

# Multipl Sklerozda Normal Görünümlü Beyaz Maddenin Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi ile Değerlendirilmesi / *Evaluation of Normal Appearing White Matter by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Multiple Sclerosis*

Nihal Işık,<sup>1</sup> Fatma Candan,<sup>1</sup> Alp Dinçer,<sup>2</sup> Zahide Yılmaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Nöroloji Kliniği, İSTANBUL

<sup>2</sup>Bakırköy Radyotom ve Radyomar Görüntüleme Merkezi, İSTANBUL

## ABSTRACT

### **Evaluation of Normal Appearing White Matter by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Multiple Sclerosis**

**Background:** Recent pathological and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (P-MRS) studies have indicated that presence of axonal damage in normal appearing white matter (NAWM) may be an important cause of disability in multiple sclerosis (MS).

**Objectives:** To investigate the axonal damage in NAWM of MS patients by using P-MRS which determines the biochemical metabolites and in addition, to find the relationships between axonal damage and clinical parameters of relapsing remitting (RR) MS patients.

**Patients and Methods:** 57 MS patients (41 relapsing-remitting, 8 primary progressive; PP, and 8 secondary progressive; SP), and 10 healthy subjects as a control group, underwent cranial MR imaging (MRI) and single voxel P-MRS study. The metabolic ratios of N-acetylaspartate (NAA)/ creatine (cr), choline (Cho)/cr and myoinositol (mi)/cr in the NAWM of MS patients and in the normal white matter (NWM) of control group were determined. For the RR-MS patients, the associations between the NAA/cr ratios of NAWM, and clinical disability (EDSS) and disease duration were investigated.

**Results:** There were a significant decrease ( $p<0.01$ ) in NAA/cr ratios in

both NAWM of MS patients as a general group and subgroups, than control group, but no significant differences were found for the other metabolite ratios. The lowest NAA/cr ratio was detected respectively in PP-MS, SP-MS and RR-MS patients. The NAA/cr ratios of RR-MS patients were significantly negatively correlated ( $r = -0.29$ ,  $p<0.05$ ) with the EDSS, but not with the duration of disease. The NAA/cr ratios in both patients who had duration of disease  $\leq 5$  five years and more than 5 years, were found significantly lower than control group ( $p<0.05$ ).

**Conclusions:** In this study axonal damage, as assessed by decreased NAA/Cr ratios, found in NAWM of MS patients, supported the axonal damage in MS is not only confined to lesions and occurs even in the white matter which appears normal on cranial MRI. In addition to this, results of the RR-MS patients studied here, indicated that axonal damage in NAWM may be associated with disability.

## ÖZET

**Bilimsel zemin:** Son zamanlarda yapılan patoloji ve Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi (P-MRS) çalışmaları, Multipl sklerozda (MS) normal görünümlü beyaz madde (NGBM) de akson hasarı varlığının, dizabilitenin ortaya çıkmasında önemli bir neden olabileceğine dikkat çekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Multipl skleroz, normal görünümlü beyaz madde, aksonal zedelenme, proton manyetik rezonans spektroskopisi

**Keywords:** Multiple sclerosis, normal appearing white matter, axonal damage, proton magnetic resonance spectroscopy

## Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

Dr. Fatma Candan  
SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Nöroloji Kliniği, Göztepe-İSTANBUL  
Tel: 0216 566 40 00 / 1412-1413 candanfatma@hotmail.com

Dergiye Ulaşma Tarihi/Received: 20.12.2004  
Revizyon İsteme Tarihi/Sent for Revision: 30.12.2004  
Kesin Kabul Tarihi/Accepted: 25.09.2005

Bu çalışma 38. Ulusal Nöroloji Kongresinde (Antalya, 2002), Poster bildirisi olarak sunulmuş ve Demiyelinizan Hastalıklar Alanında üçüncülük ödülü almıştır.

**Amaçlar:** MS hastalarının NGBM’de, P-MRS ile biyokimyasal metabolitleri belirleyerek, aksonal zedelenmeyi araştırmak, ve buna ek olarak relapsing remitting (RR) MS hastalarının, klinik parametreleri ile aksonal zedelenme arasındaki ilişkiyi incelemektir.

