrositlerin farklılaşması sonucu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte; bu remyelinizasyon çoğunlukla hatalı ve inkomplettir (1). Bazı lezyonlar gölge (shadow) plak olarak izlenir ve tama yakın iyileşen MS plaklarını temsil eder. Magnetik rezonans görüntüleme (MRG)'de kontrast tutan lezyonlar; belirgin hücre infiltrasyonu, demyelinize aksonlar ve taze myelin artıklarını içeren aktif makrofajlardan oluşur (13).

MS hastalarında, akut ve kronik plaklar dışında 'sessiz plaklar'a da rastlanır. Bunlar; klinik bulgu vermezler ve histopatolojik olarak, kronik lezyonlara benzerler (59).

MS'de periferik sinirler; genellikle normaldir. Bununla birlikte, sural sinir biopsisinde endotelial pinositozis, endonöronal alanın genişlemesi, mononükleer hücre infiltrasyonu veya demyelinizasyon görülebilir (1). Ayrıca; MS'li hastalarda, hipertrofik nöropati ve kronik inflamatuvar demyelinizan nöropati bildirilmiştir (1).

2.5. Multipl Skleroz Sınıflandırılması

Multipl skleroz; SSS'in herhangi bir yerini etkileyip farklı klinik görünümlere neden olabilir. Hastalığın seyri de oldukça değişkendir. Farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte bugün için kabul edilen; 1996 yılında Amerikan MS Derneği tarafından yapılan sınıflandırmadır (60). Buna göre MS başlıca 4 gruba ayrılmıştır:

1. Relapsing – Remitting Multipl Skleroz (RRMS): MS'in klasik formudur. Ataklarla karakterizedir. Atak sonrası, hasta tamamen düzelir ve ataklar arasında progresyon yoktur (60). Hastaların %70'inde MS; yirmili yaşlarda, RRMS formunda başlar (61).
2. Primer Progresif MS (PPMS): Hastalık, başlangıçtan itibaren arada düzelme olmaksızın ilerleyen bir seyre sahiptir. İlerleme hızı, hastalar arasında farklılıklar gösterir.
3. Sekonder Progresif MS (SPMS): Başlangıçta relapsing – remitting formunda olan hastalık, bir süre sonra sürekli progresyon gösteren forma dönüşebilir. RRMS'in %50'si 10 yıl sonra, %90'ı ise 25 yıl sonra SPMS'e dönüşür (57).
4. Progresif - Relapsing MS (PRMS): Progresif gidişle başlayan ve sonrasında tamamen düzelme izlenmeyen relapsların da olaya katıldığı bir klinik formdur.

MS'in bazı tiplerini tanımlamak için bazen; benign MS, tek-atak progresif MS, malign MS ve transisyonel MS gibi terimler de kullanılır (57). Benign MS; RRMS'nin bir alt tipidir ve bu hastalar, ilk semptomlar başladıktan 10 yıl sonra hala tam iş görebilirliğe sahiptirler. Hastaların %20'inde benign form izlenir (14). Tek-atak progresif MS'de; ilk atağı progresif faz izler. Oldukça nadirdir. SPMS'in alt tipi kabul edilir. Malign veya fulminan MS; hastalık başlangıcından sonra birkaç ay içinde ciddi sakatlık veya ölüme yol açan hızlı progresyon ile karakterizedir (60). Transisyonel MS ise; hastalığın RRMS'den SPMS'ye döndüğünü ifade etmek için kullanılır.

2.6.Klinik Özellikler

MS lezyonları, SSS'nin hemen her yerinde yerleşebileceği için, hastalar çok farklı semptom ve klinik bulgularla doktora başvurabilir.

Duyusal semptomlar:

MS hastalarında en sık görülen semptomlardır (14). Hipoestezi, hiperestezi veya dizestezi şeklinde olabilir. Derin duyu bozukluğu veya spinal düzeyde seviye veren duyu kaybı görülebilir. Hastaların 1/3'ünde başın öne eğilmesi sonucu; medulla spinalis boyunca ekstremitelere yayılan elektriklenme hissi ortaya çıkar. Buna 'L'hermitte bulgusu' denir (14).

Motor bulgular:

Sıklıkla hemiparezi şeklinde olabilse de parapareziye de oldukça sık rastlanır. Muayenede; birinci motor nöron bozukluğuna işaret eden spastisite, derin tendon reflekslerinde artma ve patolojik refleksler saptanabilir. Kortikospinal yolların akut demyelinizasyonu sonucu; herhangi bir hareket veya hiperventilasyonla başlayan, kısa süreli unilateral tonik spazmlar olabilir. 60 – 90 sn. sürer ve bilinç açıktır, çok az ağrı hissedilir (62).

Görme yolları ile ilgili belirtiler:

Optik nörit oldukça sık görülen bir başlangıç semptomudur. Tek taraflı, ani görme kaybı, baş ağrısı ve ağrılı göz hareketleri ile ortaya çıkabilir. Bazı vakalarda tam görme kaybı olmaz. Bulanık görme, santral, parasantral veya santroçekal skotom ve renkli görmeye bozulma görülebilir. Optik nöritte, optik disk ödemi olabilir, fakat retrobulber nöritte, optik disk normaldir. Temporal solukluk; makülopapüler demetin demyelinizasyonuna bağlı gelişen geç bir bulgudur. Buna karşın tüm optik nöritliler MS değildir. Optik nöritli hastaların ancak %60'ında daha sonra MS geliştiği gösterilmiştir (63).

Beyinsapı belirtileri:

MS'de beyin sapı tutuluşuna ait bulgulara oldukça sık rastlanır. 3. ve 6. sinirin etkilenmesi ile diplopi, medial longitüdinale fasikülüs tutuluşu ile internükleer oftalmopleji görülebilir. Diğer kranial sinirlerin etkilenmesiyle; yüzde hipoestezi, fasial paralizi, tek taraflı işitme kaybı, disfaji ve dizartri görülebilir. Kortikospinal yolların beyin sapında tutulumuna bağlı olarak progresif spastik kuadriparezi oluşabilir (14).

Serebellar bulgular:

Serebellar tutuluş ile tremor, dizartri, gövde ve ekstremitate ataksisi görülebilir. Kronik hastalarda gövde ataksisi ve intensiyonel tremor % 45-50 oranında bildirilmiştir (13)

Mesane, barsak ve cinsel bozukluklar:

MS'li hastaların %50 – 80'inde mesane disfonksiyonuna rastlanır. Sıklıkla acil işeme hissi şeklinde başlar, bunu inkontinans izler. Sebebi genellikle detrüsör kasının refleks kasılması üzerindeki inhibisyonun bozulmasıdır. Akut atak sırasında üriner retansiyon görülebilir. Konstipasyon ise; gaita inkontinansından daha sık görülür ve üst ve alt motor nöron bozukluğunun göstergesi olabilir (12).

MS'li hastalarda seksüel disfonksiyon da oldukça sık görülür. Hastaların yaklaşık %50'sinde seksüel aktivitede tam kayıp, %20'sinde ise seksüel aktivite azalması görülür (12). Erkeklerde azalmış penil his nedeniyle ereksiyon sağlama yada sürdürmede güçlük, bazen de orgazm sorunlarına rastlanabilir. MS'li kadınlarda ise alt ekstremitelerde spastisite, vajinal lubrikasyon olmaması, ve vajinal his azalması şeklinde seksüel fonksiyon kaybı bulguları görülür (14)

Ağrı:

MS'li hastaların büyük bir kısmında ekstremitate yada omurga ağrılarına rastlanır. Ağrı, genellikle alt ekstremitelerde ve dizestezi şeklinde olmakla birlikte gövde ve üst ekstremitelerde de olabilir. Trigeminal nevralji yada atipik yüz ağrıları, hastalığın herhangi bir döneminde ortaya çıkabilir. Trigeminal nevraljisi olan genç bir hastada her zaman MS'den şüphelenilmelidir (14).

Kognitif ve psikiyatrik bozukluklar:

Depresyon ve bipolar affektif bozukluk, MS'le yakından ilişkilidir. Bazen MS semptomlarına öncülük edebilir. Psikoz hastalığın kronik, progresif ve nüks eden – düzelen (RRMS) formlarının hepsinde gözlenebilir ve varlığı hastalığın progresyonuna işaret eder (64). Vakaların yaklaşık %50'sinde demans görülür. Kognitif bozukluk RRMS'de , progresif MS'e oranla daha azdır (65).

Epilepsi:

MS'de epilepsi normal popülasyona göre daha sıktır. Jeneralize veya fokal nöbet şeklinde olabilir. Nöbet başlangıcı; genellikle kortikal gri cevherde yada subkortikal bölgedeki yeni lezyonlarla ilgilidir (14).

Yorgunluk ve uyku:

Yorgunluk, hastalarda en sık görülen 3 semptomdan biridir. %78'e kadar çıkabilir. Depresyon ve ilaç yan etkisinden ayırt edilmelidir. Uyku bozukluğu, kontrollere göre 3 kat fazladır (13).

2.7.Laboratuvar Bulguları

MS'de bütün olgular için geçerli patognomonik bir laboratuvar bulgusu yoktur. Bununla birlikte; beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemeleri, MRG ve uyarılmış potansiyel çalışmalarının tanısal önemi büyüktür.

Beyin Omurilik Sıvısı (BOS): BOS bulguları; tek başına MS tanısı koydurmaz veya tanıyı ekarte ettirmez, ancak klinik ile birlikte değerlendirildiğinde tanısal değeri vardır.

