

# Multipl Skleroz Hastalarında Beyin Omurilik Sıvısına Ait Kalitatif ve Kantitatif immunoglobulin Değerleri

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE  
CEREBROSPINAL FLUID IgG VALUES IN THE  
DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Gülten TUNALI  
Yahya LALELİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı SAMSUN ve  
Düzen Klinik Biyokimya ve Radyobiyojoloji laboratuvarı ANKARA

Geliş Tarihi: 9 Mayıs 1989  
Kabul Tarihi: 26 Ocak 1990

## ÖZET

**Bu çalışmada multipl skleroz hastalarında beyin-omurilik sıvısında immunoglobulin G sentezindeki kantitatif ve kalitatif anormallikler araştırılmıştır. BOS örneklerinde yapılan agaroz elektroforezinde oligoklonal hamlamı varlığı araştırılmıştır. 40 MS hastası ile 15 normal kişide, değişik formüller kullanılarak kantitatif IgG değerleri hesaplanmıştır. BOS'da IgG, IgG/albumin oranı, IgG sentez hızı ve IgG indeksi sonuçları hasta ve kontrol grubunda kıyaslanmıştır. Hasta grubunda bütün kantitatif IgG değerlerinde önemli artışlar bulunmuştur. Oligoklonal bantlar MS hastalarının %61'inden elde edilen örneklerde saptanmıştır. Kantitatif IgG anormalliği gösteren vaka sayısı ise daha azdır.**

**Anahtar Kelimeler** Multipl skleroz, protein elektroforez, oligoklonal hamlamı, IgG sentez hızı, IgG indeksi.

## SUMMARY

**In this study, quantitative and qualitative abnormalities of IgG synthesis in cerebrospinal fluid (CSF) were investigated in MS patients. Agarose electrophoretic patterns of CSF samples were inspected for the presence of oligoclonal bands. We calculated quantitative IgG values by using different formulas in 40 patients and in 15 normal subjects. We compared the results for IgG, IgG/albumin ratio, IgG index and IgG synthesis rate in MS patients with those of normal subjects. We found important increases in all quantitative values obtained from patients group with the comparison of those from normal subjects. Oligoclonal bands were present in specimens from 61% of MS patients. The numbers of patients who show quantitative IgG abnormalities were less.**

**Key Words** Multiple Sclerosis, Protein electrophoresis, Oligoclonal bands, IgG synthesis rate, IgG index.

Türk Tıp Bilim Araştırma Dergisi, C.8, S.6, 1990

T J Research Med Sci. V.8, N.6, 1990

## (»İRİŞ

Yakın tarihlere kadar multipl skleroz (MS) tanısı çok sayıda lezyonun varlığını gösteren muayene bulgularına ve hastalığın relaps ve remisyonlarla giden klinik seyrine dayanılarak konuyordu. Ancak son yıllarda geliştirilen nöroradyolojik görüntü sistemleri (bilgisayarlı kranial tomografi ve magnetic resonance imaging), elektrofizyolojik yöntemler (görsel, işitsel ve somatosensorial uyarılmış potansiyeller) ve beyin-omurilik sıvısı analizleri hastalığın tanısına önemli katkılar sağlamıştır (1).

MS hastalarında santral sinir sisteminde immunoglobulin G (IgG) sentezi artmaktadır. Kantitatif IgG ölçümlerinin MS tanısında hassas ve spesifik yöntemler olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Santral sinir sistemindeki IgG sentezindeki artma beyin-omurilik sıvısında (BOS) IgG/albumin oranı, IgG indeksi ve IgG sentez hızı gibi çeşitli formüller kullanılarak gösterilebilmektedir (2-6). Daha sonra tanımlanan kalitatif IgG değişikliklerinin de kantitatif değerler gibi MS tanısını doğrulama açısından önemli bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Konsantrasyon BOS örneklerinde

elektroforz uygulandığında IgG birbirinden ayrı bantlar oluşturacak şekilde göç eder. Bu bantlar oligoklonal bantlar (OKB) olarak isimlendirilmektedir (5,7).