**Hastalar ve yöntem:** 57 MS hastasına (41 relapsing-remitting, 8 primer progresif; PP, ve 8 sekonder progresif; SP), ve 10 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubuna, kranial MR görüntülemesi (MRG) ve single voxel P-MRS çalışmaları yapıldı. Hastaların NGBM’de ve kontrol grubunun normal beyaz maddesinde (NBM), N-asetilaspartat (NAA)/Kreatin (kr), Myoinositol (ml)/kr ve Kolin (Ko)/kr metabolit oranları belirlendi. RR-MS hastalarında, NGBM’de NAA/kr oranları ile klinik dizabilite (EDSS) ve hastalık süresi arasındaki ilişki incelendi.

**Bulgular:** MS hasta grubunda ve alt gruplarda NGBM’de NAA/kr oranı, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunurken ( $p<0.01$ ), diğer metabolit oranlarında bir farklılık bulunmadı. En düşük NAA/kr oranı, sırası ile PP-MS, SP-MS ve RR-MS hasta alt gruplarında görüldü. RR-MS hastalarında, NAA/kr oranı ile EDSS değerleri arasında anlamlı negatif bir korrelasyon saptanırken ( $r = -0.29$ ,  $p<0.05$ ), hastalık süresi ile bu oran arasında bir ilişki bulunmadı. Hastalık süresi  $\leq 5$  yıl olanlar ile, 5 yıldan fazla olan hastalarda NAA/kr oranı, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ( $p<0.05$ ).

**İzlenimler:** Bu çalışmada; aksonal zedelenmenin bir göstergesi olan düşük NAA/kr oranlarının MS hastalarının NGBM’de saptanması, MS’da aksonal zedelenmenin sadece lezyonlara sınırlı olmadığını ve kranial MRG’de normal görünen beyaz maddeyi de içine aldığını desteklemektedir. Buna ek olarak RR-MS hastalarında elde edilen veriler, NGBM’de olan aksonal zedelenme ile dizabilitenin ilişkili olabileceğine dikkat çekmektedir.

## GİRİŞ

Multipl Skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin inflamatuvar demyelinizan bir hastalığıdır, ve genç yetişkinlerde en sık nörolojik dizabilite nedenidir.<sup>(1)</sup> Son zamanlarda yapılan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve patoloji çalışmaları, akson kaybının hastalığın progresyonunda büyük bir rol oynadığına dikkat çekmişlerdir.<sup>(1-7)</sup> Aksonal zedelenmenin hastalığın başlangıcından itibaren geliştiği, fakat beyindeki kompensatuar mekanizmalar nedeni ile klinik olarak sessiz kaldığı, ve bu zedelenmenin lezyonlara uzak olan normal görünümlü beyaz madde de olabileceği bildirilmiştir.<sup>(1-4, 8-12)</sup>

Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi (P-MRS) ile in vivo ve noninvaziv olarak, beyinde etkilenen bölgelerdeki biyokimyasal metabolitleri değerlendirmek mümkündür, ve özellikle nöronal bir bileşik olan N-asetilaspartat (NAA), MS’da akson patolojisinin invaziv olmayan, en spesifik göstergesidir.<sup>(13-17)</sup> MRS çalışmaları; MS lezyonlarında ve hatta normal görünümlü beyaz madde de, NAA veya NAA/ kreatin (kr) oranlarında azalma gösterilerek, akson zedelenmesi veya kaybı olduğu, ve bunun da hastalığın patolojik

prosesinde yer aldığı bildirilmiştir.<sup>(16-22)</sup> MS’da lezyonlara oranla, normal görünümlü beyaz maddenin (NGBM) daha geniş bir alanı kapsadığı, ve böylece NGBM’de olan hafif bir patolojinin bile klinik dizabiliteyi etkileyebileceği düşünülmektedir.<sup>(18)</sup>

Bizim bu çalışmada amacımız; MS hastalarında NGBM’de, P-MRS ile biyokimyasal metabolitleri belirleyerek, aksonal zedelenmeyi araştırmak, ve buna ek olarak, relapsing remitting MS hastalarının, klinik parametreleri ile NAA/kr oranları arasındaki ilişkiyi incelemektir.