MS hastalarının büyük çoğunluğunda BOS görünümü berrak ve basıncı normaldir. Lökosit sayısı hastaların 2/3'ünde normaldir, nadiren 50/ml'nin üzerindedir. Genellikle artmış olan hücre tipi; T lenfositlerdir (14).

Hastaların yaklaşık %20 – 30'unda BOS albümin düzeyi artmıştır. Albümin BOS'da sentezlenemediği için; bu bulgu, kan – beyin bariyeri bozukluğunun önemli bir göstergesidir (14). Hastaların %70'inin BOS'unda intratekal immünglobülin sentezinde artış vardır (14). En fazla IgG düzeyinde artış olmakla birlikte IgM ve IgA düzeyleri de artar. IgG indeksinin (BOS IgG/serum IgG : BOS albümin/serum albümin) 0,77'nin üzerinde olması, SSS'de IgG üretiminin arttığını gösterir. IgG üretiminin daha hassas bir ölçüsü; BOS'un elektroforetik analizi ile oligoklonal bantların tesbit edilmesidir. Elektroforez yönteminde en sık agar-jel kullanılmaktadır. Kesin MS tanılı hastaların %85-95'inde oligoklonal bant pozitifdir. Tek semptomu olan MS hastalarında yapılan çalışmada, oligoklonal bant pozitif olanlarda, negatif olanlara oranla hastalığın daha hızlı seyrettiği gösterilmiştir (12). Ancak oligoklonal band MS için spesifik değildir ve serebral enfarkt, beyin tümörleri, SSS'in enfeksiyöz hastalıkları, nörosifiliz, bruselloz ve diabetes mellitus gibi sistemik hastalıklarda da pozitif olabilir (14).

MS'in akut atağı veya alevlenmesi sırasında, hastaların BOS'unda myelin basic proteinde artış gözlenir. Myelin, MBP, MOG, MAG ve PLP'e karşı oluşan antikorlar, BOS içerisindeki hücrelerde var olmasına karşın MS için spesifik değildir (14).

Radyoloji:

Bilgisayarlı beyin tomografisi (BBT)'nde; nonspesifik atrofi, sıklıkla periventriküler bölgede lokalize hipodens lezyonlar ve aktif plağı gösteren kontrast tutan lezyonlar görülür. Bununla birlikte BBT'nin MS plakları için sensitivitesi düşüktür. Akut atak sırasında çekilen BBT ile sadece %50-60 oranında plaklar gösterilebilir (12).

MS tanısı koymada; manyetik rezonans görüntüleme (MRG), BBT'ye göre daha üstün bir yöntemdir. MS tanısı almış hastaların %95'in de MRG bulguları anormaldir (66). Lezyonlar; T2 ağırlıklı görüntülerde hiperintens, T1 ağırlıklı görüntülerde ise hipointens olarak görülür. Lezyonların periventriküler beyaz cevherde olması, 6mm'den büyük ve intratentorial lezyonların oluşu, MS için karakteristiktir. Sagittal kesitlerde korpus kallozuma dik yerleşimli lezyonlar, MS için oldukça spesifiktir (66).

Gadolinium ile kontrastlı çekilen MRG; akut MS lezyonunu tespit etmekte, kontrastsız MRG'ye göre daha üstündür. Normalde gadolinium (Gd), kan-beyin bariyerini (KBB) geçemez. MS atağı gibi SSS'nin fokal inflamasyonlarında KBB bozulur ve gadolinium lezyon bölgesine kolaylıkla geçebilir (67). Bu teknikle lezyonlar, T1 ve T2 ağırlıklı görüntülemelerde hiperintens görülürler. Ancak bazı yeni lezyonlar, Gd sonrasında da hipointens görünmeye devam ederler. Bu lezyonlara; kara delik (black holes) denir ve doku hasarının çok ciddi olduğuna işaret ederler (68).

Ancak MS hastalarında klinik bulgular ile MRG görüntüleri korelasyon göstermez. MRG'da klinik belirti vermeyen asemptomatik plaklara rastlanabildiği gibi, seri çalışmalarda; MRG atak hızının, klinik atak hızından çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (67).

Son yıllarda kullanıma giren manyetik rezonans spektroskopi (MRS) tekniği ile akut MS lezyonlarında, N-asetilaspartat (NAA) miktarının azaldığı gösterilebilmektedir. Bu teknik ile yapılan görüntüleme bulguları klinik dizabilite ile korelasyon göstermektedir. NAA; beyinde nöron ve akson gibi nöronal uzantılarda bulunur ve nöronal ve aksonal hasarda miktarı azalır. Bu yüzden, nöronal ve aksonal bütünlüğün göstergesi olarak kullanılır (69).

Uyarılmış Potansiyeller:

Uyarılmış potansiyeller; sensoriyel organın periferik uyarımı ile SSS'de ortaya çıkan elektriksel olayları değerlendirir. Klinik olarak bulgu vermeyen SSS patolojilerini değerlendirmede faydalıdır. En sık, somatosensorial uyarılmış potansiyeller (SUP),

görsel uyarılmış potansiyeller (GUP) ve beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyeller (BİUP) kullanılır (12).

MS hastalarının %65-80'inde SUP anormaldir. Bu hastaların yaklaşık yarısında herhangi bir sensoriyel bulgu veya semptom yoktur. Benzer şekilde; hastaların %70'inde ise BİUP'de anormallikler saptanır (14).

Bugün için tanısal açıdan en önemlisi; GUP'dir ve MS hastalarının %80'inde anormaldir(14).

2.8.Tanı

MS'de tanı esas olarak anamnez, nörolojik muayene ve yukarıda tanımlanan bazı destekleyici laboratuvar yöntemlerine dayanmaktadır.

2000'li yılların başına kadar MS tanısı koymak için Poser kriterlerinden yararlanılmakta idi (70). Günümüzde; 2001 yılında McDonald tarafından tanımlanan kriterler kullanılmaktadır (Tablo-1) (71). McDonald kriterleri; kullanım kolaylığı, erken tanı koyma ve MRG'nin tanıdaki yeri açısından, daha önceden kullanılan Poser kriterlerinden daha üstündür (72).

Tablo-1. McDonald Kriterleri

<u>Klinik bulgu</u>	<u>Objektif lezyon</u>	<u>Tanı için gerekli ek bilgiler</u>
2 yada	2 yada	—
2 yada	1	MRG' de yaygın lezyonlar yada BOS (+) yada MRG' de 2 yada MS ile uyumlu lezyon yada sonraki başka atak
1	2 yada	MRG'de zamanla yayılım yada 2. klinik atak
1 (izole klinik sendrom)	1	MRG' de yaygın lezyonlar yada BOS (+) yada MRG' de 2 yada MS ile uyumlu lezyon ve MRG'de zamanla yayılım yada 2. klinik atak
0 (Progresif başlangıç)	1	BOS (+) ve MRG' de 9 yada 2 lezyon yada 2 yada kord lezyonu tada 4-8 beyin ve 1 kord lezyonu yada VEP (+) , 4'den az beyin ve 1 kord lezyonu

2.9.Tedavi

MS; kronik bir hastalıktır Henüz tamamen tedavi edebilmek mümkün değildir Bugün için;

- Akut atak tedavisi
- Hastalığın seyrini değiştirmeye yönelik tedaviler
- Semptoma yönelik tedaviler yapılabilmektedir

Akut atak tedavisi:

Yüksek doz intravenöz kortikosteroidlerin MS'in akut atak progresyonunu durdurduğu yolunda kanıtlar vardır Kortikosteroidlerin; antijen sunan hücrelerin sekresyonunun inhibisyonu, aktive T hücrelerinden TNF- α ve IL-6, IFN- γ ve IL-12 sekresyonunun inhibisyonu gibi etkileri vardır (14)

RRMS'li hastaların yaklaşık %85'i, IV steroid (metilprednizolon) tedavisi ile iyileşme gösterir (14) Milligan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; IV steroid tedavisi sonrasında özürlülük skorunda, 3,5-5 puanlık bir azalma olduğu bildirilmiştir (73). Birçok çalışma ise; yüksek doz IV metilprednizolon sonrasında MRG'da gadolinium tutan lezyonların sayısında %80 azalma olduğunu göstermiştir (74, 75, 76)

Tedavinin dozu ve süresi konusunda fikir birliği yoktur 1000 mg/gün metil prednizolon 3,5 veya 7 gün olarak önerilmekle birlikte en sık kullanılan uygulama 5 gündür Sonrasında oral 100mg/gün metilprednizolon ile devam edilip azaltılarak kesilebildiği gibi oral tedavi verilmeden direkt olarak da kesilebilir

Yüksek doz metilprednizolona cevap vermeyen, şiddetli ataklarda plazmaferez tedavisinin etkili olabileceği gösterilmiştir (77, 78)

Hastalığın seyrini değiştirmeye yönelik tedaviler:

İmmunsupresif tedavi: Uzun süreli immunsupresif tedavi, MS'li hastalarda relapsların sıklığını azaltabilir Azotiyopürin, metotreksat, kladribine ve siklosporin bu konuda denenmiş ilaçlardır Bu ilaçların etkinliği sınırlı ancak yan etkileri oldukça fazladır Düşük doz oral metotreksat tedavisi bugün için kronik progresif MS'lilerde kötüleşmeyi yavaşlatan en iyi tedavi yöntemidir (79)