Bu çalışmada MS tanısı almış hastalarda BOS ta kalitatif ve kantitatif IgG değerleri tayin edilerek bu testlerin tanı açısından önemi araştırılmıştır.

## METODVE MATERYAL

Çalışma kliniğimizde izlenmekte olan ve Rosc (8) tarafından tanımlanan kriterlere göre kesin ve muhtemel MS tanısı konmuş 40 hastadan oluşan hasta grubu ile nörolojik muayeneleri normal olan 15 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda yapılmıştır.

Kliniğimize yatırılarak yeniden değerlendirilen hastalara biyokimyasal ve serolojik testlerden başka kranial bilgisayarlı tomografi ile kord lezyonunu düşündürecek bulguları olan hastalara myclografi çekilerek MS hastalığını taklit edilebilecek hastalıklar ekarte edilmiştir. Çalışmaya yalnızca kesin ve muhtemel grupta bulunan hastalar alınmış olup olası grupta bulunan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır.

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden simültane olarak alınan serum ve BOS örnekleri biyokimyasal analizleri yapıncaya kadar -20°C de saklanmıştır. Biyokimyasal analizler Ankarada Düzen klinik Biyokimya ve Radyoloji labarotuvanında yapılmıştır. Serum ve BOS'ta albumin ve IgG düzeyleri immunoturbidimetri yöntemi ile tayin edildi (9). Analizden önce serum örnekleri IgG ölçümü için 50 defa, albumin için 100 defa dilüe edildi. İmmunoturbidimetrik ölçüm COBAS B10 Centrifugal Analyzer (Roche) ile yapıldı.

Bulgular üç ayrı formüle göre değerlendirildi. BOS'da IgG ve albumin düzeyleri kullanılarak IgG/albumin oranı tayin edildi. Hem BOS ve hem de serum örneklerinde IgG ve albumin düzeylerinden yararlanılarak ve aşağıda yazılı formlere göre IgG indeks ve IgG sentez hızı bilgisayarla hesaplandı (3).

$$\text{IgG indeks} = \frac{(\text{IgG BOS})}{(\text{alb) BOS}} \times \frac{(\text{IgG) serum})}{(\text{alb) serum}}$$

$$\text{IgG sentez hızı (mg/gün)} = \frac{(\text{IgG) BOS})}{369} \times \frac{(\text{IgG) serum})}{(\text{alb) serum})} \times \frac{(\text{alb) BOS})}{230} \times 5$$

Tourtellotte tarafından tanımlanan bu son formülde 369 ve 230 sırasıyla IgG ve albumin için normal serum/BOS oranlarını, 0,43 albuminile IgG nin molekül ağırlıkları arasındaki oranı, 5 desilitre olarak günlük BOS prodüksiyonunu ifade etmektedir.

Hasta grubundan alınan BOS örnekleri liyofilize edilerek 20 veya 40 defa konsantre edildi. Paragon agaroz jel elektroforez plakları (Beckman) ve elektroforez sistemi (Electrophoresis Power Supply, Beckman) kullanılarak 100 voltta 30 dakika süreyle elektroforez ve daha sonra ağır zincir antikorunu (ATAB) kullanılarak immunofiksasyon uygulandı. Antikor ile agorosa fikse olan IgG bantları ve %5 asetik asit ile fikse edilmiş protein bantları Paragon mavisini ile boyandı. Boya artıkları %5 asetik asit ile yıkılarak elimine edildikten sonra 90°C fırında kurutuldu ve agorose plağı şeffaflaştırıldı. Protein elektroforz ve IgG bantları mono, poli ve oligoklonal olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Rose tarafından tanımlanan kriterlere göre, çalışma kapsamına aldığımız 40 hastadan 31 tanesi kesin, 9 tanesi muhtemel MS grubundadır. 16 tanesi kadın, 24 tanesi erkek olan hastalarımızın yaşları 15 ile 52, hastalık süresi 6 ay ile 15 yıl arasında değişmektedir.

BOS ta kalitatif IgG değerlendirmesi: Konsantre BOS örneklerinde elektroforez ve immunfiksasyon yapılan 36 hastadan 22 tanesinde (%61) oligoklonal bantların varlığı saptanmıştır (Tablo 1, Şekil 3,4,5 ve 6). 3 vakada poliklonal bantlar değerlendirmeyi engellemiştir. Diğer vakalarda bantlar monoklonal idi.