## HASTALAR ve YÖNTEM

SSK Göztepe Eğitim Hastanesi MS polikliniğinde takip edilen, Poser ölçütlerine göre<sup>(23)</sup> klinik olarak kesin MS tanısı alan, 57 MS hastasına (34 kadın, 23 erkek) ve 10 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuna (7 kadın, 3 erkek), Kranial MRG ve P-MRS incelemeleri yapıldı. Bütün hastaların; hastalık süreleri ve klinik dizabiliteleri-EDSS (Expanded Disability Status Scale)<sup>24</sup> değerleri ile belirlendi. Hastalar klinik gidişlerine göre alt gruplara<sup>(25)</sup> ayrıldığında 41’i Relapsing Remitting MS (RR-MS), 8’i Primer Progresif MS (PP-MS) ve 8’i de Sekonder Progresif MS (SP-MS) grubunda yer alıyordu.

### Kranial MRG ve P-MRS Çalışmaları

Hastalarda ve kontrol grubunda, Kranial MRG ve Single voxel P-MRS incelemeleri eş zamanlı olarak yapıldı. Kranial MRG, 1.5 T scanner (Signa Hi Speed, GE medical systems, Milwaukee, WI) kullanılarak, sagittal SE (spin echo) T<sub>1</sub> ağırlıklı, transverse SE T<sub>1W</sub> ve FSE (fast spin echo) PD (proton density)-T<sub>2</sub> ağırlıklı, koronal FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) görüntüleri alındı. Yağ baskılı Transverse SE T<sub>1</sub> ve Koronal SE T<sub>1</sub> görüntüleri intravenöz 0.1 mmol/kg gadopontetate dimeglumine (Magnovist, Schering, Berlin, Germany) verilmesinden sonra alındı.

Single voxel P-MRS çalışmaları, PROBE/SV software (GE, Milwaukee, WI) kullanılarak yapıldı, ve böylece kendiliğinden parlama, suyun baskılanması ve verilerin değerlendirilmesi mümkün oldu. T<sub>2</sub>-W aksial

ve FLAIR koronal görüntüleri beyaz madde de voxel yerleştirmek için kullanıldı. Ortalama voxel alanı yaklaşık 8 cm<sup>3</sup> olarak hesaplandı.

NGBM'de uzun ve kısa TE spektraları Point Resolved Spektroskopi (PRESS) (TR:2000 ms, TE 140 ve 30ms, 96-128 acquisitions) kullanılarak yapıldı. Ham verilerin makinada değerlendirilmesinden sonra, spektra kalitatif ve kantitatif olarak hesaplandı. NAA/kreatin (kr), Koline (Ko)/kr, myoinositol (ml)/kr değerleri, pik yapan bölgelerin oranları kullanılarak ölçüldü. Sağlıklı kontrol grubunun, normal beyaz maddesi (NBM) içinde aynı protokol uygulandı.

Resim 1A ve B'de bir MS hastasının, ve Resim 2A ve B'de ise kontrol grubuna ait bir kişinin, T<sub>2</sub>-ağırlıklı aksial kesitleri ve P-MRS'leri gösterildi.

### Biyokimyasal çalışmalar

MS hastalarında genel grup olarak ve hastalık alt tiplerinde NGBM'de, NAA/kr, Ko/kr, ml/kr oranları belirlendi. Aynı metabolitler kontrol grubunun NBM'de belirlendi. RR-MS hastalarında NAA/kr oranları ile EDSS ve hastalık süresi arasında ki ilişki incelendi.

### İstatistik çalışmaları

Bu çalışmada Graph Pad Prisma V.3 paket programı kullanıldı. Gruplar arasında Kruskal Wallis testi, alt

