

# Tümör Nekrozis Faktör-Alfa Tek Başına Multipl Sklerozda Relapsın Habercisi Değildir

Egemen İdiman<sup>1</sup>, Hakkı Bahar<sup>2</sup>, İhsan Şükrü Şengün<sup>1</sup>, Göksemin Acar<sup>3</sup>, Barış Baklan<sup>1</sup>, Murat Sayan<sup>2</sup>, Huriye Aydın<sup>1</sup>, Tuncer Toklu<sup>2</sup>, Serkan Özakbaş<sup>1</sup>

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ABD<sup>1</sup>, Klinik Mikrobiyoloji ABD<sup>2</sup> ve Karşıyaka Nöroloji Polikliniği<sup>3</sup>, İZMİR

## ÖZET

**Bilimsel Zemin:** Multipl skleroz'da hastalık aktivitesine spesifik bir belirteç günümüzde mevcut değildir.

**Amaç:** Bu nedenle, tümör nekrozis faktör-a (TNF- $\alpha$ )'nın multiple skleroz (MS)'da relapsları önceden haber verip vermediğini belirlemek ve interferon b (IFN- $\beta$ ) tedavisinin TNF- $\alpha$  üretim kapasitesini nasıl etkilediğini saptamak üzere bu longitudinal prospektif çalışma planlandı.

**Materyal ve Metod:** Çalışmaya alınan 36 RRMS hastası dört gruba ayrıldı. Grup Ia (n=10) relaps geçiren ve IFN b tedavisi almayan, Grup Ib (n=16) remisyonunda olan ve IFN  $\beta$  tedavisi almayan, Grup IIa (n=5) relaps geçiren ve IFN  $\beta$  tedavisi alan, Grup IIb (n=5) remisyonunda olan ve IFN  $\beta$  tedavisi alan hastalardan oluşturuldu. Ortalama 16 haftalık izlem süresinde periyodik olarak kan örnekleri toplandı ve örnekler fitohemagglütinin ile stimüle edildi. Aktive plazma örneklerinde ELISA yöntemiyle TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi ölçüldü.

**Bulgular:** Çalışma boyunca toplam 139 TNF- $\alpha$  piki saptandı ve sadece 9 pik 7 hastada atağı haber verdi. Diğer 130 pikin %9.2'si olasılıkla solunum yolu enfeksiyonu, %4.6'sı menstrüel dönem ve %0.76'sı allerjik reaksiyonla ilişkili bulundu. Relaps dışında saptanan bu 130 pikin %85'inde neden saptanamadı. Çalışma boyunca remisyonunda kalan ve IFN- $\beta$  tedavisi alan grupta (Grup IIb) ortalama TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi, remisyonunda kalan ve tedavi almayan hastalara (Grup Ib) göre daha düşüktü (p<0.05).

**İzlenimler:** Elde edilen bu veriler TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinin interferon  $\beta$  tedavisinden etkilendiğini, ancak atakları haber vermede duyarlı bir belirteç olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** multipl skleroz, tümör nekrozis faktör-alfa, hastalık aktivitesi, interferon beta 1b.

**Yazışma Adresi:** Egemen İdiman

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir  
Tel: 0232 412 40 53

Dergiye Ulaşma Tarihi: 15.06.2003

Revizyon İstenme Tarihi: 19.09.2003

Kesin Kabul Tarihi: 12.11.2003

## ABSTRACT

**Tumour Necrosis Factor-Alpha Alone is not Predictive of Relapses in Multiple Sclerosis.**

**Background:** A specific marker of disease activity in multiple sclerosis (MS) has not yet been identified.

**Objective:** For this reason this longitudinal prospective study has been carried out in order to determine whether tumour necrosis factor-a (TNF- $\alpha$ ) is a predictor of relapse in MS patients and to evaluate the effect of interferon b (IFN- $\beta$ ) therapy on the TNF- $\alpha$  production capacity.

**Material and Methods:** Thirty-six relapsing remitting MS (RRMS) patients were included in the study and divided into four groups. Group Ia consisted of 10 relapse presenting patients who were not receiving IFN- $\beta$ 1b. In Group Ib (n=16), the patients were remitting RRMS without any medication. Group IIa (n=5), consisted of patients who were under IFN- $\beta$ 1b therapy and presented relapse. In Group IIb, there was 5 remitting MS patients receiving IFN- $\beta$ 1b. Blood samples were collected once a week for about 16 weeks and the samples are stimulated by phytohemagglutinine. The TNF- $\alpha$  production capacity of the activated white blood cells was measured by the ELISA method.