BOS da IgG'nin kantitatif değerlendirilmesi: Hasta ve kontrol gruplarında her vakada IgG/alb oranı, IgG indeks ve IgG sentez hızı (mg/gün) metod ve materyel bölümünde belirtilen formlere göre bilgisayarla hesaplanmıştır (Tablo 2). Hasta ve kontrol gruplarında kantitatif IgG

Tablo 1. Hasta Grubunda BOS Örneklerinde Kalitatif ve Kantitatif IgG Değerleri. Kısaltmalar K: Kesin, M: Muhtemel, OKB: Oligoklonal bant f : Artmış N: Normal

Vaka Tanı	IgG indeks	Sentez II. (mg/gün)	OKB	Vaka Tanı	IgG indeks	Sentez II. (mg/gün)	OKB
1 K	î	î	+	21 K	N	N	-
2 K	N	N	-	22 K	N	N	+
3 K	N	N	-	23 K	N	N	-
4 K	N	N	+	24 K	N	N	-
5 M	N	N	-	25 K	N	N	+
6 K	t	î	+	26 M	N	N	
7 M	N	N	+	27 K	î	t	+
8 K	N	N	+	28 K	t	t	
9 M	N	N	-	29 K	t	î	-
10 M	N	N	+	30 K	N	N	
11 K	N	N	-	31 K	î	t	+
12 M	N	N	+	32 K	î	î	+
13 K	N	N	-	33 K	î	t	+
14 K	t	t	+	34 K	î	t	+
15 K	î	t	+	35 K	î	î	+
16 M	N	N	+	36 K	î	î	+
17 K	N	N	-	37 K	N	N	-
18 K	N	N	+	38 K	N	N	+
19 K	N	N	+	39 M	t	N	-
20 M	N	N		40 K	î	î	

değerleri arasındaki farkların önemliliği t testi kullanılarak araştırılmıştır (Tablo 2). Ayrıca herbir değer için üst sınır kontrol grubundan elde edilen ortalamalara standart sapmanın iki katı eklenerek ( $X + 2SD$ ) bulunmuştur (Tablo 2). Hasta grubundaki her vakanın kantitatif IgG değerleri üst sınır dikkate alınarak gözden geçirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda elde ettiğimiz bulgular şunlardır:

1. Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla çok önemli IgG artışı saptanmıştır ( $P < 0.01$ ) (Tablo 2). IgG artışı gösteren hasta sayısı 20 olup bu, bütün hastaların %50'sini meydana getirmektedir (Şekil 2).

2. IgG/alb oranı hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli artış göstermiştir ( $P < 0.05$ , Tablo 2). IgG/alb oranında artma saptanan hasta sayısı 19 olup bu, bütün hastaların %47.5 ini meydana getirmektedir (Şekil 2).

3. Hasta grubunda IgG indeksi kontrol grubuna kıyasla önemli artış göstermiştir ( $P < 0.05$ , Tablo 2). İndeksinde artış gösteren vaka sayısı 15 olup, bütün hastaların %37. ini oluşturmaktadır (Şekil 2).

4. IgG sentez, hızı hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli artış göstermiştir ( $P < 0.05$ , Tablo 2). Hastalarımızdan 14 tanesinde (%35) sentez hızında artma gözlenmiştir (Şekil 2).