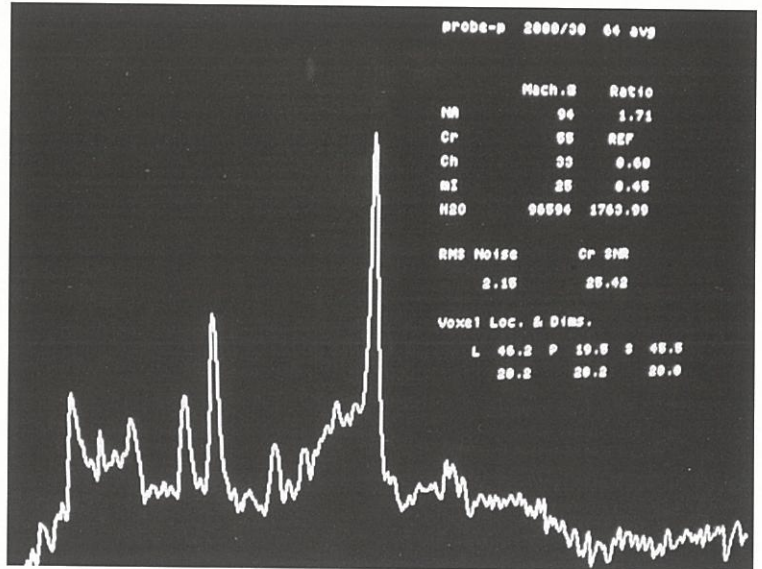
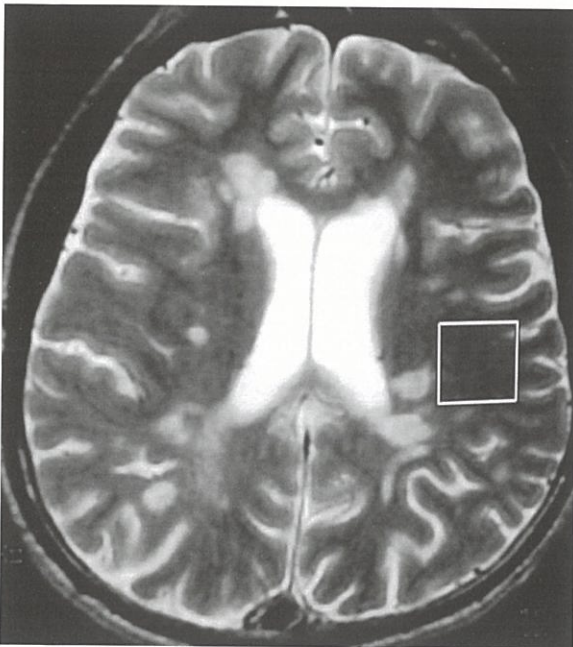
grup karşılaştırmalarında Dunn's Çoklu Karşılaştırılma testi, ikili grup karşılaştırmalarında ise Man.Whitney-U testi kullanıldı. Değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkileri Pearson Korrelasyon testi ile değerlendirildi. P <0.05, anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

### BULGULAR

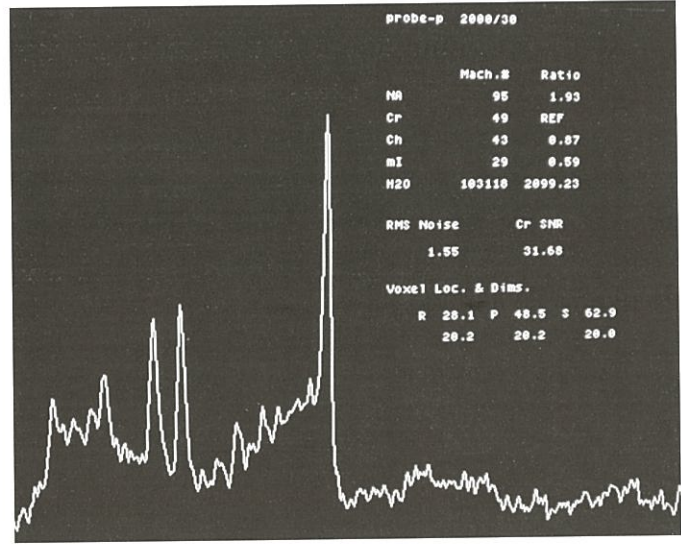
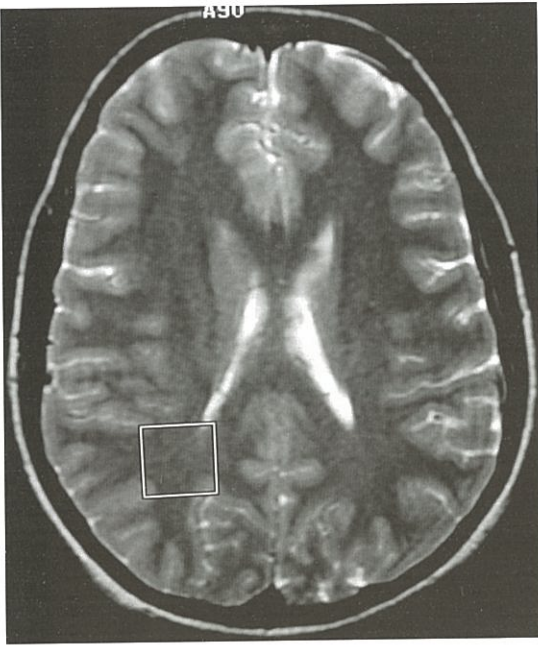
MS hasta grubuna (N=57) ait yaş ortalaması (36.14±8.54) ile kontrol grubunun (N=10) yaş ortalaması (33.85±5.96) arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). Hasta grubunun ortalama hastalık süresi 6.42±3.47 yıl (2 -14 yıl) ve ortalama EDSS değeri 2.68±1.76 ( 2.0-6.0) bulundu.