**Findings:** A total of 139 TNF- $\alpha$  peaks were determined during the follow up and only 9 peaks predicted relapses in 7 RRMS patients. The other 130 TNF- $\alpha$  peaks were possibly related with infections of the respiratory tract (9,2 %), menstrual period (4,6%) and allergic reactions (0,76 %). No reasons could be determined in the 85% of the 130 peaks. The mean TNF- $\alpha$  production capacity of the Group IIb was lower than Group Ib (p<0,05).

**Conclusion:** The results of this study indicated that TNF- $\alpha$  production capacity was affected by IFN- $\beta$ 1b treatment, but the periodical measurement of TNF  $\alpha$  production capacity in RRMS patients did not seem to be a sensitive marker in predicting the relapses.

**Key words:** multiple sclerosis, tumour necrosis factor-alpha, disease activity, interferon-beta 1b.

\*Bu çalışmanın ilk sonuçları 35. Ulusal Nöroloji Kongresi'nde sunulmuştur (24-28 Ekim 1999, Kuşadası).

## GİRİŞ

Multipl skleroz (MS) periferde miyelin basic protein (MBP)'e karşı duyarlı T lenfositlerin santral sinir sistemi (SSS)'ne göç ederek self antijen olan miyelini hasara uğrattıkları otoimmün inflamatuvar bir hastalıktır<sup>(1)</sup>. İmmün hücreler ve onların ürünleri olan sitokinler, T lenfositlerin gerek periferde duyarlılaşmasında, SSS'ne göçünde, gerekse SSS'nde miyelini harap etmesinde önemli rol oynarlar<sup>(1)</sup>. İmmunkompetan hücreler tarafından üretilen çeşitli sitokinler arasında TNF- $\alpha$  ve IL-1b endotel hücre fonksiyonlarını modifiye eden, inflamasyonun önemli araçlarıdır<sup>(1-4)</sup>. Keza TNF- $\alpha$ 'nın oligodendrosit kültürlerinde toksik etkisi olduğu<sup>(5,6)</sup> ve astrosit proliferasyonunu stimüle ettiği<sup>(6)</sup> gösterilmiştir. Birçok çalışmada relapsing-remitting multipl skleroz (RRMS)'da atak ve remisyon dönemlerinde<sup>(2,4,7,8)</sup> primer progresif MS (PPMS)'de hastalığın seyri sırasında<sup>(7,9)</sup> serum ve BOS'daki sitokin konsantrasyon değişiklikleri incelenmiş ve bu değerler atak ya da prognozu belirlemede bir belirteç olarak kullanılmaya çalışılmıştır. Ancak günümüzde MS'de aktivite belirteci olarak kullanılabilen bir biyolojik parametre mevcut değildir.

Beck ve ark<sup>(10)</sup> hastalığın yeni bir atağını belirlemede periferik kan hücrelerinin IFN- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  ürünleme kapasitesindeki artışın önemli bir tanı belirteci olabileceğini iddia etmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda hastalığı monitörize etmede ve relapsı belirlemede TNF- $\alpha$  ve IL-1 ürünlemek üzere stimüle edilmiş periferik kan hücrelerini değerlendirmenin hastalığın çeşitli dönemlerini belirlemede önemli bir tanı aracı olabileceğini bildirilmiştir<sup>(4)</sup>. Chofflon ve ark.'nın başka bir çalışmasında da TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinin periodik ölçümünün relapsları önceden haber vermede yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip bir yöntem olduğu iddia edilmektedir.<sup>(3)</sup>

Bu prospektif longitudinal çalışmanın amacı, stimüle edilmiş periferik beyaz kan hücrelerinin TNF- $\alpha$  ürünleme kapasitesini ölçmek, bu parametrenin klinik relapsın önceden saptanmasında belirleyici olarak kullanılıp kullanılamayacağını saptamak ve interferon  $\beta$ 'nın TNF- $\alpha$  ürünleme kapasitesi üzerine etkisini belirlemektir.

