

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MULTİPL SKLEROZUN PROGRESİF SÜRECİNİN DİŞİ
WİSTAR SIÇANLARDA DENEYSEL OTOİMMÜN
ENSEFALOMİYELIT MODELİ İLE İNCELENMESİ VE
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİ

Dr. Barışcan ÇİMEN

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MULTİPL SKLEROZUN PROGRESİF SÜRECİNİN DİŞİ
WİSTAR SIÇANLARDA DENEYSEL OTOİMMÜN
ENSEFALOMİYELİT MODELİ İLE İNCELENMESİ VE
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİ

Dr. Barışcan ÇİMEN

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Mehmet Yıldırım SARA

ANKARA
2024

TEŞEKKÜR

Bilimi, bilimsel ahlakı, akademik dünyadaki sevgi ile saygıyı ve yerine göre abilik gibi hocalığı hem sunan hem öğreten; her daim yanımda olup tüm desteğiyle emeğini esirgmeden benimle paylaşan; daha fazla emek vermesini gerektirecek olsa da öğrencisinin hayallerini en önde tutup her daim destekleyen; hem akademik hem de kişilik bakımından gelişimimde sonsuz katkıları olan ve bu çalışmanın tüm süreçlerinin mimarı Sayın Hocam Prof. Dr. M. Yıldırım Sara'ya,

Tezim ve asistanlığım sürecinde her türlü desteği ve emeğini benimle paylaşan; bir farmakolog olarak yetişmemde sonsuz katkıları olan başta Sayın Prof. Dr. Alper Bektaş İskit olmak üzere Tıbbi Farmakoloji ABD Öğretim Üyesi tüm hocalarıma,

Benim için bilimde ve insanlıkta nezaketi; hekimlikte akademisyenlik nasıl olur ve yapılır; tıp fakültesi yaşamında öğrencilerin yüreklerine nasıl dokunuluru simgeleyen ve MS çalışmalarımın kıvılcımı Nöroloji ABD Öğretim Üyesi Sayın Hocam Prof. Dr. Meryem Aslı Tuncer'e,

Tez çalışmamdaki histopatolojik her şeyin mimarı olan; deney süreçlerinde beni her konuda destekleyip bana güven duyarak her basamaktaki sürece dahiliyetimi sağlayan ve beni birebir eğiten Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Hocam Prof. Dr. Oğuz Kul'a;

Tezim başta olmak üzere tüm çalışmalarımızda beraber olduğumuz, her daim desteklerini hissettiğim ve tüm süreçler ile zorlukları çekilir kılabilecek kadar sevgi dolu arkadaşlarım Dr. Berkay Alpay ve Dr. Elif Akaydın'a,

Yol arkadaşlığını tatmaktan ve yol arkadaşlığını yapmaktan onur duyduğum, her daim de duyacağım Dr. Esin Özçelebi'ye,

İmmün boyamalar için günün saatinden ve iş yükünden bağımsız tüm emeğini ve imkanlarını karşılıksız olarak bize sunarak yardımcı olan Sayın Şefika Karabulut'a,

Covid-19 pandemisi sırasında kaybettiğimiz dünyadaki tüm emekçi meslektaşlarıma,

Sevgi başta olmak üzere içimdeki tüm güzel hislerimin kaynağı ve temeli; emeğin, adanmışlığın ve koşulsuz sevginin en büyük yeri sevgili ailem: annem ile babam Meryem ve Osman Çimen'e; ablam Candan Tunç ile sevgili eşi abim Umut Tunç'a; çok sevdiğim yeğenlerim Ege ve Yaz'a,

Müteşekkirim.

ÖZET

Çimen B., Multipl Sklerozun Progresif Sürecinin Dişi Wistar Sıçanlarda Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit Modeli ile İncelenmesi ve Pentoksifilin Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024. Multipl skleroz (MS), santral sinir sisteminin primer demiyelinizan kronik bir hastalığı olup nörodejeneratif, inflamatuvar ve otoimmün bileşenler barındırmaktadır. Deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) ise yaygın olarak kullanılan bir MS hayvan modelidir. MS'in progresif süreci, kortikal demiyelinizasyon ve nöropsikiyatrik semptomlar (NPS) ile ilişkilidir. Lipopolisakkarit (LPS), Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) agonisti olup kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğini artırabilen bakteriyel bir endotoksindir. Pentoksifilin ise özgül olmayan fosfodiesteraz inhibisyon aktivitesi yanı sıra TLR4 antagonizması yapabilmektedir. Bu çalışmada, Wistar albino dişi sıçanlarda miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ile immünizasyon sonrası LPS enjeksiyonu ile KBB geçirgenliğinin artırılıp, kortikal demiyelinizasyon ve NPS'ler ile karakterize kronik progresif MS modeli oluşturulması ve pentoksifilin tedavideki yerinin ortaya konması amaçlandı. Sıçanların immünizasyonu, 100 µL hacimde 20 µg MOG antijeni ve eşit hacimli CFA (Freund'un tam adjuvanı) ile oluşturulan emülsiyonun kuyruk köküne subkutan enjeksiyonuyla yapıldı. KBB geçirgenliği evans mavisi protokolü ile, NPS'ler davranış testleri ile, demiyelinizasyon ve mikroglyal aktivasyon immünohistokimyasal incelemeler ile, periferik sinir tutulumu *in vivo* elektrofizyolojide bileşik aksiyon potansiyeli (CAP) kayıtları ile değerlendirildi. 4 mg/kg LPS'nin KBB geçirgenliğini artırdığı gösterildi. MOG ile immünize sıçanlara üçüncü haftada LPS enjeksiyonu yapılmasıyla 70. güne kadar devam eden kronik progresif MS modeli elde edildi. Oluşturulan modelde depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri duygudurum, kognitif disfonksiyon, motor disfonksiyon ve mekanik allodini saptandı. Subpial korteks ve hipokampüste şiddetli olmak üzere yaygın gri cevher demiyelinizasyonu ve eşlik eden mikroglyal aktivasyon belirlendi. Serum TNF- α seviyesinin yükseldiği ve periferik sinir elektrofizyolojisinde kronik süreçte refrakter periyodun uzadığı bulundu. Pentoksifilin 2 haftalık 100 mg/kg günlük intraperitoneal dozunun allodini, depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri duygudurum tedavilerinde etkin olduğu belirlendi. Bu tez çalışması, bilinen DOE modeline üçüncü haftada LPS enjeksiyonunun eklenmesi sonucunda kortikal demiyelinizasyon ve NPS'ler ile seyreden kronik progresif MS modeli oluşturulabildiğini ve pentoksifilin modelin NPS'lerinden özellikle depresyon, anksiyete ve ağrı üzerine tedavi edici etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Multipl skleroz, progresyon, nöropsikiyatrik semptomlar, kortikal demiyelinizasyon, elektrofizyoloji

