

Multipl Sklerozlu Hastalarda Serum Homosistein, Asimetrik Dimetil Arginin ve Nitrik Oksit Düzeyleri

Serum Nitric Oxide, Homocystein, Asymmetric Dimethylarginine Levels in Patients with Multiple Sclerosis

¹Zehra Akpınar, ²Sevil Kurban

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi Nöroloji A.D., Konya
²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi Biyokimya A.D., Konya

Özet

Multipl skleroz(MS), santral sinir sisteminin otoimmün-nörodejeneratif bir hastalığıdır. Kronik inflamatuvar bir süreçle karakterizedir. Demiyelinizasyon-remiyelinizasyon, aksonal ve nöronal hasarla giden MS'in doğası tam olarak aydınlatılmamıştır. Patofizyolojisinde oksidatif stresin de rol oynadığı MS'de nitrik oksit(NO), homosistein(HCY), asimetrik dimetilarjinin(ADMA) gibi ajanların rolü araştırılmaktadır. Bu çalışma ile relapsing remitting seyirli MS'lilerde NO, HCY, ADMA düzeylerini ölçerek sağlıklı kontrollerle karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmaya 28 kadın, 15 erkek 43 MS hastası ve aynı yaş grubunda olan 18 kadın, 11 erkek sağlıklı gönüllü dahil edildi. Serum HCY seviyeleri kromosistem kit kullanılarak ve serum ADMA seviyeleri Chen ve arkadaşlarının tariflediği metod kullanılarak HPLC tekniği ile ölçüldü. NO ölçümü kat no: 1 756 281 kit kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Serum ADMA düzeyi ortalamaları MS hastalarında kontrollerinkinden düşük, HCY ve NO ortalamaları ise MS lilerde kontrollerinkinden yüksek bulundu, fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi(p>0.05). Hastalık süresi ve özürülük skorları(EDSS) ile ADMA, NO, HCY ortalamaları arasında da anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Gelecekte bu parametrelerin değişik MS form ve evrelerindeki hastalarda özellikle de akut atak döneminde araştırılmasının tedavi stratejileri açısından yol gösterebileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Multiple skleroz, nitrik oksit, homosistein, asimetrik dimetilarjinin

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune-neurodegenerative disease of the central nervous system. It is characterized by a chronic inflammatory process. The nature of MS, continuing with demyelination and remyelination, axonal and neuronal damage, has not been enlightened precisely. The oxidative stress plays role in the pathophysiology of MS. Along with this; the role of agents such as nitric oxide (NO), homocystein (HCY), asymmetric dimethylarginine (ADMA) has been researched. In this study, we aimed to compare patients of relapsing remitting MS with healthy controls by measuring NO, HCY, ADMA levels. 43 MS patients of whom are 28 females and 15 males along with 18 healthy female, 11 healthy male volunteers with the same age group have been included to the study. Their serum HCY levels have been measured with chromsystem kit (fluorescence detector) and their serum ADMA levels have been measured with HPLC technic by using the method described by Chen and his friends. The NO measurement has been realized by using kit (level no: 1 756 281). The SPSS 16.0 package program has been used for the statistical analysis of acquired data. While the averages of serum ADMA level have been found lower than their controls among MS patients, the HCY and NO averages have been obtained higher than their controls. However, these differences were not statistically significant (p>0.05). A meaningful correlation cannot be obtained between the period of disease and disability score (EDSS) along with the ADMA, NO, HCY averages, either. It has been thought that the research of these parameters among patients with various form and phases of MS, especially in the acute attack periods, might be indicative in terms of treatment strategies in future.

Key words: Multiple sclerosis, nitric oxide, homocystein, asymmetric dimethylarginine

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS) genç erişkinlerde görülen, genellikle yineleme ve iyileşmelerle seyreden, santral sinir sisteminin (SSS) ilerleyici, demiyelinizan ve otoimmün bir hastalığıdır(1). Aksonal ve nöronal hasar, demiyelinizasyon/remiyelinizasyon ve tamir, inflamasyon, gliozis, immun sistemde değişiklik ve kan beyin bariyerinin bozulması gibi çeşitli