## MATERYAL VE METOD

### Hastalar

Bu çalışmaya, Poser ve ark.'nın<sup>(11)</sup> kriterlerine göre kesin MS tanısı almış relapsing-remitting seyirli 36 hasta alındı. Hastalar dört gruba ayrıldı. Grup Ia (n=10) relaps geçiren ve IFN  $\beta$  tedavisi almayan hastalardan oluştu. Bu 10 hastanın 5'i atak sırasında çalışmaya alınırken, diğer 5'i ise çalışma

süresi içinde atak geçirdi. Grup Ib'deki (n=16) hastalar çalışma boyunca remisyonunda olan ve IFN  $\beta$  tedavisi almayan hastalardı. Grup IIa' daki (n=5) relaps geçiren ve IFN  $\beta$  tedavisi alan hastaların 3'ü atak sırasında çalışmaya alındı, diğer 2'sinde ise izlem sırasında atak gelişti. Grup IIb (n=5) çalışma boyunca remisyonunda kalan ve IFN  $\beta$  tedavisi alan hastalardan oluştu. Relaps geçiren tüm hastalar 5 gün boyunca i.v. metilprednizolon tedavisi uygulandı.

### Longitudinal İnceleme

Takip süresince (ortalama 15,84 $\pm$ 4,39 hafta) haftada 1 kez hastaların ayrıntılı klinik muayeneleri olmak üzere yapıldı ve Kurtzke EDSS'ye göre skorlandı. Yirmidört saatten uzun süren ve EDSS skorunda bir ya da daha fazla puan artışına neden olan bir ya da birden çok semptom ve bulgunun gelişmesi (yeni yada eski belirtilerin kötüleşmesi) objektif atak olarak değerlendirildi.

### Örneklerin Toplanması ve tam Kan Stimülasyonu

Tüm hastalardan haftada bir, atak geçiren hastalardan tedavi öncesinde ve tedavi boyunca 1.,2.,3.,4.,5. günlerde ve daha sonra yine haftada bir olmak üzere venöz kan alındı. Serum örnekleri sabah saat 08-09 arasında hastalar açken alındı. EDTA'lı tüplere alınan 2ml venöz kan örneği 10 $\mu$ g/ml fitohemaglutinin (FHA) ile 370C 'de 2 saat inkübe edildikten sonra santrifüj edildi ve elde edilen aktive plazma çalışma gününe kadar -700C' de saklandı.

### Sitokin Değerlendirmesi

Periferik kan hücrelerinin TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri immunoradyometrik olarak incelendi. 125I ile işaretlenmiş antisitokin antikorlar ile aktive plazma örnekleri oligoklonal sistem ile kaplanmış propiletillen tüplerde 12 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra antikor ile bağlanmış fraksiyon bir gamma sayıcısıyla sayıldı, rekombinant sitokinin standart bağlanma eğrisiyle ilişkili olarak sitokin seviyesi pikogram/ml olarak ifade edildi<sup>(3)</sup>.

TNF- $\alpha$  PİKİ: Çalışma boyunca remisyonunda kalan ve interferon kullanmayan 16 hastanın (Grup Ib) ortanca TNF- $\alpha$  değeri (73pg/ml) belirlendi. Analizin güvenilir olabilmesi için bu değer iki katı (146pg/ml) eşik değer olarak kullanıldı ve bu değer üzerindeki ölçümler TNF- $\alpha$  piki olarak kabul edildi.

### TNF- $\alpha$ İndeksi

TNF ürünlenmesinin atakla ilişkisini belirlemek üzere aşağıda formülü verilen indeks kullanıldı ve her iki grupta TNF- $\alpha$  indeksi ayrı ayrı hesaplandı.

TNF- $\alpha$  ürünlenme indeksi = Relapsta ortalama TNF- $\alpha$  ürünlenmesi/ Remisyonda ortalama TNF- $\alpha$  ürünlenmesi

### İstatistikler ve Değerlendirme

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda nonparametrik Wilcoxon ve Mann Whitney U testleri kullanıldı.