MS hastalarında NGBM'de NAA/kr oranı, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunurken (p<0.01), ml/kr ve Ko/kr oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik bulunmadı (p>0.05) (Tablo 1).

MS hasta alt gruplarında NGBM'de NAA/kr oranı, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu (p<0.01), ve en düşük değerler sırası ile PP-MS, SP-MS ve RR-MS hasta grubunda gözlemlendi (Tablo 2). Alt grupların ml/kr ve Ko/kr oranları ile kontrol grubunun değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05, Tablo 2). MS hasta alt gruplarının NGBM'de NAA/kr oranları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi (Tablo 3).



Resim 1A ve B. Bir RR-MS hastasına ait Kranial MRG'de T<sub>2</sub>-ağırlıklı aksial kesit ve P-MRS görüntüleri.



**Resim 2A ve B.** Kontrol grubuna ait Kranial MRG'de T2-ağırlıklı aksial kesit ve P-MRS görüntüleri.

**Tablo 1.** MS hasta grubunda ve kontrol grubunda metabolitlerin karşılaştırılması.

	MS Hastaları (N=57) NGBM	Kontrol Grubu (N=10) NBM	MW	p
NAA/kr	1.64±0.19	1.88±0.18	106	<0.01
ml/kr	0.73±0.12	0.67±0.06	183.5	>0.05
Ko/kr	0.92±0.16	0.98±0.09	212	>0.05

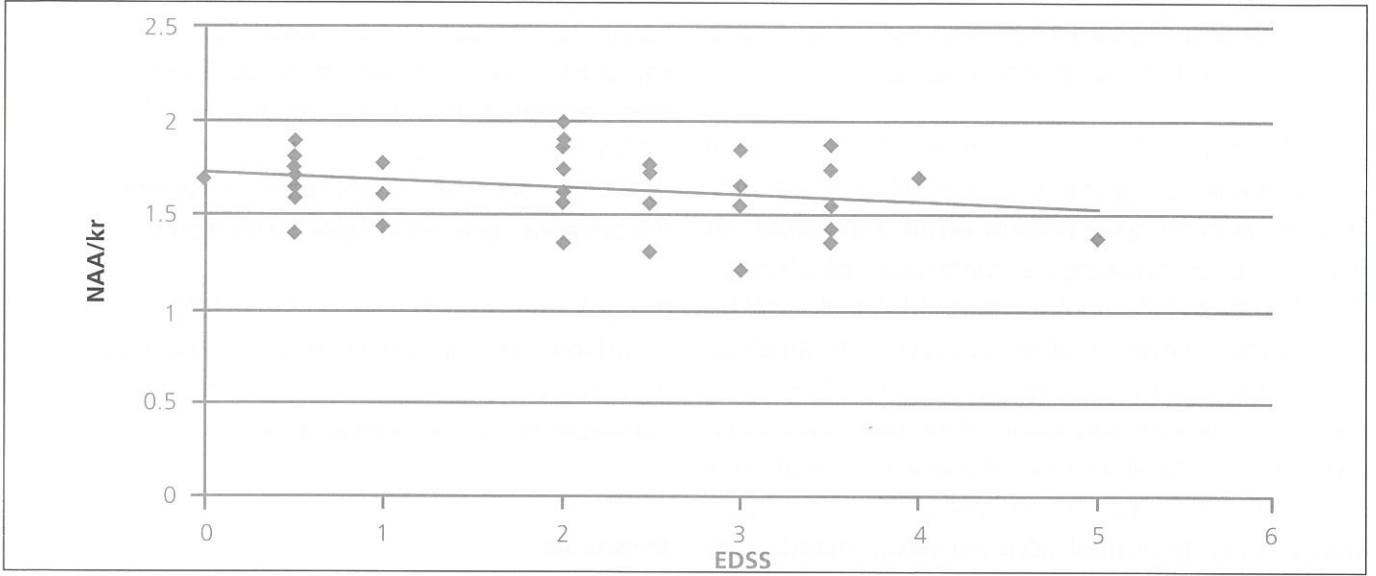
**Tablo 2.** MS hasta alt grupları ve kontrol grubunda metabolitlerin karşılaştırılması

