

Multipl Skleroz'da Sitokin Düzeyleri

Doç. Dr. A. Altıntaş
İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Nöroloji ABD

Uzm. Dr. O. Kantarcı
İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Nöroloji ABD

Doç. Dr. S. Saip
İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Nöroloji ABD

Prof. Dr. A. Siva
İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Nöroloji ABD

S. Öztuzcu
Pakize Tarzi Laboratuvarları

Doç. Dr. N. Hekim
Pakize Tarzi Laboratuvarları

Doç. Dr. P. Bozkurt
İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ABD

İletişim:

Doç. Dr. Ayşe Altıntaş
İncirli Cad. Dr. Salih Zeki Sok. Mutlu Apt. 13/9
34740 Bakırköy-İSTANBUL

Tel: 0.532.4258250-0.212.5716297

Fax: 0.212.6320050

Multipl Skleroz'da Sitokin Düzeyleri

ÖZET Multipl Skleroz (MS) tedavisinde interferon-beta'nın klinik kullanımının başlaması ile birlikte, bu hastalıkta sitokinlerin rolü üzerinde yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Yapılan çok sayıda laboratuvar ve klinik çalışma, sitokinlerin hastalık seyrinin izlenmesinde ve tedavide faydalı

olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada MS'nin immünolojik ve klinik sürecinde önemli rol oynadığı düşünülen proinflamatuvar sitokinlerden IL-1, IL-2, TNF- α ve IFN- γ 'nın hastalığın atak ya da kötüleşme döneminde ve tedavi sonrasındaki değişimleri değerlendirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Multipl skleroz, sitokinler, interferon, interlökin, tümör-nekroz faktör-alfa

Cytokines in multiple sclerosis

ABSTRACT The research on the role of cytokines in MS has gained more interest especially after the widespread clinical application of IFN-beta treatment for this disease. The intense laboratory and clinical work on the field, however, have suggested that the cytokines could be of help in

following the course and planning the treatment of MS. In this study, the levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-2, TNF- α and IFN- γ) that are thought to have an important roles in immunological and clinical course of MS have been evaluated during exacerbation and post-treatment period.

Key words: Multiple sclerosis, cytokines, interferon, interleukin, tumor-necrosis factor-alfa.

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Multipl skleroz (MS), santral sinir sistemi (SSS)'nin inflamatuvar demiyelinizan bir hastalığıdır. Etiyolojisi henüz bilinmemekle birlikte, halen üzerinde çalışılmakta olan farklı hipotezler mevcuttur. Eldeki verilerin ışığında, MS'nin otoimmün kökenli bir hastalık olduğu yönündeki hipotez kuvvet kazanmıştır. Ancak tanımlanan bu immünolojik fenomenlerin hastalığıdaki primer olay mı, yoksa diğer bir sürece sekonder gelişen bulgular mı olduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Sitokinler, polimorfik özellikte, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Bu moleküller immün ve inflamatuvar cevapların oluşumu ve düzenlenmesinde rol oynarlar. İmmün cevabın "aktivasyon" fazında lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasını (diferansiasyonu) stimüle ederlerken, "effektör" fazda ise antijenik materyali ve mikrobik ajanları yok eden hücreleri aktive ederler.^{1,7,36} İmmün sistemdeki pekçok hücre ve SSS'deki hücreler tarafından salgılanırlar (T hücreleri, makrofajlar, astrositler, oli-

godendrositler ve mikroglia). Sitokinler, birçok fizyolojik cevapta önemli rol oynayan, hastalıkların patofizyolojisinde etkili olan, terapötik potansiyele sahip bir protein grubudur.^{3,4} Sitokinler SSS açısından da özgün bir role sahiptirler. Ateş, nöroendokrin aktivasyon, yabancı antijene karşı immün cevabın regüle edilmesi, hücrel ve humoral immünite ile inflamatuvar cevabın gelişimi sırasında önemli bir görev üstlenirler.⁴²