patofizyolojik mekanizmaların rol oynadığı kompleks bir hastalık olan MS'in nedeni tam olarak anlaşılmamıştır(1,2). Etiyolojisinde genetik, otoimmün ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin rol aldığı düşünülmektedir(1-3). Tüm inflamatuvar olaylarda olduğu gibi MS'in patojenezinde de oksidatif stresin rol oynadığı bilinmektedir(4, 5). Oksidatif stresi oluşturan ve esas olarak makrofajlarda üretilen reaktif

oksijen türleri (ROS) hücrelere oldukça toksik olan peroksinitrit gibi ürünlere dönüştürerek lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrenin ana bileşenlerinde hasarlanmaya, sonuç olarak da nekroz veya apoptoz yolu ile hücre ölümüne sebep olurlar(6-8). Serbest radikaller gibi etki gösteren ve son yıllarda oksidatif sisteme dahil edilen homosistein (HCY) metiyonin metabolizması sırasında oluşan sülfürlü bir aminoasittir. Transsülfürasyon veya remetilasyon yollarından birini kullanarak metabolize olur. HCY nörotoksik bir aminoasittir ve birçok nörodegeneratif olaylarda olası risk faktörüdür. MS de etkisi olduğu da gösterilmiştir(9-11). Asimetrik dimetilarginin (ADMA) endojen olarak sentezlenen, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin metillenmesi ile meydana gelen türev bir aminoasittir ve insanda nitrik oksit (NO) sentezinin major inhibitörüdür. Nitrik oksit sentetazı (NOS) inhibe ederek etki gösterir(12,13). Oksidatif stres ADMA yapımında ve yıkımında rol alan enzim aktivitelerini değiştirerek ADMA düzeyini etkiler. MS ve ADMA ile ilgili literatür bilgisi olmamakla birlikte deneysel otoimmün ensefalomyelitte ADMA ve nitrik oksit (NO) ile ilişkili yeni çalışmalar bulunmaktadır(14).

NO, eşleşmemiş bir elektron içeren renksiz, gaz şeklinde bulunan çok kısa ömürlü bir serbest radikaldir. L argininden NOS enzimi ile sentez edilir. Bütün memeli hücreleri tarafından sentezlenen NO, kan damarı geriliminin düzenlenmesinden, sinirler arası iletişime ve savunma sistemine kadar pek çok fizyolojik olayda anahtar molekül olarak rol oynar(6,15). Son çalışmalar NO'nin mikroglia bağımlı birincil demiyelinizasyonda rol oynadığını göstermektedir(16). Multipl sklerozlu hastalarda son yıllarda HCY, NO düzeyleri, bunların hastalık formları ve prognozla ilişkisi araştırılarak gelecekte tedavi stratejileri geliştirmekte kullanılmaları umut edilmektedir(11,14,16,17). Biz de bu çalışmamızda MS hastalarında HCY ve NO düzeylerini yanında ADMA düzeyini ve sağlıklı kontrollerle aralarında fark olup olmadığının araştırılmasını amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma yaşları 20-53 arasında değişen (ortalama:33,67 ± 9,15), 28'i kadın, 15'i erkek 43 MS hastası ve yaşları 21-54 arasında değişen (ortalama:33,17±9,99), 18 kadın, 11 erkek 29 sağlıklı gönüllü üzerinde yapıldı. Çalışma protokolü için S.Ü. Meram Tıp fakültesi etik kurulundan onay alındı (27 şubat 2007 tarih, 280- 1255 sayılı onay), tüm olgular bilgilendirilerek onamı alındı. Hastalara McDonald's kriterlerine(18) göre kesin klinik MS tanısı konuldu ve hasta özürüllük skoru [EDSS (expanded disability status scale)](19) takip eden nörolog tarafından hesaplandı. Çalışmaya alınan hastaların hepsi relapsing remitting(RR) formda ve remisyonda idi. İskemik serebrovasküler olay geçirenler, böbrek fonksiyon bozukluğu, kardiyak problemleri olanlar ve HCY, NO, ADMA düzeyini etkileyecek ilaç kullananlar çalışmaya dahil edilmedi. Hasta ve kontrollerden 10-12 saatlik bir gece açlığından sonra sabah saat 800 ile 1000 arasında kan örnekleri alındı. Kan pıhtılaşmaktan hemen