	PP-MS (N=8)	SP-MS (N=8)	RR-MS (N=41)	Kontrol Grubu (N=10), NBM	KW	p
NAA/kr	1.56±0.26	1.61±0.13	1.66±0.18	1.88±0.18	9.92	<0.01
ml/kr	0.77±0.12	0.74±0.15	0.72±0.12	0.67±0.06	3.19	>0.05
Ko/kr	0.97±0.16	1.01±0.19	0.89±0.16	0.98±0.09	1.65	>0.05

**Tablo 3.** MS hasta alt gruplarının NAA/kr oranlarının ikili gruplar halinde karşılaştırılması

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi (NAA/kr)	P value
RR / PP	P > 0.05
RR / SP	P > 0.05
PP / SP	P > 0.05
RR / Kontrol	P < 0.05
PP / Kontrol	P < 0.05
SP / Kontrol	P < 0.05

RR-MS hastalarında, NGBM'de NAA/kr oranları ile EDSS arasında, anlamlı negatif bir ilişki bulundu. ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.29$ , Grafik 1).



**Grafik 1.** RR-MS hastalarında EDSS ile NAA/kr oranları

RR-MS hastaları, hastalık süresi  $\leq 5$  yıl olanlar ve 5 yıldan fazla olanlar şeklinde iki gruba ayrıldığında (Tablo 4 ve 5), her iki grupta da NGBM'de NAA/kr oranı, kontrol grubuna göre anlamlı düşük

bulunurken ( $p < 0.05$ ), tüm RR-MS grubunda hastalık süresi ile NAA/kr oranı arasında anlamlı bir korrelasyon saptanmadı ( $p > 0.05$ ,  $r = -0.03$ ).

**Tablo 4.** RR-MS hastalarının hastalık süresine göre ayrılması ve kontrol grubu

	Hastalık süresi $\leq 5$ yıl (N=22)	Hastalık süresi $> 5$ yıl (N=19)	Kontrol Grubu (N=10)	KW	p
NAA/kr	1.67 $\pm$ 0.19	1.64 $\pm$ 0.17	1.88 $\pm$ 0.18	6.16	<0.05

**Tablo 5.** RR-MS hasta grubunda, hastalık süresine göre NGBM NAA/kr oranlarının ikili karşılaştırılması

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi (NAA/kr)	P value
$\leq 5$ Yıl / $> 5$ Yıl	$P > 0.05$
$\leq 5$ Yıl / $>$ Kontrol	$P < 0.05$
$> 5$ Yıl / $>$ Kontrol	$P < 0.05$

## TARTIŞMA

Multipl Sklerozda kranial MRG, makroskopik lezyonları göstermede yüksek duyarlılıktadır, fakat mikroskopik değişikliklerin (aksonal zedelenme, küçük inflamasyon veya demyelinizasyon odakları gibi), makroskopik lezyonların dışına uzanıp uzanmadığını göstermede duyarsızdır.<sup>(16,18,19)</sup> P-MRS

ise MS'da lezyonlar ve NGBM ile ilişkili patolojinin karakterizasyonu için kimyasal bir gösterge sağlar.<sup>(16-18)</sup>