Protein yapısındaki antijenlere karşı, CD4+ helper: yardımcı T hücreler farklı sitokin gruplarını sentezleyen efektör hücre alt tiplerine (Th1 ve Th2) dönüşürler. Böylece, farklı sitokinleri sentezleyebilme özelliği kazanarak, farklı efektör fonksiyonları gerçekleştirebilirler. Th1 hücrelerinin en belirleyici sitokini IFN- γ iken, Th2 hücrelerinin ki IL-4 ve IL-5'tir. Th1 ve Th2 alt grupları aynı prekürsör hücreden köken alırlar (naive CD4+ T lenfosit). Th1/Th2 farklılaşım paterni, immün cevabın erken döneminde gelişen stimuluslar tarafından belirlenmektedir. Farklılaşımı indükleyen en önem-

li stimulus ise sitokinlerdir. IL-12; Th1 hücrelere dönüşümü sağlarken, IL-4; Th2'ye dönüşümü stimüle eder. Aynı sitokinler bu alt grupların çoğalmasını sağlamak üzere büyüme faktörü gibi de işlev görürler. Sitokin dışındaki bazı faktörler de helper T lenfosit farklılaşımında rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında; antijen miktarı, antijen-sunucu hücrelerde ekspres edilen kostimülatörler, genetik yapı özellikleri sayılabilir. Aynı mikrobik ajana karşı değişik genetik yapıya sahip cinslerin bir kısmının Th1 yanıtı, diğer bir kısmının ise Th2 yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir, bu yanıtı açan gen bilinmemektedir.¹

Hem proinflamatuvar (Th1 kökenli), hem de antiinflamatuvar (Th2 kökenli) sitokinlerin MS patogenezinde rolü olduğu öne sürülmektedir.^{2,7,19,42} MS gelişiminde katkısı olduğu düşünülen sitokinlerin, SSS'e giren otoreaktif CD4+ hücreleri tarafından salgılanan sitokinler olması olası görünmektedir, daha sonra da SSS'e giren diğer inflamatuvar hücrelerin ve aktive glial hücrelerin sitokin salgısı bunu takip etmektedir. IL-1 β , IFN- γ , lenfotoksin (LT) ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler diğer inflamatuvar hücrelerin SSS içine girişinde etkin role sahip moleküllerdir. MS lezyonlarında IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α ve LT gibi proinflamatuvar sitokinlerin, hem pro, hem de antiinflamatuvar fonksiyona sahip bir sitokin olan IL-6'nın sentezinin arttığı gösterilmiştir, aynı artış MS'li hastaların beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve serumlarında da saptanmıştır. Pekçok çalışmada, MS'li hastaların (ataklarla giden:RR ve progressif: P MS formlarında) sitokin düzeyleri serum, beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve hücre kültürlerinde tetkik edilmiştir.^{5,6,8-16,20,21,22,25,26,29,31-36,38-42} Bildirilen negatif sonuçlar da bulunmasına rağmen, genellikle elde edilen veriler sitokinlerin MS'de hastalık aktivitesini değerlendirmek ve terapötik yaklaşımları yönlendirmek açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Bugünkü veriler ışığında; MS'teki patojenik mekanizmanın başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol alan solübl mediatörler arasında, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α / β , IFN- γ , IL-1 α / β ve IL-6) önemli olduğuna inanılmaktadır. MS hastalarından elde edilen immü-

nolojik ve patolojik veriler de bu görüşü desteklemektedir. Bu veriler şöyle sıralanabilir: Proinflamatuvar sitokinler;

Aktif MS plaklarında bulunurlar,

MS'nin aktif fazı sırasında serumda düzeyleri artmıştır,

MS hastalarının dolaşımında bulunan memory: bellek T hücrelerini, antijen özgünlüğü gözetmeksizin aktive ederler,

MS hastalarına sistemik olarak uygulanırlarsa klinik atağa yol açarlar.²⁷

Sitokinler arasındaki kompleks ilişkilerin MS'nin seyri sırasındaki temel klinik değişikliklerin gelişimini kolaylaştırabileceği ileri sürülmektedir. Nitekim, klinik atakların oluşumu; IFN- γ , TNF- α ve bunların reseptör ekspresyonunun artışı ile beraber iken, remisyon fazında TGF- β , IL-10 ve IL-1 reseptör antagonistlerinin sekresyonunda artış söz konusudur. Sitokinlerin hastalığın başlangıcı ya da seyrini belirlemede olası düzenleyici etkileri nedeniyle, MS-genetik asosiyasyon çalışmalarında da sitokin genleri favori adaylar olarak araştırılmaktadır.^{18,37}