### SONUÇLAR

Hastaların demografik özellikleri Tablo 1’de sunulmuştur. Grup Ib’nin TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi Grup IIb’den daha yüksek bulundu (Tablo 2) (Mann-Whitney-U,  $p<0.05$ ). Ancak Grup Ia ile Grup IIa arasında ne TNF- $\alpha$  indeksleri ne de TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 2). Grup Ia ve IIa’nın TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri relapsın ilk gününde remisyon dönemlerine göre daha düşük bulundu ( $p<0.05$ ). İntravenöz metilprednizolon tedavisi boyunca her iki grubun TNF- $\alpha$  üretim kapasitelerindeki düşüş devamlılık gösterdiyse de 0. ve 5. günler arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 3). Çalışma boyunca toplam 139 TNF- $\alpha$  piki saptandı ve bunlardan 9’u, 7 hastada objektif relapstan yaklaşık 1-30 gün önce yüksek bulundu. Başka bir deyişle, TNF- $\alpha$ ’nın periyodik ölçümü toplam 16 atak geçiren hastanın (Grup Ia ve IIa) 7’sinde (%43,5) atağı önceden haber verdi. Piklerin %93,5’i ataklarla ilişkisiz bulundu. Hastaların çoğunluğunda gözlenen bu TNF- $\alpha$  yükselmelerini açıklayabilecek olası nedenler Tablo 4’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Hastaların demografik özellikleri.

	GRUP I (n=26)	GRUP II (n=10)
Yaş	35.4±10	32.1±8.3
Cinsiyet	5 erkek, 21 kadın	10 kadın
Ortalama hastalık süresi (yıl)	5.9±6.7	6.3±4.1
Ortalama izlem süresi (hafta)	16.32±3.42	15.36±5.38
Çalışma başında ortalama	1.5±0.9	1.9±0.1

**Tablo 2.** Gruplara göre ortalama TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri (ÜK) ve TNF- $\alpha$  indeksleri sunulmuştur ( $p<0.05$ ).

GRUPLAR	Ortalama TNF- $\alpha$ ÜK (pg/ml)	TNF- $\alpha$ İndeksi
Grup Ia (n=10)	97.45±56	0,39
Grup Ib (n=16)	134.1±148*	---
Grup IIa (n=5)	120.2±54	0,42
Grup IIb (n=5)	89.9±103*	---

**Tablo 3.** Grup Ia ve IIa’nın remisyon döneminde, relapsın 0. ve 5. günlerindeki ortalama TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri sunulmuştur (\*, \*\* $p<0.05$ ).

	GRUP Ia (n=10)	GRUP IIa (n=5)
Remisyonda ortalama TNF- $\alpha$ üretim kapasitesi (pg/ml)	97.45±56*	120.54±54**
Relapsın 0. Gününde ortalama TNF- $\alpha$ üretim kapasitesi (pg/ml)	61±76*	33.3±33**
Relapsın 5. Gününde ortalama TNF- $\alpha$ üretim kapasitesi (pg/ml)	37.9±61.9	18.4±14

**Tablo 4.** Remisyonda saptanan artmış TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinin olası nedenleri gösterilmiştir.

	TNF- $\alpha$ Piki (%)
Enfeksiyon	9.2
Menstrüel dönem	4.6
Allerjik reaksiyon	0.76
Nedeni belirlenemeyen	85.4

### TARTIŞMA

Tümör nekrozis faktör-a immun hücrelerin ürettiği bir sitokindir. TNF- $\alpha$ ’nın en önemli hücre kaynakları makrofajlar olmasına rağmen T ve B lenfositler de aktive edildiklerinde TNF- $\alpha$  üretebilirler. TNF- $\alpha$  inflamatuvar reaksiyonlarda immun hücrelerin ekstrasvazasyonunu artırarak, T hücre aktivasyonunu kontrol ederek, yüzey antijenlerinin ekspresyonunu artırarak ve IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açarak etkisini gösterir. Sağlıklı bir SSS’de yalnızca nöronlar düşük seviyede TNF- $\alpha$  üretirken, travma, enfeksiyon (malarya, HIV, bakteriel lipopolisakkarid), iskemi ve otoimmün hastalıklarda astrosit ve mikroglia da nöronlarla birlikte yüksek miktarda TNF- $\alpha$  sentezleyebilir. Uzun süreli ve yüksek miktarda sentezlenen TNF- $\alpha$ ’nın SSS’nde hasara yol açtığı bilinmektedir. Özellikle MS’da TNF- $\alpha$ ’nın rolü hakkında birçok görüş ileri sürülmüştür. Yapılan birçok çalışmada TNF- $\alpha$ ’nın MS hastalarının beyin omurilik sıvılarında yüksek miktarda bulunduğu ve bunun da hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir.<sup>(1,12)</sup> Hatta artmış TNF- $\alpha$  üretiminin santral sinir sistemine sınırlı olmayıp MS’ li hastaların periferik mononükleer hücrelerinde de TNF- $\alpha$  ve lenfotoksin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir<sup>(13,14)</sup>. Bu sitokin artışının relapslarla ve relaps şiddetiyle ilişkili bulunması TNF- $\alpha$ ’nın bir hastalık aktivite belirteci olabileceğini düşündürmüştür.<sup>(2-4,8)</sup> Gerçekten de MS hastalarının kanlarında ölçülen TNF- $\alpha$  artışının relapsı ortaya çıkmadan önce haber verebileceği ve buna yönelik erken