Multipl sklerozda patoloji incelemelerinde, lezyonlarda belirgin olmak üzere NGBM'de aksonal zedelenme görülmüş, ve P-MRS ile bu bölgelerde NAA veya NAA/kr oranı düşük seviyelerde bulunmuştur.<sup>(1,8-10,16-22)</sup> Bunlara ek olarak, MS'da NGBM'de anormallikler

olabileceği, bu bölgede Magnetizasyon Transfer oranının artması, T<sub>1</sub>-ağırlıklı görüntülerde anormal hipointens sinyallerinin olması, water-diffizyon katsayılarındaki değişiklikler ve progresif beyaz madde atrofisinin görülmesi ile de öne sürülmüştür.<sup>(26-29)</sup>

Bu çalışmada, MS hastalarının NGBM'de aksonal zedelenmenin bir göstergesi olan NAA/kr oranının, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunması, ve diğer incelenen biyokimyasal metabolitlerde (ml/kr ve Ko/kr) bir değişiklik saptanmaması, MS'da aksonal bir zedelenme veya disfonksiyonun, inflamatuvar lezyonların dışına uzanabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuç, MS'da patolojinin heterojen olduğunu, myelinin yanında aksonların zedelenmesini ve aksonal zedelenmenin sadece lezyonlarla sınırlı kalmadığını, kranial MRG'de normal görünen beyaz maddeyi de içine aldığını desteklemektedir.<sup>(11,16-20,30)</sup> NGBM'de olan aksonal zedelenmenin mekanizması büyük oranda bilinmemektedir.<sup>(30)</sup> Bunun, lezyonlarda ki akson kaybına sekonder olarak mı (wallerian dejenerasyonu veya lezyonlardan açığa çıkan, yayılabilir nörotoksik faktörler aracılığı ile), veya daha yaygın primer bir akson patolojisinden dolayı ortaya çıktığı henüz belli değildir.<sup>(1,2,9,30,31)</sup>

Çalışmamızda dikkat çeken diğer bir bulgu, MS hasta alt gruplarında NGBM'de NAA/kr oranının kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunması ve en belirgin azalmanın PP-MS hasta grubunda olmasıydı. Bu azalma, PP-MS hastalarında daha fazla aksonal zedelenmenin bir göstergesi olabilirdi. PP-MS hastalarında yaygın primer bir aksonal zedelenmenin olabileceği patolojik bir prosesin, bu hastalarda diğer alt gruplara oranla kranial MRG'de görülebilir lezyonların azlığına rağmen, artmış olan dizabiliteyi açıklayabileceği öne sürülmektedir.<sup>(20,32)</sup>

Son zamanlarda yapılan MRS çalışmalarında, NGBM'de saptanan aksonal zedelenmenin, klinik dizabilitede önemli bir rolü olabileceği bildirilmiştir.<sup>(10,11,15-17)</sup> NGBM'de NAA veya NAA/kr oranındaki değişiklikler ile klinik dizabilite arasındaki ilişki, RR-MS hasta grubunda, diğer progresif gidiş gösteren hastalara göre daha güçlü bulunmuş ve bu hastalarda aksonal zedelenmenin hastalığın erken

döneminde ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür.<sup>(17-19)</sup> Bizim çalışmamızda ise RR-MS hastalarının NGBM'de NAA/kr oranları ile klinik dizabilite arasında anlamlı negatif bir ilişki bulunurken, hastalık süresi ile böyle bir ilişki bulunmadı. Fakat, hastalık süresi 5 yıl veya daha az olan hastalarda, kontrol grubuna göre anlamlı düşük NAA/kr oranının bulunması, RR-MS hastalarında NGBM'de aksonal zedelenmenin hastalığın sonraki dönemlerine sınırlı olmadığını düşündürdü.