İntravenöz İmmunglobulin (IVIG) tedavisi: Son yıllarda MS'de IVIG kullanımı üzerine pek çok çalışma yapılmıştır ve RRMS hastalarında atak sıklığını önlemede güvenli ve etkili olabileceği düşünülmektedir (80, 81) IVIG tedavisinin; MRG'da

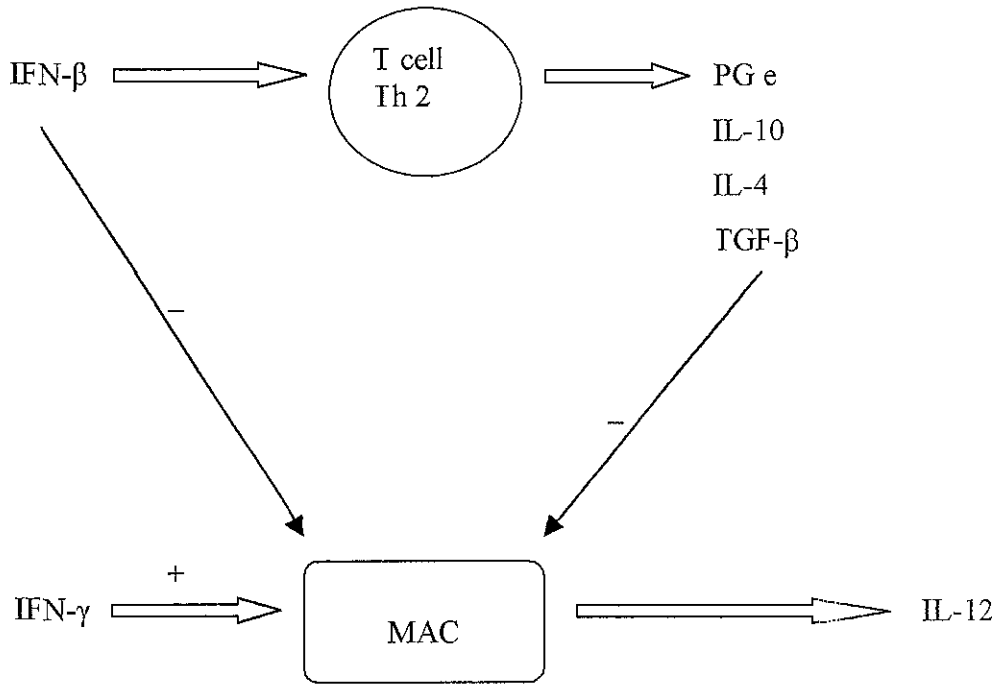
gadolinium tutan lezyon sayısını plasebo'ya oranla %60 oranında azalttığı gösterilmiştir (82)

Glatiramer Asetat: Yapısal olarak MBP'e benzer ve MBP'e spesifik insan T hücrelerini inhibe eder. Günlük 20 mg sc glatiramer asetat'ın relaps hızını azalttığı gösterilmiştir (83). 27 RRMS'li hastada yapılan bir çalışma; glatiramer asetat tedavisinin MRG bulgularını azalttığını desteklemiştir (84). Progresif MS'de etkinliği kanıtlanmamıştır.

İnterferon Beta (IFN- β) tedavisi: İnterferon- β pleiotropik bir moleküldür. Antiviral, pro ve antiproliferatif, pro ve antiapoptotik ve immunregülatuar aktiviteleri tanımlanmıştır (3). MS hastalarındaki etki mekanizması multifaktöriyeldir. T lenfositlerin lenfoid dokuya sekestrasyonu, endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin inhibe edilerek T lenfositlerin kan-beyin bariyerini geçişinin engellenmesi, T lenfositlerden gama interferon da dahil sitokin salınımının azalması, makrofajlardan TNF- α üretiminin azalması ve IL-6 üretiminin artması gibi etkileri vardır (14). Yeni çalışmalarda; IFN- β 'nın tedavi edici etkisi; IL-12 ve IL-10 dengesini değiştirerek yaptığı üzerinde durulmaktadır (3).

MS immünoopatogenezinde; IL-12'nin artması ve IL-10'un azalması önemli rol oynar. Ayrıca IL-12; MS'de IFN- γ sekresyonun artmasından da sorumludur. IFN- β ; IL-12 / IL-10 dengesini değiştirerek IL-10 üretimini arttırırken, IL-12'yi baskılar (3).

18 RRMS'li hasta ile yapılan bir çalışmada; IFN- β 1a tedavisinin 3 ayında IL-12 düzeyine bakılmış ve azalma tesbit edilmemiştir (85). Buna karşın başka bir çalışmada; IFN- β 1b'nin invitro periferik kandaki mononükleer hücrelerin IL-12 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etki IL-10 aracılığı ile gerçekleşmektedir. IL-10'un IL-12 üzerine baskılayıcı etkisi vardır. Eğer bu etki nötralize edilirse; IFN- β ; IL-12 üretimini baskılayamayabilir (37).



Şekil-5: Interferon-beta'nın etki mekanizması

IFN-β' nın MS tedavisinde kullanılan 3 formu vardır IFN-β1b sc (günaşırı 0,3mg), IFN-β1a sc (günaşırı 22mcg veya 44mcg) ve IFN-β1a IM (haftada bir kez 30mcg) Yapılan çok sayıda araştırma ile IFN-β1a ve β1b'nin bütün formlarının; relaps sıklığı ve şiddeti ve MRG aktivitesi üzerine etkinliği kanıtlanmıştır Relaps sıklığını %30 oranında azalttıkları gösterilmiştir MRG aktivitesini azaltma üzerine etkileri, glatiramer asetattan daha iyidir (11, 68, 86, 87)

IFN-β tedavisinin progresif MS'de etkinliği kanıtlanmamıştır PPMS'de yapılmış çalışma yoktur SPMS'li hastalarda ise IFN-β1a ve IFN-β1b ile yapılan plasebo kontrollü çalışmaların sonucunda; progresyon hızında anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte MRG bulgularında azalma olduğu gösterilmiştir (88, 89) Bu sonuçlardan farklı olarak, IFN-β1b ile yapılan çok merkezli başka bir çalışmada; 33 aylık izlem sonrasında, tedavi alan grupta hastalık progresyonunda anlamlı azalma (plasebo grubundan 9-12 ay yavaş) saptanmıştır(90)

Semptomatik tedaviler: MS hastalarında kronik yorgunluk sık rastlanılan bir semptomdur. Tedavide amantadin, pemoline veya modafinil kullanılabilir.

Spastisite tedavisinde; baklofen, dantrolen, diazepam ve tizanidin kullanılmaktadır. Bu ilaçların yan etkileri oldukça fazladır ve sonuçları genellikle istenildiği gibi değildir (14). Botulinium toksini enjeksiyonu, denenebilecek tedaviler arasındadır (91).

Detrüsör refleksinin artmasına bağlı acil işeme hissi ve noktüride; oksibutinin klorit gibi antikolinerjikler kullanılabilir. Tolterodin ve imipramin diğer alternatiflerdir. İdrar retansiyonunda ise; prozosin ve doksazosin kullanılabilir. Miksiyon sonu rezidüel volüm 150 ml'ten fazla kalırsa; intermittant self kateterizasyon uygulanmalıdır(14).

Eretil disfonksiyon için en etkili tedavi; sildenafil sitrat tabletleridir(14).

Bunların dışında; MS'de; enfeksiyonlardan korunmak, fizik tedavi ve psikoterapi çok önemlidir.

3. OLGULAR VE METOD

3.1. Olgular

MS'li hastalarda IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi çalışmasına; Akdeniz Üniversitesi Nöroloji kliniğinde takip edilen ve Poser kriterlerine göre kesin MS tanısı almış, yaşları 17 ile 64 arasında (ortalama yaş= 37.04 ± 11.29) değişen, 32 (%57)'si kadın, 24 (%43)'ü erkek olmak üzere toplam 56 hasta alındı. Hastalık tipi; 47 hastada RRMS, 5 hastada PPMS ve 4 hastada SPMS'di. Hastalık süresi; ortalama 8.23 ± 6.42 yıl (1-29 yıl arası) idi. Nörolojik muayeneleri yapılarak son dizabilite dereceleri, Kurtzke'nin Genişletilmiş Dizabilite Skalası (Expanded Disability Status Scale - EDSS)'na göre hesaplandı (92). Hastaların EDSS skorları 0 ile 7,5 arasında (ortalama EDSS = 1.16 ± 0.37) değişmekte idi. 47 (%84) hastanın EDSS skoru 0-3,5 arası, 9 (%16) hastanın EDSS skoru ise 3,5 ve üzerinde idi (Tablo 2).

Kontrol grubu; IL-10 G-1082A polimorfizmi için 52'si kadın, 30'u erkek olmak üzere toplam 82, IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi için ise 51'i kadın, 25'i erkek olmak üzere toplam 76, yaş ve cinsiyet uyumlu, herhangi bir inflamatuvar ve genetik hastalığı olmayan kişilerden oluşturuldu (Tablo 2).

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri

Özellikler	MS	Kontrol (IL - 10)	Kontrol (IL - 12)
Sayı	56	82	76
Cinsiyet (K/E)	32/24	52/30	51/25
Ortalama Yaş (Yıl)	37.04 ± 11.29		
Ortalama Hastalık Süresi	8.23 ± 6.42		
Ortalama EDSS	1.16 ± 0.37		
EDSS < 3,5 ⁽ⁿ⁾	47		
EDSS 3,5 ⁽ⁿ⁾	9		

Çalışmada; MS hastaları ve kontrol grubu arasında IL-10 geni promotor bölgesinde 1082 pozisyonunda ve IL-12p40 geni 1188 polimorfik bölgelerindeki genotipleri tespit edildi. Bu genotiplerin; hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi ve cinsiyet ile ilişkisi araştırıldı.