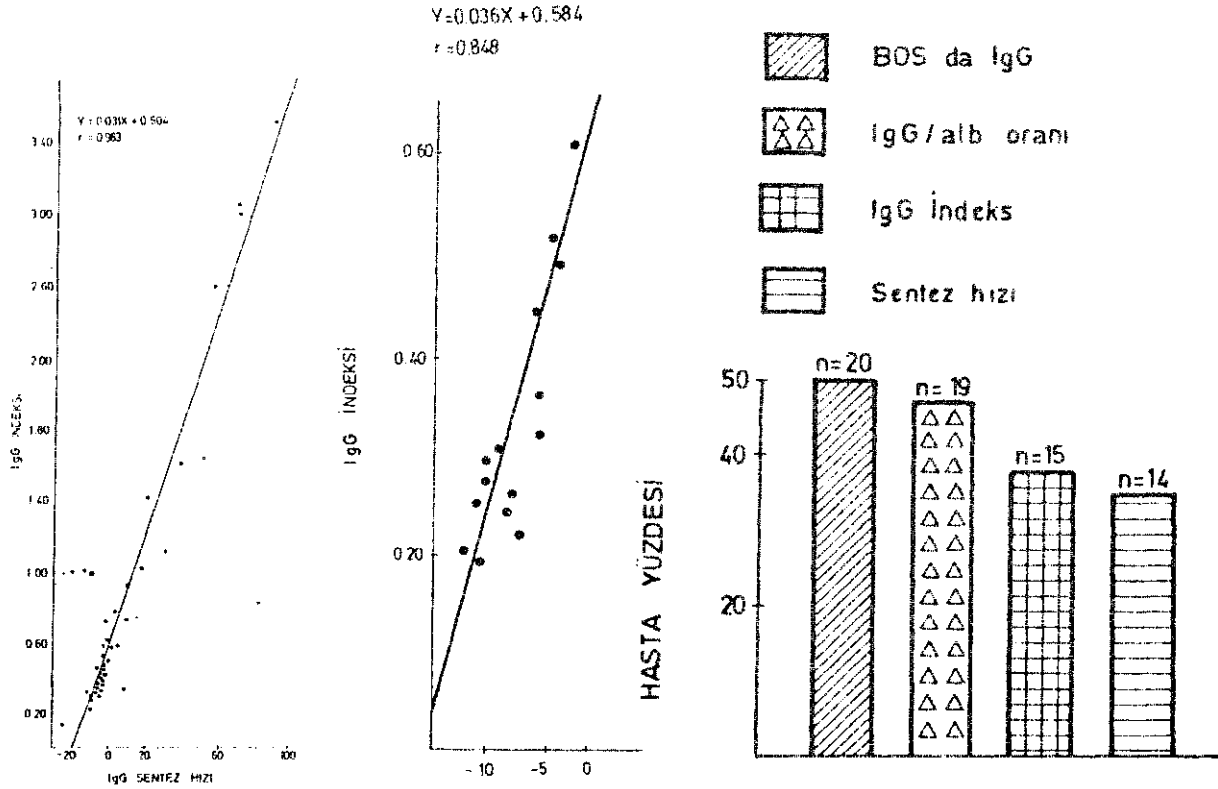
Kalitatif ve kantitatif IgG değerlerini birbirleriyle kıyasladığımızda şu sonuçlara vardık. OKB (-) olan 3 hastada BOS da IgG artışı vardı. Bunlardan 1 tanesinde ayrıca IgG indeksinde de artma vardı. IgG indeksi ve sentez hızı değerleri normal olduğu halde OKB saptadığımız vaka sayısı 12 olup bunlardan 9 tanesi immünosupressif tedavi (Kortizon veya Azathioprine) altında idi.

Hem hasta ve hem de kontrol grubunda iki ayrı formülle (IgG indeksi ve IgG sentez hızı) hesaplanan değerler arasındaki korrelasyon istatistiksel olarak araştırılmıştır. Hasta grubunda korrelasyon katsayısı 0.98, kontrol grubunda ise 0.84 olup her iki grupta da çok önemli korrelasyonlar vardır. Ayrıca her iki grupta regresyon çizgisinin eğimi 0.03 olup birbirinin aynısıdır (Şekil 1). Hasta grubunda  $Y = 0.03X + 0.60$ , Kontrol grubunda  $Y = 0.03X + 0.58$ 'dir.