Bu çalışma, MS hastalarında NGBM'de aksonal hasarlanmanın olabileceğine ve bu hasarlanma ile dizabilitenin ilerlemesi arasında önemli bir ilişki olabileceğine dikkat çekmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal Transection in the Lesions of the Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 1998; 338: 278-85.
2. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 1997; 120: 393-399.
3. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain.* 2002;125: 2202-2212.
4. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis: correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 2000; 123: 1174-1183.
5. Truyen L, van Waesberghe JH, van Walderveen MA, et al. Accumulation of hypointense lesions ("black holes") on T<sub>1</sub> spin-echo MRI correlates with disease progression in multiple sclerosis. *Neurology.* 1996; 47: 1469-76.
6. Barkhof F, Karas GB, van Walderveen MA. T1 hypointensities and axonal loss. *Neuroimaging Clin N Am.* 2000; 10: 739-52.
7. Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, et al. A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2001; 49: 793-6.
8. Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology.* 2001; 57: 1248-52.
9. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2000; 47: 391-5.
10. Evangelou N, Konz D, Esiri MM, et al. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain.* 2000; 123: 1845-1849.
11. Bjartmar C, Kidd G, Ransohoff RM. A real-time insight into

- disease progression and the role of axonal injury in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2001; 58: 37-40.
12. Giordana MT, Richiardi P, Trevisan E, Boghi A, Palmucci L. Abnormal ubiquitination of axons in normally myelinated white matter in multiple sclerosis brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002; 28: 35-41.
  13. Simmons ML, Frondoza CG, Coyle JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience*. 1991; 45: 37-45.
  14. Moffett JR, Namboodiri MA, Cangro CB, Neale JH. Immunohistochemical localization of N-acetylaspartate in rat brain. *Neuroreport*. 1991; 2: 131-4.
  15. Bjartmar C, Battistuta J, Terada N, Dupree E, Trapp BD. N-acetylaspartate is an axon-specific marker of mature white matter in vivo: a biochemical and immunohistochemical study on the rat optic nerve. *Ann Neurol*. 2002; 51: 51-8.
  16. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain*. 1998; 121: 1469-1477.
  17. Sarchielli P, Presciutti O, Pelliccioli GP, et al. Absolute quantification of brain metabolites by proton magnetic resonance spectroscopy in normal appearing white matter of multiple sclerosis patients. *Brain*. 1999; 122: 513-21.
  18. Fu L, Matthews PM, De Stefano N, et al. Imaging axonal damage of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain*. 1998; 121: 103-113.
  19. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001; 58: 65-70.
  20. Leary SM, Davie CA, Parker GJM, Stevenson VL, et al. 1H Magnetic resonance spectroscopy of normal appearing white matter in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol*. 1999; 246: 1023-1026.
  21. Husted CA, Goodin S, Hugg JW, et al. Biochemical alterations in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter detected by in vivo 31P and 1H spectroscopic imaging. *Ann Neurol*. 1994; 36: 157-165.
  22. Davie CA, Barker GJ, Thompson AJ, et al. 1H magnetic resonance spectroscopy of chronic cerebral white matter lesions and normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997; 63: 736-742.
  23. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983; 13: 227-231.
  24. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33: 1444-1452.
  25. Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. Multiple sclerosis in clinical practice. First Ed. London: Martin Dunitz; 2003: 59-61.
  26. Miller DH, Johnson G, Tofts PS, et al. Precise relaxation time measurements of normal appearing white matter in inflammatory central nervous system disease. *Magn Reson Med*. 1989; 11: 331-336.
  27. Filippi M, Campi A, Dousset V, et al. A magnetisation transfer imaging study of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology*. 1995; 45: 478-482.
  28. Loevner LA, Grassman RI, Cohen JA, et al. Microscopic disease in normal appearing white matter on conventional MR images in patients with multiple sclerosis: assessment with magnetization-transfer measurements. *Radiology*. 1995; 196: 511-515.
  29. Horsfield MA, Lai M, Webb SL, et al. Apparent diffusion coefficients in benign and secondary progressive multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Med*. 1996; 36: 393-400.
  30. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Laboratory Investigation*. 2001; 81: 263-281.
  31. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol*. 1994; 36: 778-786.
  32. Thompson AJ, Kermode AG, Wicks D, et al. Major differences in the dynamics of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1991;29:53-62.