ABSTRACT

Çimen B., Investigation of the Progressive Process of Multiple Sclerosis using an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model in Female Wistar Rats and the Effects of Pentoxifylline, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Ankara, 2024. Multiple sclerosis (MS) is a primary demyelinating chronic disease of the central nervous system with neurodegenerative, inflammatory, and autoimmune components. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a widely used animal model of MS. The progressive process of MS is associated with cortical demyelination and neuropsychiatric symptoms (NPSs). Lipopolysaccharide (LPS) is a Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist and a bacterial endotoxin that can increase blood brain barrier (BBB) permeability. Pentoxifylline, in addition to its nonspecific phosphodiesterase inhibition, can also exhibit TLR4 antagonism. In this study, we aimed to create a chronic progressive MS model characterized by cortical demyelination and NPSs in Wistar albino female rats by increasing BBB permeability through LPS injection after immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) and to reveal the effects of pentoxifylline in treatment. The immunization of the rats was performed by subcutaneous injection at the base of the tail with an emulsion of 20 µg MOG antigen in a volume of 100 µL and an equal volume of CFA (Complete Freund Adjuvant). BBB permeability was assessed using the Evans blue assay, NPSs were evaluated through behavioral tests, demyelination and microglial activation were examined by immunohistochemistry, and peripheral nerve involvement was assessed via compound action potential (CAP) recordings in *in vivo* electrophysiology. 4 mg/kg LPS was shown to increase BBB permeability. MOG-immunized rats were injected with LPS at week 3, resulting in chronic progressive MS model that persisted until day 70. Depression-like and anxiety-like behaviors, cognitive dysfunction, motor dysfunction and mechanical allodynia were detected in the model. Widespread grey matter demyelination, predominantly severe in the subpial cortex and hippocampus, accompanied by microglial activation, were identified. Serum TNF- α levels were found to be increased and peripheral nerve electrophysiology showed a prolonged refractory period during the chronic process. Daily intraperitoneal dose of 100 mg/kg of pentoxifylline for 2 weeks was found to be effective in the treatment of allodynia, depression-like and anxiety-like behaviors. This thesis study demonstrated that the addition of LPS injection at week 3 to the classical EAE model can create a chronic progressive MS model with prominent cortical demyelination and NPSs, and pentoxifylline had a therapeutic effect on the NPSs of our model, especially depression, anxiety and pain.

Keywords: Multiple sclerosis, progression, neuropsychiatric symptoms, cortical demyelination, electrophysiology

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİL DİZİNİ	xii
TABLO DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Multipl Skleroz (MS)	4
2.1.1. MS'in Klinik Özellikleri ve Seyri	4
2.1.2. MS'in Klinik Manifestasyonları	6
2.1.3. MS'in Klinik Değerlendirme Yöntemleri	7
2.1.4. MS'in Tanı Kriterleri	8
2.1.5. MS'in Patolojisi ve Patofizyolojisi	9
2.1.6. MS'in Tedavisi	10
2.2. MS Hayvan Modelleri	11
2.2.1. MS Modellerinin Güncel Durumu	11
2.2.2. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) Modeli	12
2.2.3. Theiler'in Mürin Ensefalomyelit Virüsü Modeli	13
2.2.4. Toksik Etki ile İndüklenen Model	14
2.2.5. Yeni Model İhtiyacı	14
2.3. Toll-Benzeri Reseptör 4 (TLR4)	15
2.3.1. Lipopolisakkaritler	16
2.3.2. Pentoksifilin	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Deney Hayvanları	19
3.2. Deney Protokolü ve Grupları	19
3.3. Kan Beyin Bariyeri Permeabilite Değerlendirmesi	25

3.4. LPS Uygulaması	27
3.5. İmmünizasyon	28
3.6. Vücut Ağırlığı Ölçümü	30
3.7. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) Skoru	31
3.8. Davranış Deneyleri	31
3.8.1. Açık alan arena testi	32
3.8.2. Von Frey Filamanı Testi	33
3.8.3. Tutma Testi	34
3.8.4. Rotarod Testi	34
3.8.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	35
3.8.6. Edilgen Kaçınma Testi	36
3.8.7. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi	37
3.9. Tam İdrar Tetkiki	38
3.10. Siklus Tayini	39
3.11. Modifiye DOE skoru	40
3.12. Serum ve Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinin Toplanması	41
3.13. Doku Toplanması ve Trimlenmesi	42
3.14. Doku Takibi ve Kesit Hazırlanması	44
3.15. Histopatolojik İncelemeler	45
3.16. İmmünoperoksidaz İncelemeler	47
3.17. Vücut Sıvılarında Sitokin Seviyeleri Tayini	51
3.18. Elektrofizyoloji İncelemeleri	51
3.19. Pentoksifilin Uygulaması	57
3.20. İstatistiksel Metodoloji	58
4. BULGULAR	60
4.1. LPS'nin KBB Permeabilitesi Üzerine Etkisi	60
4.2. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların Genel Klinik Seyri ve Vücut Ağırlığı	62
4.3. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların DOE skoru	63
4.4. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Davranış Bulguları	66
4.5. Modifiye DOE Skoru İçin Açık Alan Arena Testi Parametrelerinin Belirlenmesi Bulguları	81