sonra 2500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı, HCY, NO, ADMA seviyelerini çalışılmak üzere çalışma gününe kadar -70oC'da saklandı. Serum HCY seviyeleri kromosistem marka ticari kit kullanılarak (Agilent 1100 series fluorescence detector) ve serum ADMA seviyeleri Chen ve ark. (20)'nin tariflediği metod kullanılarak HPLC tekniği ile ölçüldü. NO ölçümü Roche marka (kat no: 1 756 281) ticari kit kullanılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 16.0 paket programı ile yapıldı. Grupların özelliklerinin karşılaştırmasında ki-kare ve bağımsız iki örnek t testi kullanıldı. Grupların karşılaştırmasında normal dağılım gösteren değerler için bağımsız iki örnek student-t testi ve normal dağılım göstermeyen değerler için Mann Whitney U-testi kullanıldı. Korelasyon analizleri Pearson ve Spearman korelasyon testleri kullanılarak belirlendi. Veriler ortalama değerleri ± standart sapma (SD) ile birlikte verildi. Testlerin tümünde p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

MS hastası ve sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri tablo 1, HCY, ADMA ve NO değerleri tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'den görüldüğü gibi serum ADMA seviyeleri MS hastalarında kontrollerinkinden düşük, HCY ve NO seviyeleri ise MS lilerde kontrollerinkinden yüksekti. ADMA, NO ve HCY farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05). Hastalık süresi ve özürüllük skorları ile HCY, ADMA ve NO düzeyleri arasında ve ADMA-NO arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktu.

TARTIŞMA

Multipl skleroz(MS) inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal hasar yanında oligodendrositlerde apoptoza kadar giden değişikliklerin olduğu heterojen bir patolojiye sahip nöroimmünolojik-nörodegeneratif bir hastalıktır. MS de akut fazda ve relapsing-remitting formda mikrogliyal olaylar ve enflamatuar süreç ön planda iken ilerlemiş fazda ve sekonder progressif formda oksidatif stres ve ekzitotoksite ön plandadır(1-3). Homosistein (HCY), nitrik oksit(NO), asimetrik dimetilarginin (ADMA) gibi ajanlar son yıllarda enflamatuar yanıtta önemli maddeler olarak ön plana çıkmıştır. Son on yıl içinde patofizyolojik süreçlerin önemli bir aracı olarak ortaya çıkan NO, nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) enziminin L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında sentezlenmektedir(15). NO gaz yapısında olduğu için hızla çevre hücrelere diffüze olabilir ve etkisini yok edilene kadar sürdürebilir. Fazla miktarda oluşumu dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale getirilir. Kan içine salınan NO'nun büyük kısmı esas olarak eritrositler tarafından metabolize edilir. Hemogloblin ve miyoglobuline bağlanan NO nitrit (NO⁻) ve nitrat (NO³⁻) a okside olarak yıkılır(15,21). Artmış NO biyo-sentezinin nonspesifik immün-aracılı hücre sitotoksikite, romatoid artrit, insüline bağımlı diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı da dahil olmak üzere kronik, inflamatuvar otoimmün hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu ve

Tablo 1. Sağlıklı kontrollerin ve multipl skleroz hastalarının demografik özellikleri

Parametreler	Kontrol (n:29)	MS grubu (n:43)	p değeri
Yaş (yıl)	33.15±7.51	33.54±9.23	0.844
Cinsiyet (E/K)	11/18	15/28	0.548
Hastalık süresi (yıl) –	–	5.27±4.07	–
EDSS seviyesi	–	2.61±1.50	–

MS; multipl skleroz, EDSS; hasta özürüllük skoru(expanded disability status scale)

Tablo 2. Sağlıklı kontrollerin ve multipl skleroz hastalarının homosistein, nitrik oksit ve asimetrik dimetilarginin değerleri

Parametreler	Kontrol (n:30)	MS (n:44)	p değeri
HCY (µmol/L)	11.69±6.83	13.51±6.70	0.226
NO (µmol/L)	23.20±16.06	31.23±29.25	0.747
ADMA (µmol L)	0.64±0.22	0.56±0.17	0.083

HCY; homosistein, ADMA; asimetrik dimetilarginin, NO; nitrik oksit

santral sinir sistemini de (SSS) etkilediği ortaya çıkmıştır (17). NO, nonadrenerjik ve nonkolinerjik bir nörotransmitter gibi davranarak transsinaptik retrograd aktivite ile beyin plastitesinde önemli bir rol oynar. NO hem nörotoksik hem de nöroprotektif etkilidir. NO ve reaktif metaboliti peroksinitritin MS'in patogenezinde kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini artırarak inflamatuvar hücrelerin geçmesine sebep olmanın yanısıra oligodendrosit ve nöron sitotoksitesisi, demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon gibi değişik mekanizmalarda da rol oynadığı belirtilmiştir (17,21,22). Fakat NO'nun MS'de net etkisi tam olarak bilinmemektedir çünkü düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol alır ve aktif makrofajlar, proinflamatuvar ve T lenfosit fonksiyonlarını bastırarak gibi faydalı immüno-modülatör etkileri de vardır (15,16).