Literatürde bildirilen bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda proinflamatuvar sitokinlerin atak sırasında serum ve BOS'taki değerleri ile tedavi sonrası serum değerlerini, yüksek doz kortikosteroid tedavisinin bu sitokinler üzerindeki etkisini MS'nin değişik klinik formlarında ve sağlıklı kontrol grubunda saptamayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Multipl Skleroz polikliniğince izlenmekte olan Poser kriterlerine göre "kesin Multipl Skleroz" tanısı konan 54 hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan 38 tanesi ataklarla giden tip MS:RR-MS (13'ü erkek, 25'i kadın), 16 tanesi de progressif MS:P-MS [6 tanesi sekonder progressif MS:SP-MS (4'ü erkek, 2'si kadın) ve 10 tanesi de primer progressif MS:PP-MS (5 erkek ve 5 kadın) olmak üzere] tanısı almışlardı (National Multiple Sclerosis Society:USA Advisory Committee için Lublin FD ve Reingold SC'nin tanımladığı kriterlere

göre).²⁴ RR-MS grubundaki hastalar bize başvurmadan önceki ondört gün içinde yeni gelişen motor, duysal, serebellar yada vizüel semptom tanımlamaktaydılar. Üriner enfeksiyon, üst solunum yolu enfeksiyonu gibi araya giren ve hastalıkta kötüleşmeye yol açan durumlar sözkonusu ise tablo klinik atak olarak kabul edilmedi ve bu tip hastalar çalışmaya alınmadılar. Progressif MS olguları; çalışmaya dahil edilme öncesi son 6 ay içinde, EDSS (Kurtzke's Expanded Disability Status Scale)'de ≥ 1.0 puan artış gözlenen hasta grubundan seçildi. Dört optik nörit (ON) ve 2 akut dissemine ensefalomyelit (ADEM) vakası da çalışmaya alındı. BOS ve ilk serum örneğinin alınması sırasında ve öncesindeki üç aylık period boyunca hastalar herhangi bir immunosupresif ya da immunomodülatuar ilaç tedavisi almamışlardı. BOS ve ilk serum örneği RR-MS grubunda atak dönemde, P-MS grubunda ise kötüleşme ya da yeni bir bulgunun eklendiği dönemlerde alındı. Ardından tüm hastalara tedavi olarak yüksek doz (1000 mg/gün) intravenöz:iv metil prednizolon, yedi ya da on gün süre ile uygulandı. İkinci serum örnekleri tedaviden iki ay sonra alındı.

Kontrol grubu olarak nörolojik ve inflamatuar bir hastalığı bulunmayan, hastaneye ürolojik cerrahi girişim amacıyla yatırılıp, spinal anestezi uygulanan 10 hasta seçildi.

Tüm serum ve BOS örnekleri -24°C 'de dondurularak deney gününe kadar biriktirildi. Çalışmamızda; ELISA yöntemi kullanılarak, BOS ve serum örneklerinde IL-1 β , IL-2, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri saptandı. Çalışmada Genzyme Diagnostics, MA, USA firmasının kitleri kullanıldı.

Çalışılan her sitokine ait ortalama ve standart deviyasyon değerleri hesaplandı. Her sitokin hastalar arasındaki farklı gruplardaki değerlerine göre ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Tedavi öncesi alınan BOS ve serum ile tedavi sonrası alınan serum örneklerindeki sitokin değerleri hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldı, aynı değerlendirme RR-MS tanılı hastalar ile P-MS tanılılar arasında da yapıldı.

Tedavi öncesi alınan BOS ve serum örneklerinde IL-1b düzeyleri kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulundu (BOS için $p=0.03$, serum için ise $p=0.02$ idi) (Tablo 1 ve 2, Figür 1a ve 1b). BOS IL-1b düzeyi RR-MS grubunda P-MS grubuna göre daha yüksek iken ($p=0.02$), serum değerlerinde anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo 1 ve 2). Tedavi sonrası dönemde, serum IL-1b seviyeleri tedavi öncesine göre belirgin bir düşüş gösterdi ($p=0.0003$) (Tablo 3 ve 4, Figür 1b).

BOS IL-2 düzeyleri hasta ve kontrol grubunda anlamlı farklılık göstermiyordu (Tablo 1, Figür 2a). Hastalık tipinden bağımsız olarak, serum IL-2 hastalarda hem tedavi öncesi, hem de tedavi sonrası dönemde belirgin olarak yüksekti (Tedavi öncesi $p=0.0097$, tedavi sonrası $p=0.039$) (Tablo 2 ve 3, Figür 2b).