4.6. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların Modifiye DOE Skoru	83
4.7. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Ek Görsel Bulgular	87
4.8. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Histopatolojik Bulgular	89
4.9. Modelin Oluşturulması Deneylerinde İmmünoperoksidaz İnceleme Bulguları	93
4.10. Modelin Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları	102
4.11. Modelin Serumda Sitokin Tayini Bulguları	115
4.12. Oluşturduğumuz Modelde Pentoksifilin Etkisi Bulguları	116
5. TARTIşMA	122
5.1. LPS'nin KBB Permeabilitesi Üzerine Etkisi	123
5.2. Kronik Progresif Multipl Skleroz Modelinin Oluşturulması	124
5.3. Modelin Davranışsal Karakterizasyonu	125
5.4. Modifiye DOE Skorunun Geliştirilmesi ve Oluşturulan Modelde Kullanımı	129
5.5. Modelin Histopatolojik Karakterizasyonu	131
5.6. Modelin İmmünoperoksidaz İncelemeler ile Demiyelinizasyon ve Mikroglia Aktivasyonu Açışından Karakterizasyonu	132
5.7. Modelin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu	134
5.8. Oluşturduğumuz Modelde Pentoksifilin Etkisi	136
5.9. Çalışmamızın Kısıtlılıkları	138
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	139
7. KAYNAKLAR	143

SİMGE VE KISALTMALAR

α	alfa
β	beta
κ	kappa
μ	mikro
A	Amper
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIF	Allogreft inflammatuar faktör (<i>allograft inflammatory factor</i>)
ANOVA	Varyans analizi
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i> rehberi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAP	Bileşik aksiyon potansiyeli (<i>compound action potential</i>)
CFA	Freund'un tam adjuvanı (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
CIS	Klinik izole sendrom
cm	santimetre
CMAP	Bileşik kas aksiyon potansiyeli (<i>compound muscle action potential</i>)
CNAP	Bileşik sinir aksiyon potansiyeli (<i>compound nerve action potential</i>)
CV	Kristal viyole (<i>crystal violet</i>)
D	diöstrus
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dk	dakika
DIS	Spasyal yayılım (<i>disseminated in space</i>)
DIT	Temporal yayılım (<i>disseminated in time</i>)
DMT	Hastalık modifiye edici tedavi (<i>disease modifying treatment</i>)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOE	Deneyisel otoimmün ensefalomiyelit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	Epstein-Barr virüsü

EDSS	Genişletilmiş Dizabilite Durum Skalası (<i>Expanded Disability Status Scale</i>)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EM	Evans mavisi
EMG	Elektromiyografi
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	gram
HE	Hematoksilen ve eozin boyaması
IBA	İyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü (<i>ionized calcium-binding adapter molecule</i>)
IHC	İmmünohistokimya
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
IVIG	İntravenöz immünglobülin
icv	intraserebroventriküler
ip	intraperitoneal
iv	intravenöz
k	kilo
KBB	Kan-beyin bariyeri
L	Litre
LFB	Luksol hızlı mavi boyaması (<i>luxol fast blue</i>)
LPS	Lipopolisakkarit
m	mili
M	molarite
MBP	Temel miyelin proteini (<i>myelin basic protein</i>)
MHC	Majör histokompatibilite kompleks
MHV	Fare hepatit virüsü (<i>mouse hepatitis virus</i>)
MOG	Miyelin oligodendrosit glikoprotein
MRG	Manyetik rezonan görüntüleme
MS	Multipl skleroz
MyD	Miyeloid diferansiyasyon primer yanıt proteini
n	nano

NF	Nörofasin (<i>neurofascin</i>)
NF-	Nükleer faktör
NPS	Nöropsikiyatrik semptom
O55:B5	<i>Escherichia coli</i> serotipi
OKB	Oligoklonal band
Ö	Östrus
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıp (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Fosfat tamponlu salin
PLP	Proteolipid protein
PT	Pertussis toksini
PPMS	Primer progresif multipl skleroz
PRR	Örüntü tanıma reseptörleri (<i>pattern recognition receptors</i>)
RNA	Ribonükleik asit
ROC	<i>Receiver-Operating Characteristic</i>
RP	Refrakter periyot
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (<i>rate per minute</i>)
RRMS	Relaps ve remisyonla seyreden multipl skleroz
SEM	Standart hata
sn	saniye
SPMS	Sekonder progresif multipl skleroz
SSS	Santral sinir sistemi
TAG	Geçici aksonal taşıyıcı protein (<i>transient axonal glycoprotein</i>)
TCA	Trikloroasetik asit
Th	Yardımcı T hücresi
TİT	Tam idrar tetkiki
TMEV	Theiler'in mürin ensefalomiyelit virüsü
TNF	Tümör nekrozis faktör
TLR	Toll-benzeri reseptör
v	Hacim (<i>volume</i>)
VF	Von Frey testi
w	Ağırlık (<i>weight</i>)

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MS'in klinik seyri.	5
Şekil 3.1. Çalışmanın genel akış şeması.	20
Şekil 3.2. Evans mavisi ile KBB permeabilite değerlendirmesi deney protokolü.	21
Şekil 3.3. Modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu deney protokolü.	22
Şekil 3.4. Modelin elektrofizyolojik karakterizasyonu deney protokolü.	23
Şekil 3.5. Pentoksifilin etkisi deney protokolü.	24
Şekil 3.6. KBB permeabilite deneylerine ait sıçan ve doku fotoğrafları.	27
Şekil 3.7. Emülsiyon oluşturmada kullanılan homojenizatör ve elde edilen emülsiyon formu.	29
Şekil 3.8. İnhaler anestezi sistemi.	30
Şekil 3.9. Açık alan arena testi.	33
Şekil 3.10. Von Frey Filamanı testi	34
Şekil 3.11. Rotarod testi.	35
Şekil 3.12. Yükseltilmiş artı labirent testi.	36
Şekil 3.13. Edilgen kaçınma testi.	37
Şekil 3.14. Porsolt zorunlu yüzme testi.	38
Şekil 3.15. İdrar örneği alınma prosedürü ve tam idrar tetkiki.	39
Şekil 3.16. İzole edilen beyin ve spinal kord dokuları.	43
Şekil 3.17. Beyin matriksi içinde ve trimleme sonrası beyin dokuları.	44
Şekil 3.18. Tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı.	48
Şekil 3.19. MBP ile boyanmış subgross doku görüntüsü üzerinde analizi yapılan gri ve beyaz cevher beyin bölgelerinin gösterimi.	49
Şekil 3.20. MBP immünohistokimya boyaması analizi için ImageJ programı ile değerlendirme.	50
Şekil 3.21. Elektrofizyoloji deney düzeneği parçaları.	53
Şekil 3.22. Duyusal ve motor sinir potansiyeli kaydı protokolü.	55
Şekil 3.23. Bileşik aksiyon potansiyeli kaydından örnek bir trase ve latans ile amplitüd değişkenlerinin hesaplaması gösterimi.	56