tedavi yaklaşımlarının denenebileceği fikri geçen 10 yıl içinde oldukça fazla ilgi görmüştür. Bu hipotezi destekleyen iddialı sonuçlar olmakla birlikte elde edilen sonuçların başka araştırmalar tarafından tekrarlanmamış olması bu konuda dikkati çeken bir eksikliklerdir.<sup>(2-4,8)</sup>

Bu çalışmada otuzaltı MS hastasında ortalama 16 hafta boyunca periyodik olarak TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi ölçülmüş ve bu süre boyunca 139 TNF- $\alpha$  piki saptanmıştır. Bu piklerden ancak 9'u klinik ataktan 1-30 gün öncesinde saptanmış olup diğer 130 pikin de bir kısmı olasılıkla enfeksiyon, menstrüel dönem ya da allerjik reaksiyonlarla ilişkili bulunurken %85'inin nedeni belirlenememiştir. Bu çalışmada atak oluşan 16 hastanın yalnızca 7' sinde (%43.5) TNF- $\alpha$  piki atağı haber vermiştir. Oysa Chofflon ve ark.'nın<sup>3</sup> çalışmalarında MS' li hastaların TNF- $\alpha$  üretim kapasite ölçümünün relapsı %74.6 özgüllük ve %100 duyarlılıkla haber verdiği bildirilmektedir. Ayrıca, TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinin hem relapstan önce hem de relaps sırasında yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada yine Chofflon ve ark.'nın<sup>3</sup> çalışmasından farklı olarak remisyon dönemindeki TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi relapsın ilk gününde bazal seviyenin de altına düşmüştür. Olasılıkla klinik atağın başlamasından önce periferdeki immün aktif T lenfositler bozulan kan beyin bariyeri aracılığıyla santral sinir sistemine geçmekte ve periferden elde edilen örneklerde bu aktivasyona ilişkin deliller azalmakta ya da ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, relapsın 0. günü ile iv metiprednizolon tedavisinin 5. gününde ölçülen TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi arasında anlamlı bir fark olmaması, kortizon tedavisinin TNF- $\alpha$  ürünlenmesini etkilemediğini düşündürmüştür. Bilindiği üzere atak tek bir parametreye bağlı olmadığı için olasılıkla kortizon diğer immün moleküller (diğer sitokinler, kemokinler, MMP, adezyon molekülleri) üzerine etki gösteriyor olabilir.