3.2. Metod

DNA izolasyonu: Hastalar ve kontrol grubundan EDTA'lı tüpe 2 cc venöz kan örneği alındı. DNA izolasyonu; K0512 FERMENTAS DNA Ekstraksiyon Kit (Genomik DNA Purifikasyon Kit)'in öngördüğü prosedüre uyularak aşağıdaki sıra ile yapıldı:

1. 400µl kan + 400µl Lizis Buffer iyice karıştırıldı.
2. 65 °C de 5 dakika inkübe edildi.
3. Tüp içerisine 600µl kloroform ilave edilip iyice karıştırıldı.
4. 10 000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
5. Başka bir tüpe 720µl bidistile su ve 80µl presipitasyon solüsyonu kondu.
6. Santrifüj edilen tüpün üst fazı alındı ve hazırlanan presipitasyon solüsyonuna eklendi.
7. Tüp alt-üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı.
8. 10 000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı, 100µl NaCL ilave edildi.
10. DNA'nın çözülmesi sağlandı.
11. 1ml absolü alkol ilave edildi. Tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. DNA'nın görülür hale gelmesi sağlandı.
12. 10 000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
13. Alkol tüpten uzaklaştırıldı. Tüpteki pelet etüvde kurutuldu.
14. 100µl TE veya distile su ilave edildi ve DNA çözüldü.
15. DNA miktar ölçümü yapıldı.

Elde edilen DNA örneklerinde; IL-12p40 geninde 1188A-C polimorfizmi RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction) tekniği ile, IL-10 geninde G-1082A polimorfizmi ise ARMS-PCR (Allel Spesific Amplify Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction) tekniği kullanılarak araştırıldı.

PCR (Polymerase Chain Reaction) Yöntemi:

İlk kez 1985'de tanımlanan bu yöntem ile ardışık bir DNA sentez sistemi kullanılarak, bir DNA segmenti tek bir orijinal kopyadan milyonlarca kez çoğaltılabilir (93). Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanarak, bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

Önce, amplifiye edilecek DNA segmenti tek ipliklere ayrılır (denatüre edilir). Bunlar yeni sentezlenecek DNA için kalıp işlevi görürler. DNA sentezi için primer olarak sentetik oligonükleotidler kullanılır.

Her duplikasyon döngüsü, kesin zamanlamalı (her biri diğerine bağlı) ve farklı sıcaklıklar gerektiren üç ardışık reaksiyondan oluşur. İlk olarak, amplifiye edilecek DNA parçası denatüre edilir (tek ipliklere ayrılır); sonra soğutularak oligonükleotidler ile hibridize edilir (primer bağlanması); daha sonra yeni DNA'nın oluşabilmesi için (DNA sentezi), DNA polimeraz ve dört deoksiribonükleotid trifosfat ile inkübe edilir. Her devirde, bir önceki devirde oluşmuş DNA kalıp görevi görür ve bu şekilde her devirde DNA iki katına çıkar. Bu yöntem ile 30 devri birkaç saatte tamamlamak ve çok sayıda kopya üretmek mümkündür (93). Tüm bu işlemler; termal cycler denilen özel aletlerde yapılmaktadır. Biz bu işlemi, 50µl reaksiyon hacminde gerçekleştirdik. Bu amaçla aşağıda belirtilen molar konsantrasyonlarda reaksiyonu kurduk:

1. 1 x tampon solüsyon(10x PCR buffer)
2. 1,5 mM MgCL₂
3. 0,25 mM dNTP
4. 0,3 mM primer I
5. 0,3 mM primer II
6. 2,5 U Taq polimeraz (5 u/µl)
7. 100 ng kalıp DNA koyarak gerçekleştirdik.

IL-12p40 geninin 233 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölgesi PCR yöntemi ile primer I: 5'-TTC IAT CIG ATT TGC TTT A ve primer II: 5'-TGA AAC ATT CCA IAC ATC C ile 100ng genomik DNA kullanılarak 95 °C'de 30sn (denaturasyon), ardından 40 °C'de 30sn (hibridizasyon) , 72 °C'de 1 dakika (DNA sentezi) ve son olarak 72 °C'de 7 dakika süren bir döngü ile amplifiye edildi. Bu döngü 30 kez tekrarlandı. Amplifiye edilen ürünler %2'lik etidium bromür içeren agaroz jel elektroforezinde gözlendi.

PCR ürünlerinin temizlenmesi:

Elde edilen ürünler fenol/kloroform yöntemiyle temizlendi ve DNA; IE (Iris-HCL, EDTA, dH₂O) ile çöktürüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. 50µl fenol kloroform ile 50µl PCR ürünü (5µl su+ 45µl PCR ürünü) karıştırıldı.
2. Karışım vortexlendi ve 13,000 rpm 'de 2 dakika çevrildi.
3. Üstteki renksiz faz alınıp, alttaki renkli faz atıldı.

4. Renksiz fazın üstüne, 10 M'lık Na asetat'tan volümün 1/10'u kadar (5µl) konuldu
5. Bu karışımın üzerine, son volümün 2-2,5 katı saf alkol (soğuk) konuldu
6. -70 °C'de 30 dakika bekletildi.
7. 30 dakika sonunda yine 13,000 rpm.'de 15 dakika çevrildi
8. Tüpteki sıvı kısım dökülüp, tüp içine soğuk %70'lik alkol konuldu. 13,000 rpm'de 2 dakika çevrildi.
9. Santrifüj sonunda tüpler ters çevrilerek peletin kuruması sağlandı.
10. 20µl distile su ile pelet çözöldü.

RFLP Analizi:

PCR ile amplifiye edilmiş ürünleri Taq I kesim enzimi ile aşağıda belirtilen koşullarda kesildi:

- Distile su:
- Taq I: 0.7 µl (10u/µl)
- Buffer (10x buffer)

5-9 µl'lik PCR ürünü 65 °C'de 5 saat süreyle Taq I ile işleme maruz bırakıldı. Ürünler etidyum bromür ile boyanmış %3'lük agaroz jelde görüntölendi. Taq I enzimi mutant kişilerde elde edilen DNA'yı 165 bp. ve 68 bp.lik 2 fragmana ayırırken, normal kişilerde kesim olmamaktadır. Dolayısı ile, kesim olup olamamasına göre genotiplendirme yapılmıştır.

ARMS-PCR Yöntemi:

Polimorfizmlerin, nadir varyantların ve mutasyonların belirlenmesi için çok değişik hastalıklarda kullanılmıştır. Hızlı, kolay, ucuz olması ve radyoaktif madde kullanılmaması önemli avantajlarıdır. Nokta mutasyonların tespit edilmesi için geliştirilmiş bir tekniktir. Burada mutasyona uyan veya uymayan nükleotidlere uygun sentetik nükleotid dizileri eşliğinde PCR yapılır (93). Bu çalışmada IL-10 promotor bölgesinde -1082'de G-A polimorfizmini araştırmak için ARMS-PCR yöntemi kullanıldı.

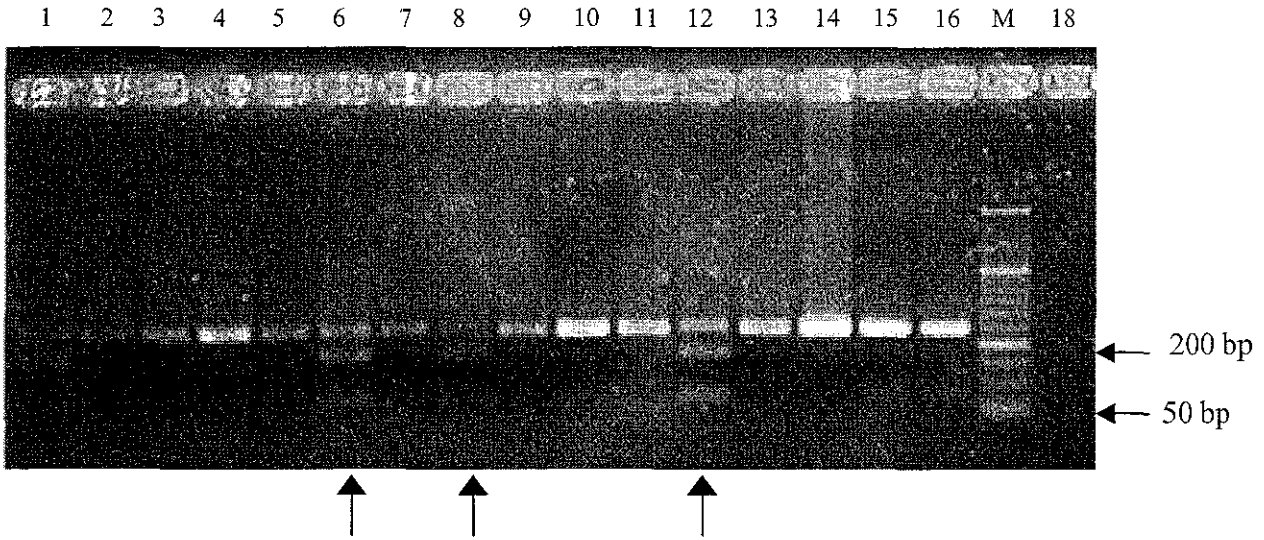
Bu amaçla; -1082 pozisyonundaki G-A polimorfik bölgesine uyumlu 2 adet primer sentez edildi (Primer I: CTA CTA AGG CTT CTT TGG GAG, Primer II: CTA CTA AGG CTT CTT TGG GAA) (52). Bu iki primerin özelliği ; 3' ucundaki son bazdaki değişikliktir. Ortak bir Revers primer (CTT GAA TTA AAT TGG CCT TAGA)

yardımıyla Primer I veya II kullanılarak aşağıda belirtilen koşullara PCR reaksiyonu kuruldu:

- Her bir primerden 20 pmol/ml
- 100ng DNA
- 5mM MgCl₂ içeren tampon solüsyon
- 2,5 U Taq polimeraz

Ürünler PCR ile 30 döngü amplifiye edildi (95 °C'de 15 sn, 65 °C'de 50 sn, 72 °C'de 40sn).