Şekil 3.24.	Refraktör periyot hesaplamaları.	56
Şekil 3.25.	Bileşik motor aksiyon potansiyeli kaydına ve refrakter periyot araştırılması sürecine dair sıralı trase görselleri.	57
Şekil 4.1.	LPS'nin 4 ve 18. saatlerde KBB permeabilitesi üzerine etkisi.	60
Şekil 4.2.	LPS'nin korteks, orta beyin, hipokampus ve serebellum olarak izole edilen beyin alanlarındaki KBB permeabilitesine bölgesel etkisi.	61
Şekil 4.3.	Modelin oluşturulması deneyleri süresinde sıçanların vücut ağırlıkları değişimi.	63
Şekil 4.4.	Modelin oluşturulması deneylerinde günlük DOE skoru.	65
Şekil 4.5.	Açık alan arena testinde gruplara göre haftalık toplam katedilen mesafe.	67
Şekil 4.6.	Von Frey filamanı testinde gruplara göre haftalık pati geri çekme eşiği değerleri.	70
Şekil 4.7.	Agresyon testinde gruplara göre haftalık tutma testi skoru.	72
Şekil 4.8.	Rotarod testinde gruplara göre haftalık düşme süresi.	74
Şekil 4.9.	Yükseltilmiş artı testinde gruplara göre açık kolda geçirilen süre değerleri.	76
Şekil 4.10.	Edilgen kaçınma testinde gruplara göre latans süreleri.	78
Şekil 4.11.	Porsolt zorunlu yüzme testinde gruplara göre hareketsiz kalınan süreler.	80
Şekil 4.12.	Açık alan arena testi parametreleri için yapılan ROC analizi görseli.	83
Şekil 4.13.	Modifiye DOE skoru parametrelerinin ayrı ayrı gösterimi.	84
Şekil 4.14.	Gruplara göre haftalık Modifiye DOE skoru değişimi.	86
Şekil 4.15.	Sıçanların kuyruk yarası ve yama şeklindeki tüy dökülmesi.	87
Şekil 4.16.	Sıçanların kuyruktan kaldırıldığında arka patilerinin ekstansiyon-fleksiyon durumu.	88
Şekil 4.17.	Sıçanların siklus tayini sırasında çekilen ışık mikroskobu görüntüleri.	89
Şekil 4.18.	Gruplara göre inflamasyon skoru.	90
Şekil 4.19.	Gruplara göre demyelinizasyon skoru.	92

Şekil 4.20.	Gri cevher alanlarının MBP(+) boyanma yüzdesi.	94
Şekil 4.21.	MBP(+) boyanma preparatlarından örnek görseller	96
Şekil 4.22.	Beyin ve spinal kord beyaz cevher alanlarının MBP(+) boyanma yüzdesi.	97
Şekil 4.23.	Gruplara göre 8. haftada subpial korteks, hipokampus, beyin beyaz cevheri ve spinal kord beyaz cevherinde IBA1(+) hücre sayısı.	100
Şekil 4.24.	IBA1 boyamasından örnek görseller.	101
Şekil 4.25.	Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında latans değerleri.	103
Şekil 4.26.	Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında maksimum amplitüd değerleri.	105
Şekil 4.27.	Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) kayıtlarında latans değerleri	106
Şekil 4.28.	Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) kayıtlarında maksimum amplitüd değerleri.	108
Şekil 4.29.	Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında refrakter periyot (RP) olarak belirlenen sitimuluslar arası süre değerleri.	110
Şekil 4.30.	Gruplara göre bileşik motor aksiyon potansiyeli kayıtlarında refrakter periyot olarak belirlenen sitimuluslar arası süre değerleri.	112
Şekil 4.31.	Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli kayıtlarında belirlenen SI50 değerleri.	114
Şekil 4.32.	Grupların 2. haftadaki stimulus şiddeti – yanıt eğrisi ve SI50 değerleri.	115
Şekil 4.33.	10. haftada gruplara göre serum sitokin seviyeleri.	116
Şekil 4.34.	Pentoksifilinin oluşturduğumuz modelde DOE skoru, lokomasyon ve motor durum üzerine etkileri.	117
Şekil 4.35.	Pentoksifilinin oluşturduğumuz modeldeki mekanik allodini üzerine akut ve kronik etkileri.	119

- Şekil 4.36.** Pentoksifilinin oluşturduğumuz modeldeki anksiyete-benzeri duygudurum, depresyon-benzeri duygudurum ve kognitif disfonksiyon üzerine etkileri. **120**
- Şekil 5.1.** Mikroglia morfolojik özellikleri. **134**



TABLO DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1. Deney grupları	24
Tablo 3.2. DOE skorlamasına ait klinik özellikler	31
Tablo 3.3. Modifiye DOE skoru parametreleri	41
Tablo 4.1. Von Frey filaman testi sonuçlarının gruplar arasındaki ikili kombinasyonlarına ait analiz sonuçlarının düzeltilmiş p değerleri	69
Tablo 4.2. Açık alan arena testi parametrelerinin DOE skoruna göre kıyası	82

1. GİRİŞ

Multipl Skleroz (MS), otoimmün kaynaklı olduğu düşünülen inflamatuvar, demiyelinizan ve nörodejeneratif bileşenleri bulunan kronik bir santral sinir sistemi (SSS) hastalığıdır (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya genelinde MS'ten etkilenen insan sayısı 2,5 milyon civarında tahmin edilmektedir ve MS, SSS demiyelinizan hastalıklarının en sık görülenidir (2). Temel olarak 3 alt tipte incelenmektedir: 1) Relaps ve remisyonla seyreden multipl skleroz (RRMS), 2) primer progresif multipl skleroz (PPMS) ve 3) sekonder progresif multipl skleroz (SPMS). MS hastalarının yaklaşık %85'i RRMS olarak tanı almakta fakat bu hastaların da yaklaşık %50'si hastalığın seyri sırasında progresif MS komponentleri geliştirerek SPMS'e dönüşmektedir. MS hastalarının geriye kalan yaklaşık %15'lik kesimi ise klinik tanı anında progresif seyir göstermekte ve PPMS olarak tanı almaktadır (3).