Yapılan bu çalışmayı diğerlerinden ayıran en önemli fark interferon  $\beta$ 1b tedavisinin TNF- $\alpha$  ürünlenmesine etkisinin değerlendirilmesidir. Bilindiği gibi interferon  $\beta$ , otoimmün kaskadı tetikleyen antijen sunumunu inhibe ederek ve dolayısıyla da interferon- $\beta$ 'nın neden olduğu sitokin salınımını, MHC ve kostimulatör moleküllerin ekspresyonunu azaltarak etkisini göstermektedir.<sup>12,15</sup> Bu çalışmada izlem boyunca remisyonunda kalan ve interferon tedavisi gören hastaların TNF- $\alpha$  üretim kapasiteleri tedavi almayan gruba göre daha düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Elde edilen bu sonuç, herbir grup için belirlenen TNF- $\alpha$  üretim indeksleri ile korele olmamakla birlikte, immunomodulator tedavinin TNF- $\alpha$  üretim kapasitesini baskılayarak immunolojik atağı kısmen de olsa frenlediğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, periferik kan hücrelerinin TNF- $\alpha$  üretim kapasitesi ile klinik MS atağı arasında sıkı bir bağlantı olmadığı sonucunu göstermektedir. Bu veri literatürde bugüne kadar sunulan sonuçlarla uyumlu değildir. Atakta beklendiği üzere TNF- $\alpha$  üretim kapasitesinde bir artış saptanmamış, tersine klinik atak oluştuğunda üretim kapasitesinin düştüğü ve olasılıkla periferdeki immunolojik aktivasyonun klinik olarak atağın ortaya çıkışından önce sonlandığı gözlemlenmiştir. Bu veri interferon alan ve almayan hastalar için benzerlik göstermiş ve yine kortikosteroidin bu sitokinin ürünlenişini etkilemediği saptanmıştır. Belirtildiği üzere bu çalışmayı diğer çalışmalardan ayıran en önemli özellik, değerlendirmelerin hem interferon alan hem de almayan hastalarda yapılmış olmasıdır. Sonuçlarımız interferon- $\beta$ 'nın özellikle remisyon dönemlerinde immunolojik aktiviteyi baskıladığını ve immunomodülasyonun etkili olduğunu göstermektedir. Ancak ilaç alan hastalarda da atakların oluşması atağın ortaya çıkışında başka immün moleküllerin de sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Kan ya da beyin omurilik sıvısında periyodik sitokin takipleriyle relapsı önceden belirlemeye yönelik prospektif longitudinal çalışmaların standardize edilmesi oldukça güçtür ve sıkı hasta-hekim ilişkisi gerektirir. Ayrıca sitokin ürünlenmesi pek çok etmene bağlı olduğundan ve stabilizasyonu güçlüğünden dolayı kesin yorumlar yapmak her zaman mümkün olmamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis: principles, problems and perspectives. *Brain* 1997;120:865-916.
2. Chofflon M, Julliard C, Julliard P et al Tumor necrosis factor a production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur.Cytokine Netw* 1992;3:523-531.
3. Chofflon M, Roth S, Julliard C et al. Tumor necrosis factor production capacity as a potentially useful parameter to monitor disease activity in multiple sclerosis. *Eur.Cytokine Netw.* 1997;8:253-257.
4. Chofflon M, Felloy B. Monitoring multiple sclerosis course and activity with TNF-a. *Multiple Sclerosis* 1998;4:188-192.
5. Andrews T, Zhang P, Bhat NR. TNFalpha potentiates IFNgamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci Res.* 1998 Dec 1;54(5):574-83.
6. Cammer W. Effects of TNFalpha on immature and mature oligodendrocytes and their progenitors in vitro. *Brain Res.* 2000 May 12;864(2):213-9.
7. McDonnell GV, Kirk CW, Middleton D et al Genetic association studies of tumour necrosis factor alpha and beta and tumour necrosis factor receptor 1 and 2 polymorphisms across the clinical spectrum of multiple sclerosis. *J Neurol* 1999 Nov;246(11):1051-8.

- 
8. Van Oosten, Barkhof F, Scholten PET et al Increased production of tumour necrosis factor  $\alpha$ , and not of interferon  $\beta$  preceding disease activity in patients with multiple sclerosis.
  9. Killestein J, Den Drijver BF, Van der Graaff WL et al Intracellular cytokine profile in T-cell subsets of multiple sclerosis patients: different features in primary progressive disease. *Mult Scler* 2001 Jun;7(3):145-50.
  10. Beck J, Randot P, Catinot L et al. Increased production of interleukin gamma and tumour necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations ? *Acta Neurol Scand.* 1988;78(4):312-323.
  11. Poser CM, Patz DW, Scheinberg L et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis; guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231.
  12. Munoz Fernandez AM, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon  $\beta$  and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiology.* 1998;56:307-340.
  13. Navikas V, He B, Link J, Haglund M et al. Augmented expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Brain* 1996;119:213-223.
  14. Rieckmann P, Albrecht M, Kitzke B et al. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994;44:1523-1526.
  15. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. Mechanisms of action. *Neurology* 1998;51:682-689.