IFN- γ tetkiklerinde hastalarda ve kontrol grubunda belirgin bir farklılık saptanmadı (hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrasında) (Tablo 2,3 ve 4, Figür 3b). Ancak, BOS IFN- γ düzeyi P-MS'lilerde RR-MS'lilere göre daha düşüktü ($p=0.036$) (Tablo 1, Figür 3a).

TNF- α serumda ve BOS'ta hem hasta, hem de kontrol grubunda saptanabilir düzeyde bulunmadı.

TARTIŞMA

Sitokinler santral sinir sisteminde hem fizyolojik, hem de patolojik şartlarda önemli rolleri olan mediatörlerdir. Diğer sitokinleri bas-kılama (suprese) ya da stimüle etme fonksiyonu yanısıra otokrin ve parakrin fonksiyonlara da sahiptirler. SSS'deki sitokin ekspresyonu konusunda yapılan çalışmada; IL-1 β 'nin düşük düzeylerde ak maddede, IL-2'nin yoğun bir şekilde hem korteks, hem de ak maddede; IFN- γ 'nin düşük düzeylerde hem korteks hem ak maddede, TNF- α 'nın ise sınırlı miktarda nöronlarda eksprese olduğu ortaya konmuştur.⁴³ Deney hayvanlarında fizyolojik koşullarda sitokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonu düşük düzeylerde iken, kafa travması ya da enfeksiyon gibi patolojik koşullarda ekspresyonları hızlı bir artış göstermektedir.⁴³ MS'nin modeli olarak kabul edilen deneysel alerjik ensefalo-

Tablo 1. BOS ortalama sitokin düzeyleri

	kontrol	SD	Toplam grup	SD	p (95%)	RR-MS	SD	P-MS	SD	p (95%)
IL-1b	0,13	0,28	1,53	2,17	0,03	3,05	2,5	1,02	1,75	0,02
IL-2	0,39	0,86	0,12	0,48	0,39 ns	0,06	0,18	0,19	0,66	0,53 ns
IFN-g	146,7	100,1	127	115	0,61 ns	147,5	130,8	91,5	60,2	0,036

Tablo 2. Tedavi öncesi ortalama serum sitokin düzeyleri

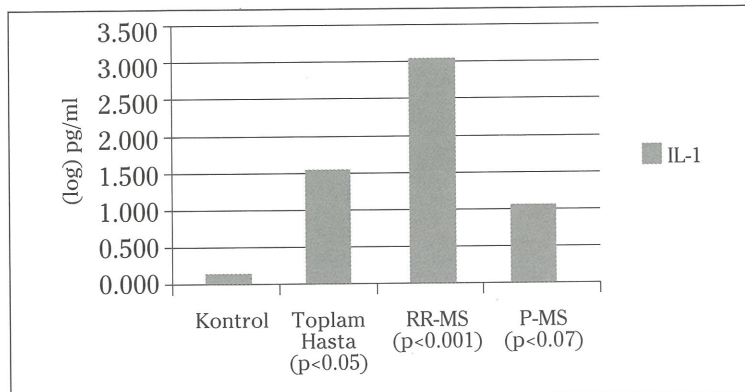
	kontrol	SD	Toplam grup	SD	p (95%)	RR-MS	SD	P-MS	SD	p (95%)
IL-1b	2,98	3,91	7,44	6,14	0,02	8,65	7,77	6,64	5,33	ns
IL-2 0,11	0,33	1,56	2,02	0,0097	1,68	1,16	1,8	2,95	0,92	ns
IFN-g	140,6	125,1	83	64,2	0,18 ns	89,5	66,8	84,8	65,6	ns