MS hastalığında SSS'de bulunan sinir liflerinin miyelin kılıfları hasarlanmaktadır. Bunun sonucunda, demiyelinizasyona bağlı olarak basit kas güçsüzlüğünden yürüyememe veya solunum kaslarının paralizisine kadar geniş bir spektrumda semptomlar ortaya çıkmaktadır. Hastaların klinik semptomları da kişiden kişiye değişmekte ve ciddi bir heterojenite göstermektedir. MS hastalarında daha ön planda olan motor semptomların yanında kognitif bozulma, depresyon, anksiyete, yorgunluk, ağrı ve duyuşal problemler gibi çeşitli nörolojik ve psikiyatrik semptomlar da görülmektedir (4, 5). Ek olarak MS, santral nöropatik ağrının en yaygın sebebi olarak bilinmektedir. MS hastalarının yaşam kalitesini oldukça düşüren bu semptomların patofizyolojisi ve spesifik tedavi seçenekleri açısından henüz ciddi bir bilgi birikimi mevcut değildir (6).

MS genel olarak beyaz cevherin tutulumu ve demiyelinizasyonu ile giden bir hastalık olarak bilinmektedir. Fakat son araştırmalar, MS'in progresyon sürecinde beyaz cevher demiyelinizasyonu yanında gri cevher demiyelinizasyonunun da önemli olduğunu ortaya koymaktadır (7). Dahası, MS ilişkili nöropsikiyatrik semptomların ve nörodejeneratif sürecin gri cevher tutulumuyla daha belirgin ilişki gösterdiği düşünülmektedir (8).

MS hastalığının prelinik çalışmalarında sıklıkla Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) modeli altın standart olarak kullanılmaktadır (9). DOE,

SSS'nin çeşitli alanlarında MS ilişkili lezyonların indüklenerek oluşturulduğu ve farklı metodolojilerde hastalığın farklı patofizyolojik açılarının incelenmesine olanak tanıyan bir hayvan modelidir (10). Sıçanlarda kortikal demiyelinizasyon ile giden DOE modeli oluşturulurken immünolojik hastalık modellerine yatkın olduğu bilinen Lewis veya Dark Agouti türleri daha yaygın olarak kullanılmakta ve bu yatkınlıkta majör histokompatibilite kompleks (MHC) haplotip farklılığının rol oynadığı iddia edilmektedir. Bu güne kadar geliştirilen DOE modellerinde, Wistar albino sıçan türünün dirençli ve klinik seyrinin heterojen olduğu kabul edilmektedir (11). Spesifik sıçan türlerinde kortikal demiyelinizasyon, serebral kortekse kateter aracılı direkt sitokin enjeksiyonu ile yakın dönemde yapılmıştır (12). Sitokin enjeksiyonu ile kan beyin bariyeri (KBB) hasarı oluşturulmakta ve immünizasyon sonrası miyeline karşı gelişen antikorlar ile özellikle subpial alanda demiyelinizasyon oluşması sağlanmaktadır. Güncel olarak MS'in progresif sürecini kortikal demiyelinizasyon, nörodejenerasyon, nöropsikiyatrik semptomlar ve klinik benzerlik açısından modelleyebilen kapsamlı ve başarılı bir model ise henüz geliştirilememiştir.

Sistemik ve lokal inflamasyonun indüklenmesi için lipopolisakkarit (LPS)'ler sıklıkla kullanılmaktadır (13). LPS, gram negatif bakterilerin dış membranlarından kaynaklanmakta ve temel olarak LPS'nin toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) üzerinden etki gösterdiği düşünülmektedir. LPS'nin özellikle mikroglialar olmak üzere glial hücrelerin stimülasyonunu, hatta nöronlar üzerinde TLR4 ekspresyonu olduğundan sistemik inflamasyonun yanında santral inflamasyonu da sağladığı bilinmektedir (14). Tüm bunların yanında genel bir doz ve suş çeşidi belirlenmiş olmasa da çeşitli LPS suş ve dozları ile farklı deney hayvanı modellerinde KBB geçirgenliğinin artırılabilirdiği ortaya konmuştur (15).

MS'in progresif patolojisinin, MS'teki kortikal demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon süreci ile ilişkisini değerlendirmek için güncel literatürde DOE modeli arayışı hala devam etmektedir. Günümüzde kullanılan progresif MS modellerinde, santraldeki inflamatuvar süreç spesifik sitokinlerin direkt santrale enjeksiyonu ile oluşturulmaktadır. Ancak bu modellerde inflamasyon kaskadı tamamıyla simüle edilememekte, kortikal patoloji disemine olarak sağlanamamaktadır ve MS kliniği tam olarak oturmamaktadır. Ek olarak kullanılan sıçan türleri spesifik, ulaşılması zor ve ekonomik olarak ciddi bir yük oluşturmaktadır.

Pentoksifilin kan akımını artıran vazoaaktif bir ilaçtır ve periferik vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Tüm fosfodiesteraz tipleri ve tümör nekrozis faktör – alfa (TNF- α) inhibitörüdür. Bu özelliklerinin yanında TLR4 inhibisyonu da yapmaktadır ve sıçanlarda epileptik nöbetlerin önlenmesinde bu özelliğinin kullanılabileceği gösterilmiştir (16). Pentoksifilin MS’de kullanımı daha önce çalışılmış fakat çelişkili sonuçlar elde edilmiştir ve bu çalışmaların çoğu RRMS için geçerli olup progresyon süreci için etkileri halen bilinmemektedir (17). Ek olarak pentoksifilin nöropatik ağrı için tedavi edici etkisinin de olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (18).