Tablo 2. Hasta ve Kontrol Grubunda Kantitatif İgG Deđerlerinin İstatistiksel Mukayesesi

	Kontrol grubu n = 15				Hasla grubu n=40				t	P
	X	Sİİ	SS	X + 2SS	X	sn	SS			
IgG (mg/dl)	1.36	0.15	0.58	2.52	5.51	0.82	5.18	3.08	<0.01	
IgG/ab	0.08	0.01	0.03	0.14	0.22	0.03	0.21	2.56	<0.05	
IgG indeks	0.36	0.04	0.14	0.64	0.96	0.16	1.04	2.21	<0.05	
IgG sentez hızı (mg/gün)	-6.29	0.88	3.42	0.55	8.04	4.05	25.60	2.15	<0.05	

Kısaltmalar: X:Ortalama, Sİİ:Standart hata, SS:Standart sapmayı ifade etmektedir.



Şekil 1: Hasta ve kontrol gruplarında İgG indeksi ile İgG sentez hızı (mg/gün) arasındaki korelasyonu göstermektedir. Korelasyon katsayısı: hasta grubunda 0.98, kontrol grubunda 0.85'dir.

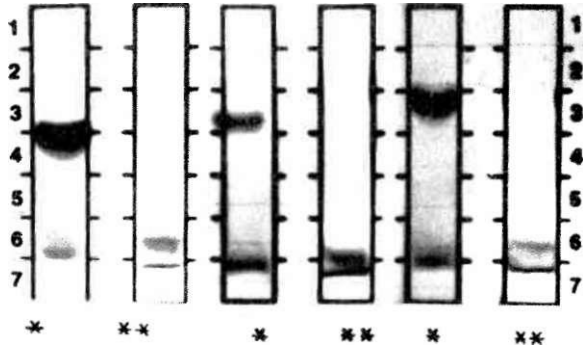
Şekil 2. Hastagrubunda kantitatif İgG değerlerinde artma gösteren vaka sayısını göstermektedir.

## TARTIŞMA

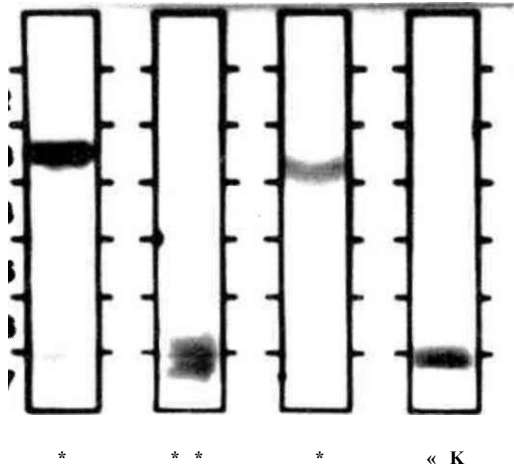
MS hastalarında BOS'ta kalitatif İgG anormallığı (OKB varlığı) lanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Konsantre BOS örneklerinde elektroforez uygulandığında İgG birbirinden ayrı bantlar oluşturacak şekilde göç eder ki bunlar oligoklonal bantlar olarak isimlendirilmektedir (10). Normal insanların serum ve BOS örneklerinde saptanamayan bu bantlar MS hastalarının konsantre

BOS örneklerinde kullanılan yöntemle göre %70 ile 90 arasında değişen oranlarda gösterilebilmektedir (5).

BOS örneklerinde OKB varlığı MS için karakteristik bir bulgu olmasına rağmen sifiliz, sarkoidoz, kronik menenjit, subakut sklerozan panensefalit ve Guillain Barre sendromu gibi bazı immünolojik ve inflamatuvar hastalıklarda da saptanabilmektedir (7). Klinik olarak kesin MS tanısı almış hastaların büyük yüzdesinde OKB bulunmasına rağmen MS hastalığını taklit edebilen has-



Şekil 3,4,5: Multipl sklerozlu hastalarımızda beyin-omurilik sıvısı örneklerinde yüksek rezolusyon elektroforez bulgudan. 1. sütunda (\*) da BOS'da mevcut tüm proteinlerin, 2. sütunda (\*\*) ise \*y ağır zincir antikoru ile fikse edilebilen IgG tipi proteinlerin dağılımı görülmektedir. IgG kolonunda (\*\*) oligoklonal bantların varlığı dikkati çekmektedir.



Şekil 6. İki ayrı multipl skleroz hastasından bir tanesinde (FG) IgG kolonu birden fazla sayıda (oligoklonal) bant görünümü verirken diğer hastada (OO) yalnızca tek bant (monoklonal) gözlenmiştir.