Bu durumda PCR reaksiyonunun annealing ısısı çok yüksek tutulduğundan ancak tam uyum halinde amplifikasyon gözlenebilmektedir. Bu nedenle -1082 pozisyonundaki baz G olan kişilerde sadece Primer I kullanıldığında ürün alınabilmekte, A olan kişilerde ise Primer II ile ürün alınabilmektedir. Her kişi için her iki primer kullanılarak 2 ayrı reaksiyon kurulmuş ve oluşan ürünlere göre genotiplendirilme yapılmıştır (sadece primer I'den ürün oluşan kişiler GG homozigot, sadece primer II'den ürün oluşan kişiler AA homozigot, her iki primerle de ürün elde edilen kişiler GA heterozigot olarak değerlendirilmiştir). Bu yöntemde PCR şartlarını kontrol etmek amacıyla, ayrıca bir internal kontrol kullanılmıştır. Primerler: TGC CAA GTG GAG CAC CCA A ve Revers primer: GCA ICT TGC TCT GTG CAG AT'dir.



Şekil-6: 18 hastanın IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi: PCR ürünleri Taq I enzimi ile kesilmiştir. Sıklıkla görülen “AA” genotipinde kesim gözlenmezken, “AC” genotipinde kesilmiş (165 + 68 bp) ve kesilmemiş (233 bp) ürünler bir arada görülmektedir (6, 8, ve 12). M: 50 bp DNA markırı.

İstatistiksel Analiz:

Polimorfizm ve allel frekanslarını değerlendirmede X^2 testi kullanıldı. Ayrıca cins, hastalık şiddeti, hastalık süresi, polimorfizm karşılaştırmaları için Pearson korelasyon testi uygulandı.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 56 hastanın ve kontrol gruplarının IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi için genetik dağılımı ve allel frekansları Tablo-3 ve 4'de verildi. Hastaların; IL-10 G-1082A polimorfizmi için genotipleri incelendiğinde; hastalardan 2 (%3,5)'si AA homozigot, 40 (%71)'ı AG heterozigot, 14 (%25)'ü ise GG homozigot bulundu. A alleli frekansı; 44 (%39), G allel frekansı 68 (%61) tesbit edildi. Kontrol grubunun ise; 5 (%6)'i AA homozigot, 63 (%76)'ü AG heterozigot ve 14 (%17)'si GG homozigot bulundu. Kontrol grubunda A allel frekansı; 73 (%45), G allel frekansı 91 (%55) idi. MS'li hastalar ve kontrol grubunun genotipleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($P > 0.05$).

IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi için genotipler incelendiğinde ise; hastaların 40 (%71,4)'ı AA homozigot, 15 (%26,7)'i AC heterozigot, 1 (%1,8)'i ise CC homozigot bulundu. A allel frekansı 95 (%85), C allel frekansı ise 17 (%15) idi. 82 kişiden oluşan kontrol grubunda ise; 55 (%72,3) kişi AA homozigot, 20 (%26,3) kişi AC heterozigot ve 1 (%1,3) kişi CC heterozigot tesbit edildi. Bu grupta A allel frekansı; 130 (%85) ve C allel frekansı 22 (%44) idi. IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi için MS'li hasta ve kontrol grubu genotipleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($P > 0.05$).

Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarında IL – 10 ve IL – 12 polimorfizmi genotip frekansları

Polimorfizm	MS, n (%)	Kontrol, n (%)	P
IL – 10 (- 1082)			
AA	2 (3,5)	5 (6)	0,507
AG	40 (71)	63 (76)	0,474
GG	14 (25)	14 (14)	0,256
IL – 12 (1188)			
AA	40 (71,4)	55 (72,3)	0,905
AC	15 (26,7)	20 (26,3)	0,952
CC	1 (1,8)	1 (1,3)	0,827

Tablo 4. Hasta ve kontrol gruplarında IL-10 ve IL-12 allel frekansları

Allel Frekansı	MS, n (%)	Kontrol, n (%)	P
IL – 10 (- 1082)			
A	44 (39)	73 (45)	0,388
G	68 (61)	91 (55)	0,388
IL – 12 (1188)			
A	95 (85)	130 (85)	0,873
C	17 (15)	22 (14)	0,873

Ayrıca; her iki gende araştırılan polimorfik bölgelerin, MS'li kadın ve erkeklerdeki oranı incelendi (Tablo - 5). IL-10 G-1082A polimorfizmi için kadınlardaki genotip dağılımı; 24 (%42,8) hastada AG heterozigot, 8 (%14,2) hastada GG homozigot idi. Hiçbir kadın hastada AA homozigot genotipine rastlanmadı. Kontrol grubunda ise; 3 (%3,6) kişi AA homozigot, 40 (%48,7) kişi AG heterozigot ve 9 (%10,9) kişi GG homozigot idi. MS'li erkek hastaların ise; 2 (%3,5)'si AA homozigot, 16 (%28,5)'sı AG heterozigot ve 6 (%10,7)'sı GG heterozigot bulundu. Kontrol grubundaki erkeklerin; 2 (%2,4)'si AA homozigot, 23 (%28)'ü AG heterozigot ve 5 (%6,1)'i GG homozigot idi.

IL-12p40 1188 A-C polimorfizmi için MS'li kadınların genotipleri incelendiğinde ise; 22 (%39,2) hastada AA homozigot, 10 (%17,8) hastada AC heterozigot ve sadece 1 (%1,8) hastada CC homozigot geni tespit edildi. Kontrol grubunun ise; 36 (%47,3)'sı AA homozigot, 14 (%18,4)'ü AC heterozigot ve 1 (%1,3)'i CC homozigot bulundu. Erkek hastaların: 18 (%32,1)'inde AA homozigot, 5 (%8,9)'inde AC heterozigot genotipi bulunmasına karşılık hiçbirinde CC homozigot genotipine rastlanmadı. Kontrol grubunda ise; 19 (%25) kişi AA homozigot, 6 (%7,8) kişi AC heterozigot tespit edildi. Benzer şekilde, kontrol grubunda da CC homozigot genotipine rastlanmadı. Sonuç olarak; MS'li kadın ve erkeklerde genotip frekansları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0,05$).

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre genotip dağılımı

	MS (n=56)		Kontrol (IL-10, n=82) (IL-12, n=76)	
	K	E	K	E
IL-10				
AA	0 (%0)	2 (%3,5)	3 (%3,6)	2 (%2,4)
AG	24 (%42,8)	16 (%28,5)	40 (%48,7)	23 (%28)
GG	8 (%14,2)	6 (%10,7)	9 (%10,9)	5 (%6,1)
IL-12				
AA	22 (%39,2)	18 (%32,1)	36 (%47,3)	19 (%25)
AC	10 (%17,8)	5 (%8,9)	14 (%18,4)	6 (%7,8)
CC	1 (%1,8)	0 (%0)	1 (%1,3)	0 (%0)

IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmlerinin hastalık süresi ve dizabilite skoru ile ilişkisini saptamak için; EDSS skoru 0-3,5 arasında olan hastalar hafif MS, 3,5 ve üstü olan hastalar ise orta-ağır MS olarak sınıflandırıldı. MS'de hastalık tipi; hastalık başlangıcından 10 yıl sonra kesin olarak tanımlanabilir (10). Bu nedenle; hastalık şiddeti ve süresi ile genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bu iki gruptaki hastalık süresi 10 yıldan az ve 10 yıl üzerinde olan hastaların genotip frekansları karşılaştırıldı (Tablo 6-7). Hastalık şiddeti ve hastalık süresi açısından farklılık saptanmadı. ($p > 0.05$).

Tablo 6. EDSS ve hastalık süresine göre IL-10 genotip dağılımı

Genotip	MS Hastası, n (%)	EDSS (0-3,5), n (%)	EDSS (3,5 ve), n (%)	Hastalık süresi > 10 yıl ve EDSS (0-3,5), n (%)	Hastalık süresi > 10 yıl ve EDSS (3,5 ve), n (%)
IL - 10 AA	2 (% 3,5)	2 (% 3,5)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)
IL - 10 AG	40 (% 71,3)	32 (% 57,1)	8 (% 14,2)	9 (% 16)	6 (% 10,7)
IL - 10 GG	14 (% 25)	13 (% 23,2)	1 (% 1,8)	5 (% 9)	0 (% 0)

Tablo 7. EDSS ve hastalık süresine göre IL-12 genotip dağılımı

Genotip	MS Hastası, n (%)	EDSS (0-3,5), n (%)	EDSS (3,5 ve), n (%)	Hastalık süresi > 10 yıl ve EDSS (0-3,5), n (%)	Hastalık süresi > 10 yıl ve EDSS (3,5 ve), n (%)
IL - 12 AA	40 (% 71,4)	33 (% 58,9)	7 (% 12,5)	9 (% 16)	3 (% 5,3)
IL - 12 AC	15 (% 26,7)	13 (% 23,2)	2 (% 3,5)	5 (% 9)	2 (% 3,5)
IL - 12 CC	1 (% 1,8)	1 (% 1,8)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)

5. TARTIŞMA

MS immunopatogeneğinde pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sistem arasındaki dengenin bozulması önemli rol oynamaktadır. Bu dengeyi sağlayan sitokinlerden en çok üzerinde durulanlar; IL-10 ve IL-12'dir (3, 5, 6, 7, 9, 10, 52). IL-12; T hücre yanıtının TH-1'e kaymasını sağlayarak majör pro-inflamatuar etki gösterir (3, 26, 52). IL-10 ise; IL-12'nin dominant endojen inhibitörüdür (37).

Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada; MS'li hastalarda stabil ve aktif hastalık döneminde IL-10 ve IL-12 düzeyleri araştırılmıştır (20, 21, 26, 28-32, 38, 39, 42, 43). Van Boxel-Dezaire ve ark.larının çalışmasında; MS'de atak öncesinde IL-10 düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (26). Rieckmann ve ark.ları ile Özenci ve ark.larının yaptığı iki ayrı çalışmada ise, stabil seyirli MS hastalarında IL-10 salınımını yapan lökositlerde artış saptanmıştır (42, 43). IL-12 düzeylerinin incelendiği iki çalışmada; MS'in aktif döneminde, BOS'da ve periferik kan mononükleer hücrelerinde IL-12p40 düzeyinde artış saptanmıştır (20, 21). Bir diğer çalışmada; progresif MS hastalarında da, IL-12 üreten monositlerin yüzdesi, normallere göre yüksek bulunmuştur (30).

İkiz çalışmaları; IL-10 üretiminin yaklaşık %75'inin genetik kontrol altında olduğunu göstermiştir (94). IL-10'un -1082 pozisyonundaki promotor polimorfizmi; IL-10'un transkripsiyonel düzeyini regüle edebilir. İn vitro çalışmada; IL-10 geninin -1082 pozisyonunun AA veya AG genotiplerinin, GG genotipinden daha az seviyede IL-10 üretimine neden olduğu bulunmuştur (95). Buna uygun olarak başka bir invitro çalışma; AA genotipinin az üretici olabileceğini, AG'nin orta düzeyde ve GG'nin ise yüksek düzeyde üretime neden olabileceğini göstermiştir (96). Bu nedenle, IL-10 polimorfizmi; MS'in dizabilite progresyonu ile fonksiyonel olarak ilişkili olabilir.

Bu bilgiler temel alınarak, bu çalışmada; IL-10 geni -1082 pozisyonu ve IL-12p40 geni 1188 pozisyonunda üretim düzeyini etkileyen polimorfizmlerin varlığı, hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi ve cinsiyet ile ilişkisi araştırıldı.

Çalışmada ilk olarak; 56 hasta ve 82 kişiden oluşan kontrol grubunda, IL-10 G-1082A polimorfizmi genotipleri ile G ve A allel frekansları incelendi. Her iki grup arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Dolayısı ile; IL-10 promotor polimorfizmi ile hastalığa yatkınlık arasında ilişki saptanmadı. Bu gözlem; Myhr ve ark.larının 168 MS hastası ve 87 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (5). Bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak; IL-10 promotor

bölgesinde -1082 dışında, -819 ve -592 pozisyonlarındaki polimorfizme de bakılmış ve her üç bölge için anlamlı fark bulunmamıştır (5). De Jong ve ark. ları ise; 163 MS hastasında IL-10 promotor bölgesinde -3575, -2849, -2763, -1082 ve -819 pozisyonlarındaki polimorfizmlerin hastalığa yatkınlık ile ilişkisi olmadığını göstermişlerdir (39). Yine, Maurer ve ark. ları; 181 MS hastasında allel frekansların incelemişler ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir (6). Luomala ve ark. larının 2003 yılında yayınladıkları çalışma sonuçları da, IL-10 G-1082A polimorfizminin hastalığa yatkınlık ile ilişkili olmadığını desteklemiştir (10).

Bu çalışmada; IL-10 G-1082A polimorfizminin MS'e yatkınlığa etkisi yanında hastalık dizabilite skoru ve hastalık süresi üzerine etkisi de araştırıldı. Bunun için hastalar, EDSS skoruna (0-3,5 arası ve 3,5 üzeri olmak üzere 2 grup) ve hastalık süresine (10 yılın üzerinde ve altında olmak üzere 2 grup) göre gruplandırıldı. Gruplar arasında AA, AG ve GG genotip dağılımı, kontrol grubu ile benzer bulundu. Dolayısı ile IL-10 G-1082A polimorfizmi ile hastalık dizabilitesi ve süresi arasında ilişki saptanmadı. Farklılık olmamasının nedeni; total hasta sayısı ve 10 yıldan uzun süreli olgu sayısının az olması ile ilişkili olabilir. Ayrıca; IL-10 üretiminin düzenlenmesinde birden fazla gen ve çevresel faktörler rol oynadığı için, sitokin üretimindeki değişiklikler tek bir gen polimorfizmi ile belirlenemeyebilir (39). Bu bulgular; Maurer ve ark. larının bulguları ile uyumludur (6). Bu konuda yapılmış en geniş araştırma, Luomala ve ark. larının yaptığı çalışmadır (10). Bu çalışmada; bizim gözlemlerimizin tersine, IL-10 -1082 polimorfizminin AG genotipi taşımasının şiddetli MS riskini azalttığı ve bu etkinin hastalık süresi uzun olanlarda daha belirgin hale geldiği gözlemlendi. IL-10'un yüksek düzeyde üretilmesine neden olan GG genotipinin koruyucu değil de, orta düzeyde üretimi kontrol eden AG genotipinin koruyucu bulunması ilginçtir (10). Yani; orta düzeyde IL-10 seviyesi, hastalık süpresyonu için yüksek düzeyde IL-10 seviyesinden daha etkilidir. Bu sonuç; Crohn hastalığında IL-10 tedavisi çalışmalarının sonuçları ile uyumludur ve IL-10'un yüksek dozlarının TH-1 sitokinleri sitokinlerinin salınımını arttırdığı bulgusu ile kısmen açıklanabilir (97, 98, 99). Aynı çalışmada ayrıca, AA genotipinin hastalık süresi 15 yıldan uzun olan şiddetli MS hastalarında daha yüksek oranda bulunduğu gösterildi (10). Pickard ve ark. ları ise; EDSS'si 0-5.5 arasında olan hastalarda IL-10 AG genotipinin, EDSS'si 6-10 arası olanlardan daha fazla olduğunu bildirdi (7). Bu bulgular, önceki çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

Bizim çalışmamızda ayrıca, IL-12p40 1188 A-C polimorfizminin hastalığa yatkınlık ve dizabilite skoru ve hastalık süresi üzerine etkisi değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubu arasında AA, AC ve CC genotip dağılımı ve allel frekansı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Yine, bu genotiplerin hastalık dizabilite skoru ile ilgili olduğu yönünde veri elde edilemedi. Literatürde, MS'de IL-12 polimorfizmini araştıran tek çalışma vardır. İngiltere'de yapılan bir çalışmada; 77 MS hastasında IL-12p40 geni 1188 pozisyonunda tek nükleotid polimorfizminin hastalığa yatkınlık ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (52). Bizim çalışmamızın sonuçları, bu sonucu desteklemektedir.

Çalışmamızda; IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C genotip oranlarının cinsiyet ile ilişkili olup olmadığına da bakıldı. Kadın veya erkek grubunda hastalığa yatkınlığı belirleyebilecek bir genotip tespit edilmedi. Bizim çalışmamız, bu iki sitokin grubunun genotiplerinin cinsiyet ile ilişkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Literatürde; MS'de kadın ve erkekte pro-inflamatuar ve antinflamatuar sitokinlerin karşılaştırıldığı tek çalışma, Nguyen ve ark. larının yaptığı çalışmadır (4). Bu çalışmada; RRMS ve SPMS'li 47 (30 K/ 17 E) hastada IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10 ve TGF- β düzeyleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, RRMS'li erkeklerde TNF- α üreten hücreler, kadınlara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MS'li kadınlarda ise, IFN- γ üreten hücrelerin düzeyi ile EDSS arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Her iki cins arasında IL-10 üreten hücrelerin düzeyi arasında fark bulunmamıştır (4).