Bu çalışmadaki **hipotezlerimiz** şu şekildedir:

- 1) LPS, Wistar albino sıçanlarda KBB geçirgenliğini artırır ve santral inflamasyon indükler.
- 2) Periferden yapılan immünizasyon ile oluşturulan antikorların LPS aracılığıyla artırılan KBB geçirgenliği sebebiyle santrale geçmesi sağlanır ve santral inflamasyonun indüklendiği Wistar albino sıçanlarda, nöropsikiyatrik semptomlar ile kortikal demiyelinizasyonun ön planda olduğu kronik progresif MS modeli oluşur.
- 3) Pentoksifilin TLR4 antagonizması ile başta nöropatik ağrı olmak üzere MS ilişkili nöropsikiyatrik semptomları düzeltir.

Bu çalışma ile **amaçlananlar** şu şekildedir:

- 1) Wistar albino dişi sıçanlarda LPS’nin O55:B5 suşunun KBB geçirgenliğini artıran dozunun belirlenmesi
- 2) Wistar albino sıçanlarda nöropsikiyatrik semptomlar ile kortikal demiyelinizasyonun ön planda olduğu kronik progresif MS modelinin oluşturulması ve bu türde DOE modelinin oluşturulma direnci ile heterojenliğinin kırılması
- 3) Oluşturulan modelin ve modele eşlik eden periferik sinir tutulumunun davranışsal, histopatolojik, immünohistolojik ve elektrofizyolojik karakterizasyonunun yapılması
- 4) Pentoksifilin ağrı başta olmak üzere MS ilişkili nöropsikiyatrik semptomlardaki etkisinin araştırılması.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Skleroz (MS)

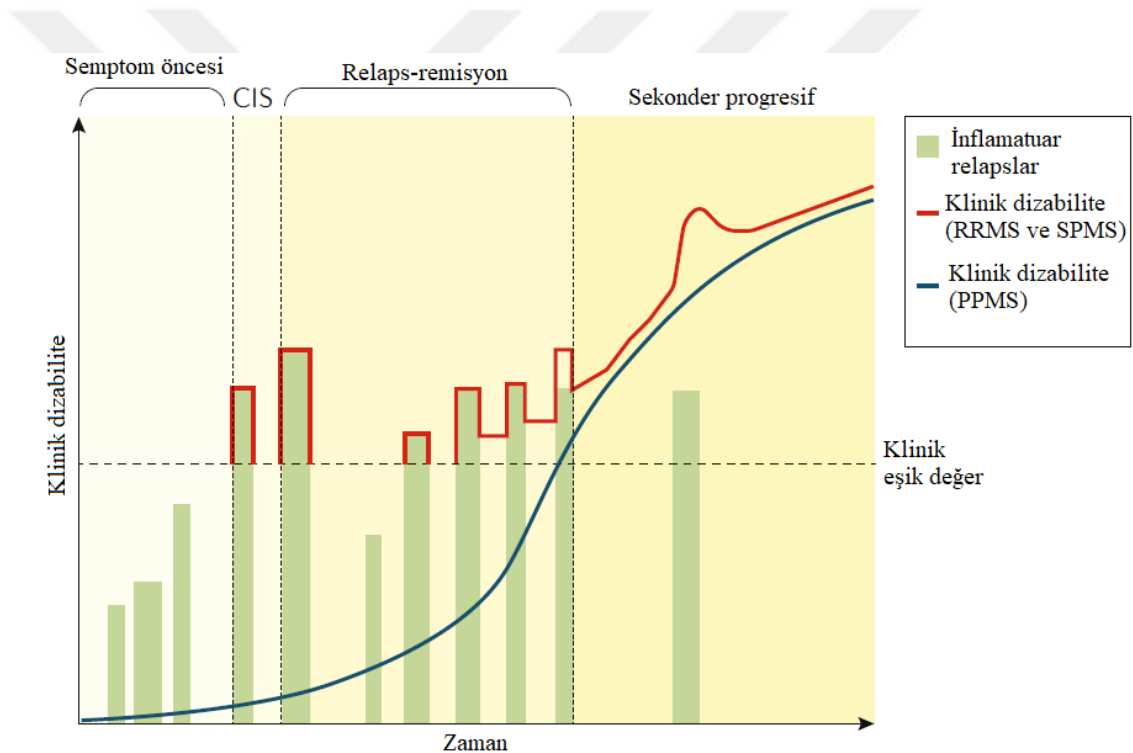
2.1.1. MS'in Klinik Özellikleri ve Seyri

Multipl skleroz (MS) santral sinir sistemi (SSS)'nin inflamatuvar, demiyelinizan, nörodejeneratif ve kronik bir hastalıdır. MS'in karmaşık genetik ile çevresel etken ilişkilerinden kaynaklanan immün-aracılı, çok faktörlü heterojen bir hastalık olduğu düşünülmektedir (19). MS'in patolojik karakteristik özelliği, beyin ve spinal kordun beyaz ve gri cevherinde demiyelinizan lezyonların birikmesidir. MS'in klinik seyri ve tutulum bulguları oldukça heterojendir ve hastadan hastaya ciddi olarak değişebilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya genelinde MS'ten etkilenen insan sayısı 2,5 milyon civarlarında tahmin edilmektedir (2). Klinik seyrin gidişatına göre MS, temel olarak 3 farklı alt tipte incelenmektedir: relaps ve remisyonla seyreden multipl skleroz (RRMS), primer progresif multipl skleroz (PPMS) ve sekonder progresif multipl skleroz (SPMS). MS klinik seyrinin, progresif-relapsla seyreden (PRMS), klinik olarak izole sendrom (*clinically isolated syndrome*, CIS), fulminan veya benign şekilde belirtilen farklı alt tipleri olsa da genel ve kabul görmüş ayırım 3 veya PRMS'in de dahil olduğu 4 alt tipi değerlendirmektedir (20). MS hastalarının yaklaşık %85'i RRMS olarak tanı almaktadır (bu oran farklı yayınlarda %80-90 arasında bildirilmektedir) fakat bu hastaların yaklaşık %50'si seyrinde progresif MS olup SPMS'e dönüşmektedir (3). MS hastalarının ilk tanı anında yaklaşık %15'lik kesimi ise progresif seyir göstermekte ve PPMS olarak tanı almaktadır. MS için alt tip değerlendirmelerinin yanında bazı yazarlar relaps ve progresyon durumlarını birbiri ile iç içe geçmiş daha geniş tanımlamalar olarak sunmaktadır (21). "Relaps" terimi Zeydan ve Kantarci (21) tarafından klinik olarak saatler ya da günler içerisinde gelişen SSS ilişkili yeni nörolojik semptom/semptomların gelişmesi veya subklinik olarak semptom görülmeden yeni MRG (manyetik rezonans görüntüleme) lezyonu görülmesi olarak iki şekilde de tanımlanmaktadır. Aynı yayında "progresyon" terimi ise; MS'in patolojik bulgusu olan ilerleyici aksonal hasar ve kayıp dolayısıyla nörolojik fonksiyonların geri döndürülemez şekilde kötüleşmesinin ifadesi olarak kullanılmaktadır. Klinik veya subklinik relapslar olmadan da progresyonun görülebilir

olması bu alt tipler arasında farklı patofizyolojik süreçlerin işliyor olabileceğini de düşündürmektedir.