(.alıklarda bu bantların saptanamaması bu testi hastalık tanısında önemli kılmaktadır (5,7).

Biz bu çalışmada vakalarımızın %61'inde OKB saptadık. Oran literatürde belirtilen oranlardan daha düşük olmasını, kullandığımız yöntem ve örneklerimizdeki konsantrasyon nispetinin düşük olmasına bağladık. Literatürdeki diğer çalışmalarda örnekler 80-100 defa konsantre edildiği halde, çalışmamızda örnekler 20-40 defa konsantre edilmiştir.

MS hastalarında OKB saptama yüzdesi kullanılan yöntem göre değişebilmektedir. Agaroz jel

elektroforezinde OKB ların rezolüsyonu zayıf olduğundan poliklonal IgG bantları OKB'ı maskeliyebilmektedir. Bu da vakaların yaklaşık %20'sinde sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Buna karşılık izoelektrik fokuslama(IEF) yöntemi kullanıldığında OKB saptama oranı %90'a çıkmaktadır (10). Yani bu yöntemin rezolüsyonu yüksek olduğundan agaroz jel elektroforezi ile gösterilemeyen OKB'ı bu yöntem ile gösterebilmek mümkün olmaktadır (11,12).

Delmotte ve arkadaşları (13) agaroz jel elektroforezi ile IEF yöntemlerini 120 ES hastasında kıyasladılar. Elektroforez yöntemi ile vakaların %65 kadarında OKB saptadılar. IEF yöntemi uyguladıklarında bu oranın %95'e çıktığını gözlediler.

BOS örneklerinde OKB'ın saptanmasında IgG miktarının da önemi vardır. Örneklerde IgG miktarının az olması bantların silik çıkmasına, fazla olması bantların birbirine karışmasına neden olmaktadır. Bu bakımdan elektroforez plaklarına konan örnekte IgG miktarının ortalama 30 mikrogram olması önerilmektedir (12). Literatürdeki çalışmalarda elektroforez öncesi konsantrasyon nispeti 80 ile 100 defadır.

Santral sinir sisteminde IgG sentezinde artma olduğu 40 yıldan beri bilinmektedir. MS hastalığında IgG aktif demyelinize plakların çevresinde bulunan perivasküler lenfosit ve plazma hücreleri tarafından sentez edilmektedir. Yani BOS daki IgG artışı kan-beyin engelindeki hasardan değil intratekal sentez artışından kaynaklanmaktadır (6).

BOS'taki IgG seviyesinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde BOS IgG/alb oranı, IgG indeksi ve IgG sentez hızı gibi çeşitli formüllerden yararlanılmaktadır. Özellikle IgG indeksi ile IgG sentez hızının MS tanısını doğrulama açısından büyük önem taşıdığı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (2-5,6,14). Ancak hastalığın aktivitesini gösterme açısından BOS daki IgG seviyesinin değerlerinden daha değerli olduğu ileri sürülmektedir (15).

Son zamanlarda tanısını doğrulama açısından IgG indeksi ve IgG sentez, hızı sık başvurulan testlerdir. Ancak bu iki testten hangisinin diğerinden daha üstün olduğu konusunda fikir birliği yoktur. IgG sentez, hızının üstün olduğunu belirten araştırmacılar olduğu gibi (3), IgG indeksinin

üstün olduğunu çünkü ölçüm hatalarının IgG sentez hızının nihai sonuçları üzerine olumsuz etkisinin daha fazla olacağını belirten araştırmacılar vardır (4).

Biz hem hasta ve hemde kontrol grubunda kantitatif IgG değerlerini tayin ettik, Kontrol grubunda IgG indeksi için saptadığımız üst sınır 0.64 olup literatürde belirtilen 0.66 değerine çok yakındır (2,15). Diğer kantitatif ölçümler için saptadığımız üst sınır değerleri ise literatürde bildirilenlerden daha düşüktür (2,15).

Gerek IgG sentez hızında ve gerekse IgG sentez hızında artma gösteren vaka sayısı hemen hemen birbirinin aynı idi. Zaten bu iki değer arasında hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda çok önemli korrelasyonlar bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak heriki değişik formülün hastalığın tanısında eşil derecede önem taşıdığı kanısına vardık.