Bu çalışmada; anti-inflamatuar sitokin IL-10 G-1082A ve pro-inflamatuar sitokin IL-12 1188 A-C polimorfizminin hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi ve cinsiyeti ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Çalışmanın orijinalliği; Türk popülasyonunda ilk kez bu polimorfizmlerin araştırılmasıdır. Ayrıca, literatürde MS hastalarında IL-10 ve IL-12 genetik polimorfizminin birlikte araştırıldığı başka bir çalışma yoktur. MS immunopatogenezinde IL-10 ve IL-12 arasındaki dengenin bozulması önemli rol oynadığı için, bu iki sitokin polimorfizminin aynı hasta grubunda incelenmesi hastalığın immunopatogenezi açısından oldukça değerlidir. Ancak hasta sayımızın az olması, istatistiksel değerlendirmelerimizi sınırlandırmış olabilir. Bu nedenle, MS popülasyonunda daha fazla sayıda hasta ile yapılan benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Multipl skleroz, toplumun özellikle genç erişkinlerini etkilemesi ve kalıcı sekel bırakabilmesi nedeniyle nörolojik hastalıklar arasında önemli bir yere sahiptir. Etyolojide birçok sebep öne sürülmekle birlikte; bugün için en çok üzerinde durulan otoimmün mekanizmadır. Son yıllarda, etyopatogeneizde rol oynadığı düşünülen pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu sitokinlerden pro-inflamatuar etkili IL-12 ve anti-inflamatuar etkili IL-10 arasındaki dengenin bozulması, MS immunopatogenezinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda; akut atak öncesi IL-10 düzeyinin azaldığı, IL-12 düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bu sitokinlerin düzeylerindeki değişikliklerin genetik kontrol altında olduğu düşünülmektedir. Özellikle IL-10 geni -1082 pozisyonu ve IL-12p40 geni 1188 pozisyonunda üretim düzeyini etkileyen polimorfizmlerin olduğu öne sürülmektedir.

Bu çalışmada; MS hastalarında IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizminin varlığı, hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi ve cinsiyet ile ilişkisi araştırıldı. Çalışmaya, 32'si kadın, 24'ü erkek olmak üzere 56 MS hastası alındı. Kontrol grubu; IL-10 polimorfizmi için 52'si kadın, 30'u erkek olmak üzere toplam 82, IL-12p40 polimorfizmi için 51'i kadın, 25'i erkek olmak üzere toplam 76, yaş ve cinsiyet uyumlu, herhangi bir inflammatuar ve genetik hastalığı olmayan kişilerden oluşturuldu. Genotip frekanslarını tespit edebilmek için; IL-10 için ARMS-PCR, IL-12p40 için RFLP-PCR yöntemi kullanıldı.

Bu polimorfizmlerin hastalığa yatkınlık ile ilişkisini incelemek için; hasta ve kontrol gruplarında IL-10 için AA, AG ve GG frekansları ve A, G allel frekansları, IL-12p40 için ise AA, AC ve CC genotip frekansları ile A, C allel frekansları karşılaştırıldı. Her iki gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmlerinin hastalık süresi ve dizabilite skoru ile ilişkisini saptamak için; EDSS skoru 0-3,5 arasında olan hastalar hafif MS, 3,5 ve üstü olan hastalar ise orta-ağır MS olarak sınıflandırıldı. Ayrıca hastalar, hastalık süresine göre; 10 yıl altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hastalık süresi ve dizabilite skorları ile genotip frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Ek olarak; her iki gende araştırılan polimorfik bölgelerin, MS'li kadın ve erkeklerdeki oranı, kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı

Sonuç olarak; bu çalışmada Türk MS populasyonunda, IL-10 G-1082A ve IL-12p40 1188 A-C polimorfizmlerinin, hastalığa yatkınlık, dizabilite skoru, hastalık süresi ve cinsiyet ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Çalışmanın orijinalliği; Türk populasyonunda ilk kez bu polimorfizmlerin araştırılmasıdır. Ayrıca, literatürde IL-10 ve IL-12 genetik polimorfizminin birlikte araştırıldığı başka bir çalışma yoktur. MS immunopatogenezinde IL-10 ve arasındaki dengenin bozulması önemli rol oynadığı için, bu iki sitokin polimorfizminin aynı hasta grubunda incelenmesi hastalığın immunpatogenezi açısından oldukça değerlidir. Ancak daha fazla sayıda MS hastası ile yapılan benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Multipl Skleroz, IL-10, IL-12, Polimorfizm, Hastalığa Yatkınlık, Dizabilite Skoru, Hastalık Süresi, Cinsiyet

KAYNAKLAR

1. Miller JR. Multiple sclerosis. In: Rowland LP (ed), Merrit's Neurology, tenth edition, William & Wilkins, 2000: 773-792
2. İdman E. Santral Sinir Sisteminin Myelin Hastalıkları. İçinde: Oğul E (ed): Klinik Nöroloji. Nobel & Güneş Tıp Kitabevleri, Bursa, 2002: S 159-170.
3. Karp CL, van Boxel-Dezaire AHH, Brynes AA, Nagelkerken L. Interferon-B in Multiple Sclerosis: altering the balance of interleukin-12 and interleukin-10?. Current Opinion in Neurology 2001; 14: 361-368.
4. Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Baier M, Brownschidle C, Jakobs LD. Sex differences in invitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients. J Neurol Sci. 2003; 209(1-2): 93-99.
5. Myhr KM, Vagnes KS, Maroy Th, Aerseth JH, Hyland HI, Vedeler CA. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patient with multiple sclerosis. J Neurol Sci 2002; 202: 93-97.
6. Maurer M, Kruse N, Giess R, Toyka KV, Rieckmann P. Genetic variation at position- 1082 of the interleukin-10 (IL-10) promotor and the outcome of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2000;104 (1):98-100.
7. Pickard C, Mann C, Sinnott P, Boggild M, Hawkins C, Strange RC, et al. Interleukin-10(IL-10) promoter polymorphisms and multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1999; 101 (2): 207-10.
8. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. Renkli Genetik Atlası. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: S. 15-158.
9. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphism in allergies and asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 1958-1962.
10. Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hurme M, et al. Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 2003; 108: 396-400.
11. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon Beta-1a Subcutaneous in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind, placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Lancet 1998; 352: 1498-1504.

12. Olek MJ, Dawson DM. Multiple Sclerosis and Other Inflammatory Demyelinating Diseases of The Central nervous System. In Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD, (eds): Neurology in General Practice, Vol2, Butterworth-Heinemann, 2000: 1431-1465.
13. Turan ÖF. Multipl Skleroz. İçinde: Oğul E (ed): Klinik Nöroloji. Nobel & Güneş Tıp Kitabevleri, Bursa, 2002: S. 171-185
14. Gilroy J. Basic Neurology, third addition. The McGraw-Hill Companies, United States of America, 2000: 199-223
15. Azzimondi G, Stracciari A, Rinaldi R, D'Allessandro R, Pazzaglia P. Multiple sclerosis with very late onset: report of six cases and review of the literature. Eur Neuro 1994; 34 (6): 332-336.
16. Cohen IR. The self, the world and autoimmunity. In: Paul WE, (ed): Immunology: recognition and response. New York, Freeman, 1991: 99-108.
17. Herman A, Kappler JW, Morrack P, Pullen AM. Superantigens: Mechanisms of T cell stimulation and role in immune responses. Ann Rev Immunol 1991; 9: 745-42.
18. Dalakas MC. Basic aspects of neuroimmunology as they relate to immunotherapeutic targets: present and future prospects. Ann Neurol 1995; 37: 2-13
19. Hauser SL, Oksenberg JR. Demyelinating Diseases. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ, (eds): The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease, third edition. Butterworth-Heinemann, Philadelphia, 2003: 421-434
20. Sunnemark D, Eltayeb S, Wallstrom E, Appelsved L, Malmberg A, Lassmann H. Differential expression of the chemokine receptors CX3CR1 and CCR1 by mikroglia and macrophages in myelin-oligodendroglycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Pathol. 2003; 13(4):617-29.
21. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5 (+) and CXCR3 (+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 6873-6878.
22. Strunk T, Bubel S, Mascher B, Schlenke P, Kirchner H, Wandinger KP. Increased numbers of CCR5 (+) interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. Ann Neurol 2000; 47: 269-273.
23. Karabudak R. Multipl Skleroz İmmunopatolojisi Temel ve Klinik İmmunoloji Kursu-2002.

24. Martin R. Immunology of Multiple sclerosis. In: McDonald WI, Noseworthy JH (eds): Blue Books of Practical Neurology, Multiple sclerosis 2, Butterworth-Heinemann, Philadelphia, 2003: 33-59.
25. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987; 1: 893-895.
26. Van Boxel-Dezaire AHH, Hoff SCJ, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, et al. Decreased IL-10 and increased IL-12p40mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45: 695-703.
27. Balashov KE, Comabella M, Ohashi T, Khoury SJ, Weiner HL. Defective regulation of IFN gamma and IL-12 by endogenous IL-10 in progressive MS. *Neurology* 2000; 55: 192-198.
28. Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* 2000; 165: 4515-4521.
29. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stem AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/ interleukin12 receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 495-521.
30. Storkus WJ, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-12. In: Thomson A (ed): *The Cytokine Handbook*. Academic Press, San Diego CA, 1998: 390-475.
31. Özenci V, Kouwenhoven M, Press P, Link H, Huang YM. IL-12 ELISPOT assays to detect and enumerate IL-12 secreting cells. *Cytokine* 2000; 12: 1218-1224.
32. Caspi RR. IL-12 in Autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 4-13.
33. Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD. Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 736-741.
34. Özenci V, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Rinaldi L, Söderström M, Link H. IL-12/IL-12R system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001; 114: 242-252.
35. Fassbender K, Ragošchke A, Rossol S, Schwartz A, Mielke O, Paulig A, et al. Increased release of interleukin-12p40 in MS: association with intracerebral inflammation. *Neurology* 1995; 51: 753-758.
36. Makhlof K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12 + monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol* 2001; 119: 145-149.