Çoğu hastada günler veya haftalar içerisinde gerileyen geri dönüşlü nörolojik defisitler (relaps) hastalığın başlangıç fazının karakteristiğidir ve klinik izole sendrom (CIS) veya RRMS olarak değerlendirilmektedir. Zamanla, kalıcı nörolojik defisitlerin gelişmesi ve klinik dizabilitenin progresyonu daha da belirginleşmekte ve SPMS olarak bilinmektedir. Hastaların yaklaşık %10 ila %15'inin de başlangıçta progresif seyir gösterdiği ve PPMS olarak adlandırıldığı bilinmektedir. MS'in klinik süreçleri şematizasyonu Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. MS'in klinik seyri. (Bu şekil Filippi ve diğ. (19)'nin 2018 yılında MS derlemesi olarak hazırladıkları yayından alınarak dilimize çevrilmiştir. CIS: klinik izole sendrom; RRMS: relaps ve remisyonlar ile seyreden multipl skleroz; SPMS: sekonder progresif multipl skleroz; PPMS: primer progresif multipl skleroz)

MS tipik olarak, daha yüksek prevalans ile kadınları, 20 ila 40 yaş arasında genç erişkinleri etkilemektedir (22). Bazı MS hastaları ise -özellikle RRMS hastaları- çocukluk veya adölesan çağdan başlayarak demiyelinizan olaylar yaşamaktadır (23).

2.1.2. MS'in Klinik Manifestasyonları

MS'in klinik prezentasyonu heterojendir ve demiyelinizan lezyonun SSS'deki yerine bağlıdır. MS'e spesifik klinik bir bulgu olmasa da bazı bulguların oldukça karakteristik olduğu düşünülmektedir. MS hastalarının yaklaşık %85'inde, demiyelinizan lezyonun bulunduğu yere göre optik sinirde optik nörit, spinal kordta transvers miyelit, beyin sapı veya serebellumda beyin sapı veya serebellar sendrom ya da serebral hemisferlerde serebral hemisferik sendrom şeklinde nörolojik disfonksiyon görülen, beklenmeyen klinik ataklar yaşanmaktadır. RRMS'in klinik seyrinde relaps olarak bilinen ataklar görülmektedir. Bu relapslar 24 saatten uzun sürmekte ve ateş, enfeksiyon veya ensefalopati (bilinç bulanıklığı veya epileptik nöbet geçirmek gibi) kliniğinden bağımsız olmalıdır (24). Klinik atakların semptomları akut veya subakut başlangıçlı olmakta; haftalar veya günler içerisinde kötüleşmekte; en yüksek şiddetine 2 ila 3 haftada ulaşmakta; maksimum defisitini gördüğü andan 2 ila 4 hafta sonra kliniğin minimal gerilemesi ile tamamen iyileşmesi arasındaki bir skalada remisyona girmektedir (25).

Optik nörit, hastaların yaklaşık %25'inde ilk nörolojik bulgudur ve optik nörit hastalarının %34-75'inin 10 ila 15 yıl içinde kesin tanı alarak MS olduğu bildirilmiştir (26, 27). MS'in seyrinde hastaların yaklaşık %70'i optik nörit atağı geçirmektedir (28). Optik nörit ise klinik olarak; parsiyel veya komple görme kaybına eşlik eden santral skotom, diskromatopsi ve göz hareketleri ile kötüleşen orbita ağrısı ile karakterizedir.

Duyusal semptomlar, MS hastalarının yaklaşık %43'ünün ilk klinik bulgusudur ve çoğu zaman miyelit veya beyin sapı sendromundan kaynaklanmaktadır (29). Duyusal semptomlar; uyuşma, karıncalanma, iğne batması hissi, soğukluk hissetme veya uzuvlarda yada gövdede şişme şeklinde tanımlanan parestezi, Lhermitte bulgusu, vibrasyon veya eklem pozisyonu hissinde bozulma ve hafif dokunma algısında bozulma şekillerinde olabilmektedir. Lhermitte bulgusu ise boynun bükülmesiyle omurgadan aşağıya veya uzuvlara yayılan elektrik çarpması hissi olarak

tanımlanan geçici bir bulgudur (30). Ek olarak, Uhthoff fenomeni olarak bilinen, artan vücut sıcaklığıyla tüm semptomlarda kötüleşme görülebilmektedir (19).

Motor semptomlar, MS hastalarının yaklaşık %30-40'ında başlangıç semptomu iken hastalık seyrinde neredeyse hastaların tamamını etkilemektedir (31). Motor semptomlar; babinski bulgusu ya da artmış refleksler şeklindeki piramidal bulgular, parezi ve spastisite olarak bilinmektedir. Beyin sapı ve serebellar semptomlar MS hastalarının %70'inde görülmektedir ve nistagmus gibi göz hareketlerindeki etkilenmeleri, osilopsiyi, diplopiyi, ataksiyi, dismetriyi veya disfajiyi içermektedir. Bilinen en yaygın mesane disfonksiyonu bulgusu ise üriner inkontinans olarak gözükme (32).