Tablo 3. Tedavi sonrası ortalama serum sitokin düzeyleri

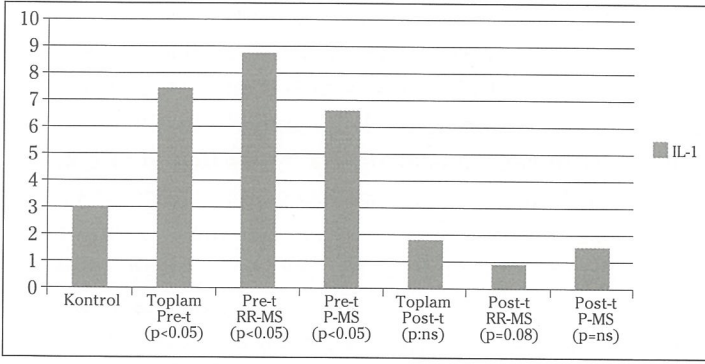
	kontrol	SD	Toplam grup	SD	p (95%)	RR-MS	SD	P-MS	SD	p (95%)
IL-1b	2,98	3,91	1,84	3,47	ns	0,94	1,3	1,49	2,54	ns
IL-2	0,11	0,33	0,99	1,56	0,039	1,05	1,64	1,2	1,73	0,87 ns
IFN-g	140,6	125,1	84,9	45,3	0,20 ns	86,1	56,0	90,9	17,6	ns

Tablo 4. Tedavi öncesi ve sonrası dönemde ortalama serum sitokin düzeyleri

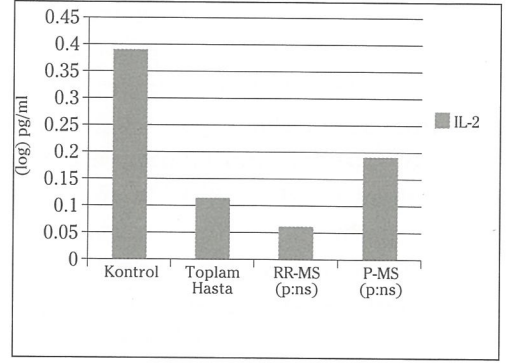
	Tedavi öncesi	SD	Tedavi sonrası	SD	p (95%)
IL-1b	7,44	6,14	1,84	3,47	0,0003
IL-2	1,56	2,02	0,99	1,56	0,36 ns
IFN-g	83	64,2	84,9	45,3	ns