Hasla grubunda gerek IgG indeksinde ve gerekse IgG sentez hızında artma gösteren vaka sayısı tüm vakaların %35 ile %3.5 ini meydana getirmekte olup bu oranlar, literatürdeki %86 ile %97 arasında değişen oranlara kıyasla belirgin derecede daha düşüktür (2,5,6). Biz bu önemli farkı ölçümlerin bazı hastalarda immüno-supressif tedavi altında iken yapılmasına bağlıyoruz. İmmüno-supressif tedavinin intratekal IgG sentezini azalttığı bazı araştırmalarla gösterilmiştir (2,16). Elektroforez sonrasında oligoklonal bantlar saptandığı halde IgG sentez hızı ve IgG indeksinde artma gözleyemediğimiz 9 hasta immüno-supressif tedavi görmekteydi.

Sonuç olarak beyin-omurilik sıvısında IgG anormalliklerinin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin MS tanısını doğrulama açısından büyük önem taşıdığı kanısına vardık.

#### KAYNAKLAR

1. Polman C.H. Koetsien J.C. Mollers E. Multipl sclerosis: Incorporation of results of laboratory techniques in the diagnosis. Clin Neurol Neurosurg 1985. 87: 187-192.
2. Carosio J.T., Kockura S. Sacks H et al. Quantitative CSF IgG measurement in multipl sclerosis and other neurologic diseases. Arch Neurol 1983,40:409-413.
3. Maltson E.L. Flagler D.G. Bruce W.M. IgG synthesis rate in evaluation of multipl sclerosis in a community hospital. Neurology 1987, 37:847-849.
4. Ilische E.A.H. van der Helm III. Rate of synthesis of IgG within the blood-brain barrier and the IgG index compared in the diagnosis of multipl sclerosis. Clin Chem 1987, 33/1: 113-114.
5. Gerson B, Orr J.M. Oligoclonal bands and quantitation of IgG in cerebrospinal fluid as indicators of multiple sclerosis. Am J Clin Pathol 1980, 73: 87-91.
6. Mandler R. Goren H. Valenzuela R. Value of central nervous system IgG daily synthesis determination in the diagnosis of multiple sclerosis. Neurology' 1982. 32: 296-298.
7. Miler J.R. Burke M.R., Bever C.F. Occurrence of oligoclonal bands in multipl scelrosis and other CNS diseases. Ann Neurol 1983, 143:53-58.
8. Rose A.S.; Ellison G. Myers E.W. Tourtellotte W.W. Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. Neurology 1976,26:20-22.
9. Ritche R.F. A simple, direct and sensitive technique for measurement of specific proteins in dilute solution. J Clin Med 1967,70:512-517
10. Metha P.D., Patrick B.A. Black J.I. Detection of oligoclonal IgG bands in unconcentrated CSF by isoelectric focusing in agarose gel and silver staining. J Neurosci Meth 1986, 16:277-282.
11. Link H., Laurenzi E.A. Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in multiple sclerosis determined by agarose gel electrophoresis and immunofixation. Ann Neurol 1979. 6:107-110.
12. Moulin D. Donald W. Libers G.C. and Libers W.P. The predictive value of cerebrospinal fluid electrophoresis in possible multipl sclerosis. Brain 1983. 106:809-816.
13. Delmolte P. Gonsett G. Biochemical findings in multiple sclerosis and other neurological diseases. J Neurol 1977. 215:27-37.
14. Tourtellotte W. Potvin A.R. Fleming J.O. et al. Multiple sclerosis: Measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. Neurology 1980. 30:240-24.
15. Carosio J.T. Kochwa S, Sacks H. Quantitative cerebrospinal fluid IgG measurements as a marker of disease activity in multiple sclerosis. Arch Neurol 1986, 43:1129-1131.
16. Capulo D. Zafraoni M. Ghezzi A. Cuzzolo D. Azothioprine reduces intrathecal IgG synthesis in multipl sclerosis. Acta Neurol Scand 1987. 75:84-86.