MS hastalarının serebrospinal sıvı ve serumlarında NO metabolitlerinin (nitrit ve nitrat) anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir (23,24). Serebrospinal sıvı nitrit ve nitrat seviyeleri kan-beyin bariyeri disfonksiyonuyla koreledir ve NO'nun kan-beyin bariyeri inflamatuvar disfonksiyonunda rol aldığı belirtilmiştir. Relapsing remitting ve sekonder progresif 24 MS hastası ile yapılan bir çalışmada yüksek serum nitrit ve nitrat seviyelerinin relapslarla korele olduğu gözlenmiştir (25). Çalışmamızdaki sonuçlar yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına kısmen benzemektedir. Hastalarımızdaki NO seviyesi kontrollere göre yükselmişti fakat istatistiksel anlamlılık yoktu. Yüksekliğin anlamlı olmadığı NO seviyelerini kısmen çalışmamızda yer alan hastaların relapsing remitting formda olması ve hepsinin remisyonunda olmaları ile açıklayabiliriz. Ayrıca hastalardan hiçbirisi çalışmaya alınmadan önceki son altı ay içinde akut atak geçirmemişti. ADMA, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil transferaz enzimi tarafından metil gruplarının eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda meydana gelen ve önemi giderek artan bir metillenmiş arjinin türevidir. ADMA'nın %10'luk kısmı böbrekler yoluyla uzaklaştırılırken, geriye kalan %90'lık kısım ise dimetil arjinin dimetil aminohidrolaz tarafından metabolize edilmektedir(13). ADMA'yı önemli kılan, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini yarışmalı olarak inhibe etmesidir. Plazmadaki ADMA'nın aktif olup olmadığı kesin olarak bilinmemekle birlikte birçok klinik olayda yükseldiği bildirilmektedir. ADMA ile homosistein ve NO arasında ilişki vardır: HCY, ADMA düzeyini artırırken ADMA, NO sentezini azaltır(25,26). ADMA NOS indüksiyonu ile NO üretimini artırarak inflamatuvar yanıtlara katkıda bulunur. ADMA'nın multipl skleroz atak fazında önemli bir modülatör olduğunu gösteren çalışma vardır(14). Çalışmamızın bir sonucu da MS hastalarında ADMA düzeyinin kontrollere göre düşük olmasıdır fakat bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. Bunun sebebi yukarıda bahsettiğimiz gibi olgularımızın klinik özelliklerinden dolayı olabilir.

Nörotoksik bir amino asit olan HCY, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, primer distoni gibi nörodegeneratif hastalıklarda biriktiğini göstermektedir. HCY düzeyi metabolizmadaki genetik bozukluklar (enzim defektleri gibi), kronik hastalıklar, vitamin ve beslenme eksiklikleri, kişisel özellikler (yaş, cinsiyet vb.) ve bazı ilaçlardan etkilenmektedir. Düzeyi yaşla birlikte artış göstermekte olup, erkeklerde