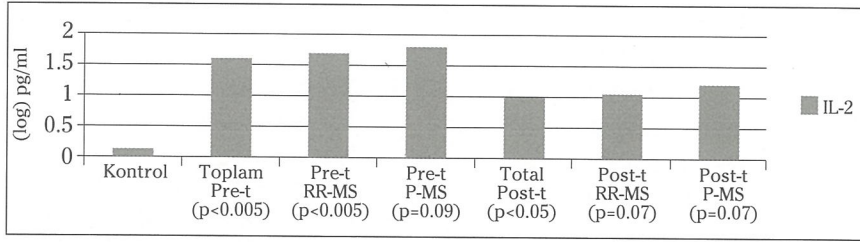
Şekil 1a. BOS IL-1 düzeyleri



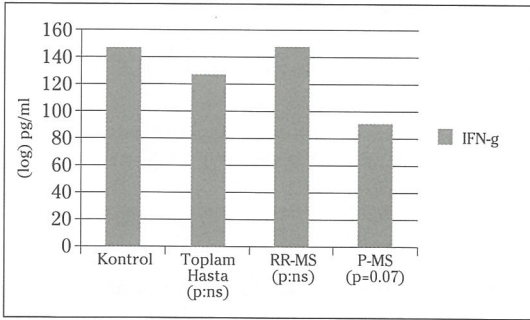
Şekil 1b. BOS IL-1 düzeyleri



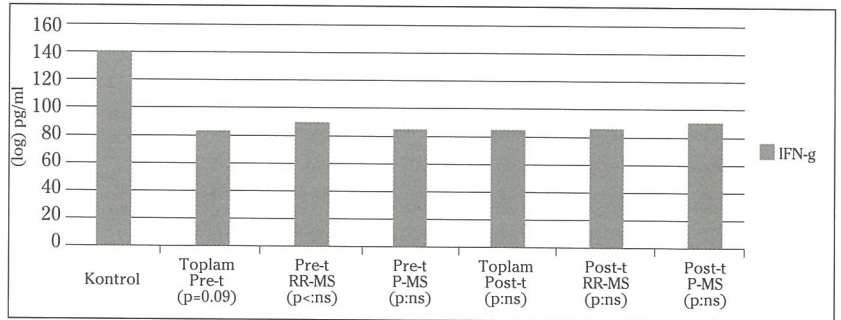
Şekil 2a. BOS IL-2 düzeyleri



Şekil 2b. Serum IL-2 düzeyleri



Şekil 3a. BOS IFN-g düzeyleri



Şekil 3b. Serum IFN-g düzeyleri

miyelit (EAE) tablosunda, Th1 ve Th2 tipi sitokinlerin ekspresyonları ile hastalık aktivitesi, tipi ve progresyonu ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. EAE'nin akut fazında IFN-g, IL-12 ve IL-4 mRNA düzeylerinin pik yaptığı saptanırken, iyileşme dönemleri ve kronik faz boyunca düşük kaldıkları görülmüştür. EAE oluşturulan farelerde Th1 tipi sitokin mRNA'ların ekspresyonu hastalığın gelişmesi ile saptanırken, Th2 tipi sitokin mRNA'ların ekspresyonu ise ancak

hastalık pik yaptıktan sonra ve semptomların gerilemesi döneminde saptanabilmektedir.^{44, 45} MS'nin TMEV (Theiler murine encephalomyelitis virus) cinsi virüslerle oluşturulan diğer bir deneysel modelinde ise; daha farklı ve karmaşık bir sitokin paterni bildirilmektedir. Virüsle enfekte olan hem dirençli, hem hastalığa yatkın fare grubunda hastalığın erken döneminde, virüsü temizlemeye yönelik kısa süreli, Th1 tipi proinflamatuvar sitokin mRNA düzey-

lerinde yükselme gözlenmektedir. Ancak hastalığa yatkın cinslerde spinal kordda, diğer gruba kıyasla Th1 tipi ekspresyonun geç dönemde de süreklilik gösterdiği saptanmaktadır. Bu gözlem viral etkinin ve demiyelinizan hastalığın sürekliliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.⁴⁴ Yazımızın giriş bölümünde belirtildiği gibi, insanda MS'nin seyri sırasındaki sitokin düzeylerine ait pek çok çalışma literatürde sunulmuştur. Sonuçlar bazen çelişkili olsa da genelde kabul edilen görüş, MS ataklarında erken dönemde proinflamatuvar sitokinlerin (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6), bunu izleyen atağın baskılanması ve iyileşme döneminde ise antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-4, TGF- β) rolü olduğu şeklindedir.²⁸ Mono-semptomatik optik nöritli olgularda da MS'tekine benzer bir sitokin profili gözlenmiştir.¹⁹

MS ataklarının tedavisinde kullanılan kortikosteroidlerin sitokinler üzerine etkisi ve bu etkinin MS'nin değişik klinik tiplerinde farklı olup olmadığı konusundaki bilgilerimiz henüz yeterince açıklık kazanmamıştır. Bilindiği gibi; glukokortikosteroidler pekçok otoimmün ve inflamatuvar kökenli hastalıkta kullanılan, güçlü antiinflamatuvar ve immunosupressif etkiye sahip ajanlardır. Yaygın kullanımlarına karşın, etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır, ancak multifaktöriyel olduğu bilinmektedir. İmmüno-supressif etkilerinin IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ ve TNF- α gen ekspresyonunu supresse ederek oluştuğu bildirilmiştir. Glukokortikosteroidlerin bir diğer önemli etki mekanizması da; inflamatuvar hücrelerin adezyon ve migrasyonu üzerindeki etkileri olabilir.⁴⁶

Olgularımızda serum ve BOS TNF- α düzeyleri ELISA yöntemi ile saptanabilir düzeylerde değildi. IFN- γ düzeyleri de kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Literatürde de benzer sonuçlar bildiren birkaç çalışma vardır.^{21,25,36}

Çalışmamızda MS atak ve progresyon dönemlerinde test edilen proinflamatuvar sitokinler içinde sadece IL-1 β sentezi hem serum, hem de BOS'ta yüksek bulunmuştur. En yüksek BOS IL-1 β düzeyi RR-MS tanılı hastalarda saptanmıştır. Yüksek doz IV metil prednizolon tedavisini izleyen iyileşme döneminde; serum IL-1 β düzeyleri yine RR-MS grubunda daha be-