- 37 Dhib-Jalbut S, Wang X Interferon- β -1b inhibits interleukin-12 production in peripheral blood mononuclear cell through an interleukin-10 dependent mechanism In: Kappos L, Kesselring J, Johnson K, Radü EW (eds): Multiple sclerosis, Tissue Destruction and Repair. Martin Dunitz Ltd, London, 2001: 225-233.
- 38 Karp CL, Hiron CA, Irani DN Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunol Today* 2000; 21: 24-28
- 39 De Jong BA, Westendorp RG, Eskdale J, Uitdehaag BM, Huizinga TW Frequency of functional IL-10 promotor polymorphism is different between relapse-onset and primary progressive MS *Hum Immunol* 2002; 63 (4): 281-5
- 40 Almeras L, Meresse B, de Seze J, Lefranc D, Dubucquoi S, Fajardy I, et al Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 200-206
- 41 Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Pailoa F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, et al Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 Tcell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 1996; 183: 2559-2569
- 42 Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B Cytokine mRNA levels in mononuclear cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44: 1523-1526
- 43 Özenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Kivisakk P, Link H Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-10 secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN- β) treatment *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 147-153
- 44 Hensiek A, Roxburg R, Compston A Genetics of Multiple Sclerosis In: McDonald WI, Noseworthy JH (eds): Blue Books of Practical Neurology, Multiple Sclerosis 2 Butterworth-Heinemann, Philadelphia, 2003: 75-90
- 45 Sadovnick AD, Baird PA The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks of children and siblings of patients *Neurology* 1988; 38: 990-991.
- 46 Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH Multiple sclerosis: update risks for relatives *Am J Med Genet* 1988; 29: 533-541
- 47 Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA A population-based twin study of multiple sclerosis: update *Ann Neurol* 1993; 33: 282-285
- 48 Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe J, Miller D, Compston DAS The British Isles survey of multiple sclerosis in twins *Neurology* 1994; 44: 11-15.

49. Masterman T, Ligiers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA DR 15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 48:211-219.
50. Eraksoy M, Hensiek A, Kuntuncu M, Akman-Demir G, Kilinc M, Gedizlioglu M, et al. A genome screen for linkage disequilibrium in Turkish multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003 Oct; 143(1-2): 129-32.
51. Eraksoy M, Kuntuncu M, Akman-Demir G, Kilinc M, Gedizlioglu M, Mirza M, et al. A whole genome screen for linkage in Turkish multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003 Oct; 143 (1-2): 17-24.
52. Hall MA, McGlinn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton O, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p 40 gene in immune-mediated disease *Genes Immun.* 2000; 1(3):219-24.
53. Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease. *Acta Neurol Scand* 195; 161 (suppl): 34-42.
54. Goodin DS, Ebers GC, Johnson KP, Rodriguez M, Sibley WA, Wolinsky JS. The relationship MS to physical trauma and psychological stress. *Neurology* 1999; 52: 1737-1745.
55. Cantoma MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223 (3): 230-233.
56. Cantoma MT, Hayes CE, De Luca HF. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (15): 7861-7864.
57. O'Connor P. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2002; 59 (Suppl 3): 1-33.
58. Prineas JW. Pathology of multiple sclerosis. In: Cook SD (ed): *Handbook of multiple sclerosis.* 3rd ed. New York, Marcel Dekker, 2001: 289-324.
59. Raine CS. Demyelinating disease. In: David RL, Robertson DM (eds): *Textbook of neuropathology.* 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1991: 535-620.
60. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: result of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trial of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
61. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 1. Clinical course and disability. *Brain* 1989; 112: 133-146.

62. Rose MR, Ball JA, Thompson PD. Magnetic resonance imaging in tonic spasms of multiple sclerosis. *J Neurol* 1993; 241: 115-117.
63. Rodriguez M, Siva A, Cross SA, O'Brien PC, Kurland LT. Optic neuritis: A population-based study in Olmsted Country, Minnesota. *Neurology* 1995; 45: 244-250.
64. Feinstein A, du Boulay G, Ron MA. Psychotic illness in multiple sclerosis. A clinical and magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*. 1992; 161: 680-685.
65. Murary TJ. The psychosocial aspects of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1995; 13:197-223.
66. Perkin GD. *Mosby's Color Atlas and Text of Neurology* Second Edition. Mosby International Limited, London, 2002:197-215.
67. Caramanos Z, Santos AC, Arnold DL. Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy: Insights into the Pathology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. In: McDonald WI, Noseworthy JH (eds): *Blue Books of Practical Neurology, Multiple Sclerosis 2*. Butterworth- Heinemann, Philadelphia, 2003: 139-169.
68. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, Sormani MP, Wolinsky JS, Comi C, et al. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions into "black holes". *Neurology* 2001; 57: 731-733.
69. Arnold DL, Narayanan S, De Stefano N, Reddy H, Matthews PM. Magnetic resonance spectroscopy of multiple sclerosis: imaging axonal damage. In: Kappos L, Kesselring J, Radü EW, Johnson K (eds): *Multiple Sclerosis, Tissue Destruction and Repair*. Martin Dunitz Ltd, London, 2001: 77-97.
70. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-231.
71. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurology* 2001 Jul; 50 (1): 121-127.
72. Zipoli V, Portaccio E, Siracusa G, Pracucci G, Sorbi S, Amato MP. Interobserver agreement on Poser's and the new McDonald's diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003 Oct; 9 (5): 481-5.
73. Milligan NM, Newcombe R, Compston DAS. A double- blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50: 511-516.

74. Barkhof F, Hommes OR, Scheltens P, Valk J. Quantitative MRI changes in gadolinium –DTPA enhancement after high-dose intravenous methylprednisolone in multiple sclerosis. *Neurology* 1991; 41: 1219-1222.
75. Burnham JA, Wright RR, Dreisbach J, Murray RS. The effect of high dose steroid on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions. *Neurology* 1991; 41: 1349-1354.
76. Miller DH, Tompson AJ, Morrissey SP, McManus DG, Moore SG, Kendall BE. High dose steroids in acute relapses of multiple sclerosis: MRI evidence for a possible mechanism of therapeutic effect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 450-453.
77. Weinshenker B. Therapeutic plazma exchange. In: Rudick R, Goodkin D, (eds): *Multiple Sclerosis Therapeutics*, London: Martin Dunitz 1999; 323-333.
78. Rodriguez M, Karnes WE, Bartleson JD, Pineda AA. Plasmapheresis in acute episodes of fulminant CNS inflammatory demyelination. *Neurology* 1993; 43: 1100-1104.
79. Goodkin DE, Rudick RA, Vanderburg Medendorp S, Daughtry MM, Schwetz KM, Fischer J, et al. Low-dose (7,5 mg) oral methotrexate reduces the rate of progression in chronic progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995; 37: 30-40.
80. Achiron A, Gabbay U, Gilad R, Hassin-Baer S, Barak Y, Gornish M, Elizur A. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis: effect on relapses. *Neurology* 1998; 50: 398-402.
81. Van Engelen BG, Hommes OR, Pinckers A, Cruysberg JR, Barkhof F, Rodriguez M. Improved vision after intravenous immunoglobulin in stable demyelinating optic neuritis. *Ann Neurol* 1992; 32:834-835.
82. Sorensen P, Wanscher B, Jensen CV, Scheiber K, Blinkenberg M, Ravnborg M. Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 50: 1273-1281.
83. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS, and the European/ Canadian Glatiramer Acetate Study Group. European/ Canadian multicenter, double- blind, randomised, placebo-controlled study of the effect of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging- measured disease activity and burden in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 49: 290-297.
84. Comi G, Filippi M and the Copaxone MRI Study Group. The effect of glatiramer acetate (Copaxone) on disease activity as measured by cerebral MRI in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multi-center randomised, double-blind, placebo-controlled study extended by open-label treatment. *Neurology* 1999; 52 (suppl, 2): 289 Abstract.

85. Duddy M, Armstrong M, Crockard A, Hawkins S Changes in plasma cytokines induced by interferon- β 1a treatment in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; 101: 98-109
86. Durelli L, Ferrero B, Ghezzi A, Montanari E, Zaffaroni M, Bergui M, et al The Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial: a multicenter randomised trial comparing clinical and MRI efficacy of IFN beta-1a and beta-1b in multiple sclerosis *Neurology* 2001; 56 (supp 3): 148 Abstract
87. Coyle PK. Results of comparative efficacy trial using two formulation of interferon beta-1a in RRMS. *J Neurol Sci* 2001; 187: 436 Abstract
88. Secondary Progressive Efficacy Trial of Recombinant Interferon-beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group Randomised controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS. *Neurology* 2001; 56: 1496-1504
89. Goodkin D and the North American Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS: clinical and MRI results of a 3- year randomised controlled trial *Neurology* 2000; 54: 2352 Abstract
90. European Study Group on Interferon β -1b in Secondary Progressive MS Placebo-controlled multicentre randomized trial of interferon β -1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis *Lancet* 1998; 352: 1491-1497
91. Hyman N, Barnes M, Bhakta B, Cozens A, Bakheit M, Kreczy-Kleedorfer B, et al Botulinum toxin (Dysport) treatment of hip adductor spasticity in multiple sclerosis: a prospective, randomised, double-blind, placebo controlled, dose ranging study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68 (6): 707-712
92. Kurtzke JF Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS) *Neurology* 1983; 33: 1444-1452
93. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö Renkli Genetik Atlası Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: S 72-74
94. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verwelj CL, Sturk A Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170-173
95. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8
96. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE Interleukin-10 promoter polymorphism predict initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa *Hepatology* 1999; 30: 526-30

97. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 1473-82.
98. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 1461-72.
99. Montfrans van C, Fedorak RN, Gangl A. Anti- and proinflammatory effects of interleukin-10 in mild to moderate Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 116: 777 Abstract.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