kadınlara göre daha yüksektir. Artan plazma HCY düzeyi, arteriyel ve venöz trombozis, strok, miyokardiyal infarkt ve kronik renal yetersizlik gibi birçok hastalıklar için de önemli risk faktörüdür. Hiperhomosisteinemi vücutta bir çok zararlı etkilere yol açmaktadır. Bunlardan bazıları arasında serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturması ve bu olayın sonucunda da trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagülasyonu artırıcı etkiler meydana getirmesi ve biyolojik membranlarda oksidasyon yapması sayılabilir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar MS hastalarının serum ve BOS larında HCY düzeyinin artmış olduğunu göstermektedir (28-30). Yine bu çalışmalar MS'in klinik tipleri arasında farklılık olmadığını da göstermektedir. Ayrıca HCY düzeyi ile artmış antioksidan kapasite arasındaki ilişki araştırılmış ve bazılarında ters korelasyon bulunurken (7), bazılarında bu ilişki bulunamamıştır(28). Spelülatif olmakla birlikte artmış HCY düzeylerinin MS'da vasküler komorbitede artış yaptığında bildirilmektedir (28). Otuzbir makalenin metaanalizinin yapıldığı bir çalışmada (31) ise 9 çalışma analiz edilmiş ve HCY artışı olduğu gösterilmiştir. HCY, MS'de farklı yollarla nörotoksitesiteye neden olabilir: N-metil -D aspartat reseptörlerini aşırı uyarak Ca akışını artırır ve serbest radikaller aracılığı ile oksidatif hasara neden olabilir. Artmış olan HCY duyarlı kişilerde T ve B lenfosit cevabını, sitokinler ve adezyon molekülleri etkileyerek MS patogenezinde rol oynayabilir. Artmış olan homosistein düzeyinin normale çekilmesi hastalık progresyonu açısından faydalı olabilir. Bizim çalışmamızdaki MS hastalarındaki nümerik olarak yüksek olan fakat istatistiksel olarak anlamlı olmayan HCY hastalarımızın relapsing remitting formda ve çalışma esnasında remisyonunda olmaları ve EDSS skorlarının düşük ve hastalık sürelerinin az olması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak; Günümüzde MS'in fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik ve immünojenik faktörler yanında diğer risk faktörlerinin de mevcut olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılacak çalışmalar serbest radikalleri de içermektedir. Sonuçlar tedavi açısından da yol gösterici olacaktır. Bu amaçla yaptığımız çalışmamızda ADMA, HCY ve NO seviyelerinin kontrollerden istatistiksel olarak farklı olmaması muhtemelen çalışmamızda yer alan hastaların relapsing remitting formda olması ve hepsinin remisyonunda olmaları ve özürülüklerini düşük oluşu ile açıklanabilir. Gelecekte bu parametrelerin değişik form ve evrelerde ki MS hastalarını da içine alacak şekilde genişletilerek çalışılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Mirza M. Multipl sklerozun etyoloji ve epidemiyolojisi. Erciyes Tıp Dergisi 2002;40(1):40-7.
2. Bulut S. Multipl skleroz hastalığı ve immün sistem. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007; 3(43):67-72.
3. Altıntaş A. Multipl sklerozun immüno-patogenezi ve patolojisi. Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics 2009;2(2):1-8.
4. Gonssette, RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity J Neurol Sci 2008;274 : 48-53.

5. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 2004;251:261-8.
6. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424-37.
7. Besler HT, Comoğlu S, Okçu Z. Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 2002;5(3):215-20.
8. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007;14:529-33.
9. Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2004;24:645-52
10. Herrmann W. Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab* 2006;52(7-8):367-74.
11. Besler HT, Comoğlu S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 2003;6:189-9.
12. Alaçam H, Dikmen ZG, Doğan P. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) metabolizması ve ADMA'nın oksidatif hasar, endotel hasarı ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010;41:75-81.
13. De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monitor* 2009;15(4):91-101.
14. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic R, et al. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012;318(1-2):106-11.
15. Moncada S, Palmer RJM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:373-6.
16. Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997;75(3):174-86.
17. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2002;1(4):232-41.
18. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
19. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-52.
20. Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692(2):467-71.
21. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997;4(4):453-61.
22. Syburra C, Passi S. Oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Ukr Biokhim Zh* 1999;71:112-5.
23. Yuçeyar N, Taşkıran D, Sağduyu A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2001;103(4):206-11.
24. Roghani M, Mahboudi F, Saharian MA, et al. Concentrations of nitric oxide metabolites in the serum of Iranian multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2010;294(1-2):92-4.
25. Giovannoni G, Heales SJ, Land JM, et al. The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998;4:212-6.
26. Selley ML. Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *J Neurosci Res* 2004;77:90-3.
27. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-75.
28. Ramsarasing GS, Fokkema MR, Teelken A, et al. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77(2):189-92.
29. Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H, et al. Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler* 2003;9(3):239-45.
30. Kocer B, Engur S, Ak F, ve ark. Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels and their association with clinical and electrophysiological parameters in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 2009;6(3):399-403.
31. Ying Zhu, Zhi-Yi He, He-Nan Liu. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B12, folate, and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 2011;18(7):933-8.