lirgin olmak üzere düşüş göstermiştir. Nicoletti ve arkadaşları³⁰ da IFN-beta tedavisi sırasında serum IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) düzeylerinin arttığını, IL-1 β seviyelerinin ise azaldığını saptamışlardır. Bu verilerden yola çıkılarak Kantarcı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada;¹⁷ IL-1 β allel-2 ve IL-1ra-allel 3 polimorfizmlerinin klinik gidişi etkilediği ortaya konmuştur. Çalışmamız kısıtlı sayıda hastadan oluşmakla birlikte, incelenen proinflamatuvar sitokinler arasında, sadece IL-1 β düzeyleri ile hastalık aktivitesinin anlamlı bir ilişki gösterdiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober LS. Cytokines. In cellular and Molecular Immunology. Ed. WB Saunders Comp.4th edition, Philadelphia, 2000; 235-269.
2. Altıntaş A, Kantarcı O, Siva A. Multipl Skleroz'da sitokinlerin rolü. Türk Nöroloji Dergisi 1995; 1(4):167-171
3. Balkwill FR, Burke F. The cytokines network. Immunology Today 1989;10(9): 299-304.
4. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. Curr Opin Immunol, 1992;4(6), 754-759.
5. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of MS lesions. Ann Neurol 1995;37: 424-435.
6. Carrieri PB, Maiorino A, Provitera V et al. Cytokines in the pathogenesis of MS. Acta Neurol, 1992;14 (4-6): 333-41.
7. Carrieri PB. The role of cytokines in the pathogenesis of MS. Int MS Journal 1994; 1(2): 53-59.
8. Chofflon M, Jullard C, Juillard P et al. Tumor necrosis factor-alfa production as a possible predictor of relapse in patients with MS. Eur Cytokine Netw, 1992; 3(6), 523-31.
9. Demisch L, Engelhardt W, Fischer PA. IL-2, soluble IL-2R, neopterin, L-tryptophan and beta-2 microglobulin levels in CSF and serum patients with relapsing-remitting or chronic-progressive MS. J Neurol, 1993; 241 (2): 108-14.
10. Dore-Duffy P, Newman W, Balabanov R et al. Circulating, soluble adhesion proteins in CSF and serum of patients with MS: correlation with clinical activity. Ann Neurol 1995; 37: 55-62.
11. Freedman MS, Muth KL, Trotter JL et al. Prospective serial analysis of IL-2 and soluble IL-2R in RR MS. Neurology 1992; 42: 1596-1601.
12. Gusev EL, Demina TL, Boiko AN et al. Prolonged dynamic clinico-immunological observation of 85 patients with definite MS, first steps towards monitoring process activity. J Neurol 1994; 241(8): 500-510.
13. Hartung HP, Archelos JJ, Zielasek J et al. Circulating

- adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: A review. *Neurology* 1995; 45 (suppl 6): 22-32.
14. Hauser SL. Tumor necrosis factor: Immunogenetics and disease. *Ann Neurol*, 1995; 38(5): 702-703.
 15. Huberman M, Shalit F, Roth-deri I et al. Decreased IL-3 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with MS. *J Neurol Sci*, 1993; 118(1): 79-82.
 16. Imamura K, Suzumura A, Hayashi F et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in MS patients. *Acta Neurol Scand*, 1993; 87(4): 281-285.
 17. Kantarci OH, Atkinson EJ, Hebrink DD, et al. Association of two variants in IL-1b and IL-1 receptor antagonist genes with multiple sclerosis. *J of Neuroimmunology* 2000; 106:220-227.
 18. Kivisaakk P. Cytokines and cerebrospinal fluid: methodology and clinical relevance in multiple sclerosis. In Fredrikson S, Link H. *Advances in Multiple Sclerosis. Clinical Research and Therapy*. 1st edition, London, Martin Dunitz, 1999, 33-42.
 19. Krammer PN, Kirchner H, Schimpl A. Lymphokines. *Immunology Today*, 1989, vol 10, no 8 suppl, 521-522.
 20. Kroemer G, Wick G. The role of IL-2 in autoimmunity. *Immunology Today*, 1989; 10 (7): 246-251.
 21. Link J, Soderstrom M, Kostulas V et al. Optic neuritis is associated with MBP and PLP reactive cells producing IFN-gama, IL-4 and TGF-beta. *J Neuroimmunol*, 1994; 49(1-2): 9-18.
 22. Lu CZ, Jensen MA, Arnason BG. IFN-gama and IL-4 secreting cells in MS. *J Neuroimmunol*, 1993; 46(1-2): 123-128.
 23. Lucas K, Hohlfeld R. Differential aspects of cytokines in the immunopathology of MS. *Neurology*, 1995; 45 (suppl 6): 4-5.
 24. Lublin FD, Reingold SC for the National Multiple Sclerosis Society(USA) Advisory Committee on clinical trials of new agents in MS. Defining the clinical course of MS: results of an international survey. *Neurology*, 1996; 46: 907-911.
 25. Maimone D, Reder AT, Gregory S. T-cell lymphokine-induced secretion of monocytes from patients with MS. *Cell Immunol*, 1993; 146(1), 96-106.
 26. Martino G, Clementi E, Brambilla E et al. Gamma interferon activates a previously undescribed Ca²⁺ influx in T lymphocytes from patients with MS. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 24, 91(11), 4825-4829.
 27. Martino G, Poliani P, Furlan R, et al. Cytokine therapy in immune-mediated demyelinating diseases of the central nervous system: a novel gene therapy approach. *J of Neuroimmunology*, 2000; 107:184-190
 28. Mc Farland HF. The MS lesion. *Ann Neurol*, 1995; 37(4), 419-420.
 29. Mokhtarian F, Shi Y, Shiracian D et al. Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with MS. *J Immunol*, 1994; 15, 152(12), 6003-10.
 30. Nicoletti F, Patti F, DiMarco R, et al. Circulating serum levels of IL-1ra in patients with relapsing remitting multiple sclerosis are normal during remission phases but significantly increased either during exacerbations or in response to IFN-beta treatment. *Cytokine*, 1996; 8(5): 395-400.
 31. Noronha A, Toscas A, Jensen MA. IFN-beta decreases T cell activation and IFN-gama production in MS. *J Neuroimmunol*, 1993; 46(1-2): 145-153.
 32. Ollson T. MS: cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 1994; 36 suppl.; 100-102.
 33. Olsson T. Cytokine-producing cells in EAE and MS. *Neurology*, 1995; 45(suppl 6): 11-15.
 34. Peter JB, Boctor FN, Tourtellotte WW. Serum and CSF levels of IL-2, sIL-2R, TNF-alfa and IL-1beta in chronic progressive MS. Expected lack of clinical utility. *Neurology*, 1991; 41: 121-123.
 35. Porrini AM, Reder AT. IFN-gama, IFN-beta and PGE I affect monokine secretion, relevance to monocyte activation in MS. *Cell Immunol*, 1994; 157(2): 428-438.
 36. Rudick RA, Ransohoff RM. Cytokine secretion by MS monocytes. *Arch Neurol*, 1992; 49: 265-270.
 37. Sciacca FL, Grimaldi LME. Cytokine genes in multiple sclerosis. In Martino G, Adorini L. *From Basic Immunology to Immune-mediated Demyelination*. 1st edition. Milano, Springer-Verlag, 1999; 137-148.
 38. Sharief MK, Thompson EJ. Correlation of IL-2 and sIL-2R with clinical activity of MS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993; 56: 169-174.
 39. Sharief MK, Hentges R, Thompson EJ. The relationship of IL-2 receptors to intrathecal immunoglobulin synthesis in patients with MS. *J of Neuroimmunology*, 1991; 32: 43-51.
 40. Söderström LJ, Olsson T, Höjeberg B et al. Increased TGF-beta, IL-4 and IFN-gama in MS. *Ann Neurol*, 1994; 36: 379-386.
 41. Woodröfe MN, Cuzner ML. Cytokine mRNA expression in inflammatory MS lesions, detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine*, 1993; 5(6): 583-588.
 42. Woodroffe MN. Cytokine production in the CNS. *Neurology*, 1995; 45 (suppl 6): 6-10.
 43. Morris CS, Esiri MM. The expression of cytokines and their receptors in normal and mildly reactive human brain. *Journal of Neuroimmunology*, 1998; 92: 85-97.
 44. Sato S, Reiner SL, Jensen MA, Roos RP. CNS cytokine mRNA expression following TMEV infection. *Journal of Neuroimmunology*, 1997; 76; 213-223.
 45. Tanuma N, Shin T, Kogure K, Matsumoto Y. Differential role of TNF-a and IFN-g in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 1999; 96: 73-79.
 46. Pitzalis C, Sharrack B, Gray IA, et al. Comparison of the effects of oral versus IVMP regimens on peripheral blood T lymphocyte adhesion molecule expression, T cell subsets distribution and TNF-a concentrations in MS. *Journal of Neuroimmunology*, 1997; 74: 62-68.