MS'in diğer semptomları ise kognitif disfonksiyon, yorgunluk ve huzursuzluk hissidir. MS hastalarının %40-70'inde kognitif etkilenme bildirilmiştir ve erken dönemde dahi görülebilmektedir (33). Kognitif bozulmalar CIS'in mutlak MS'e dönüştüğünün öngörüsündeki en önemli etmendir ve bu bulgu kronik progresif MS'te daha sık ve daha belirgindir (34). MS'te görülen yaygın kognitif bozulmalar bilgi işleme hızında, yönetici işlevlerde, epizodik hafızada ve dikkatte disfonksiyon olmasıdır (33). Yorgunluk hissi ise MS hastalarının %95'inde görülmektedir (35).

MS hastalarının 2/3'ünde duygudurum bozukluklarına rastlanmaktadır ve bunlardan en yaygın olanı depresyondur (36). Ağrı ise hastaların %43'ünde görülmekle beraber trigeminal nevralji, dizestetik ağrı, sırt ağrısı, viseral ağrı ve ağrılı tonik spazmları içermektedir (37). Tipik olarak bahsedilen tüm klinik prezentasyonların, PPMS ve SPMS hastalarında RRMS hastalarına göre daha yüksek prevalansta ve şiddette olduğu da bilinmektedir (19).

2.1.3. MS'in Klinik Değerlendirme Yöntemleri

MS hastalarının klinik takibinde nitel (kalitatif) ve yarı-nicel (semikantitatif) çeşitli skalaların kullanımı mevcuttur. Bu skalalar MS'in klinik manifestasyonlarını ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır. En önemlileri ve en çok kabul göreni ise Genişletilmiş Dizabilite Durum Skalası (EDSS, *Expanded Disability Status Scale*)'dir (38). Bu skalaya ait skor 0 ile 10 arasında ve 0,5'lik kademelerle bir nörolog hekim tarafından yapılmaktadır. "EDSS 0" skoru tamamen normal muayeneyi "EDSS 10"

skoru ise MS kaynaklı ölümü belirtmektedir. Bu skor; piramidal, serebellar, beyin sapı, duyuşal, bağırsak ve mesane fonksiyonu, vizüel fonksiyonlar, serebral fonksiyonlar ve diğerk şeklindeki 8 alt kategoride fonksiyonel sistem değerkendirmesini de gerekli kılmaktadır. EDSS skorlarında kabaca 1-4,5 arası herhangi bir yardım almadan yürüyebilen fakat 8 tane fonksiyonel sistemde çeşitli bulguları olan MS hastalarını; 5-9,5 arası ise yardım almadan yürüyemeyen MS hastalarını tariflemektedir.

2.1.4. MS'in Tanı Kriterleri

MS'in tanısı temel olarak klinik kriterler ile konulmaktadır ve çoğuk zaman RRMS tanısı için en azından kısmi olarak gerileyen iki veya daha fazla SSS disfonksiyon atağının meydana gelmesi yeterlidir. Tanı klinik olarak konuluyor olsa da MRG bulguları da bu konuda belirgin katkı sağlamaktadır. 2017 yılında revize edilen MS tanısı kriterleri şuk şeklindedir (39):

RRMS

- En az iki klinik relaps ve nörolojik muayenede ayrı anatomik lokasyonlarda belirgin klinik delili olan en az iki lezyonun olması veya en az iki klinik relaps ve klinik delili olan bir lezyon ile farklı bir anatomik konumda bir lezyon bulunduğuna dair belirgin delili bulunan önceki bir nüksün varlığı
- En az iki klinik relaps ve bir lezyonun belirgin klinik delili; ek olarak spasyal yayılım ile (DIS, *disseminated in space*) farklı bir SSS bölgesine dair ikinci bir klinik relapsın gösterilmesi (MRG bulgusu da olabilir)
- Bir klinik relaps ve iki veya daha fazla klinik delili olan lezyon; ek olarak temporal yayılım (DIT, *dissemination in time*) ile ikinci bir klinik relapsın veya MRG bulgusunun veya beyin omurilik sıvısı (BOS)-spesifik oligoklonal band (OKB) varlığının gösterilmesi
- Bir klinik relaps ve klinik delili olan bir lezyon; ek olarak DIS ile veya MRG ile farklı bir SSS alanının ikinci bir klinik relapsının gösterilmesi, ya da DIT ile ikinci klinik relapsın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB gösterilmesi

PPMS

Hastalık başlangıcı itibariyle progresyon ile karakterize, klinik relapstan bağımsız 1 yıllık dizabilite progresyonu (retrospektif veya prospektif olarak belirlenen) ve aşağıdaki kriterlerden en az iki tanesi:

- MS'e karakteristik beyin alanlarından (periventriküler, kortikal ve/veya jukstakortikal ya da infratentorial) en az bir tanesinde bir ya da daha fazla T2-hiperintens lezyonun varlığı
- Semptomatik veya asemptomatik olmasından bağımsız olarak spinal kordta 2 ya da daha fazla T2-hiperintens lezyonun varlığı
- BOS-spesifik OKB'nin gösterilmesi

İlk bilinen Schumacher tanı kriterleri DIS ve DIT için yalnızca klinik muayeneye dayalı kanıt gerektirmekteydi ve bu kriterler MRG'nin bulunmasından bile önce oluşturulmasına rağmen hala DIS, DIT veya relaps gibi tanımlamalarda kullanılmaktadır (40).

2.1.5. MS'in Patolojisi ve Patofizyolojisi

Tüm MS tiplerinin karakteristik patolojik bulgusu lezyon olarak da adlandırılan fokal plaklardır ve bu plaklar tipik olarak post-kapiller venüllerin etrafında demiyelinize alanlar olarak belirlenmektedir (19). Ek olarak kan-beyin bariyeri (KBB) hasarı da aynı alanlarda görülmektedir. KBB hasarının neden geliştiği tam olarak bilinmemekle beraber; yerleşik (*resident*) hücrelerin ve endotelial hücrelerin ürettiği pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin (TNF, IL-1 β ve IL-6) direkt etkisi ve sitokin-bağımlı ile kemokin-bağımlı lökosit-aracılı hasarın etkisiyle oluşabileceği önerilen mekanizmalardandır (41, 42). KBB'nin disregülasyonu sonucu aktive lökositlerin, makrofajların, T hücrelerin ve B hücrelerin trans-endotelial migrasyonu artmaktadır. Bunun sonucu olarak da oligodendrosit kaybı, reaktif gliosis ve nöroaksonal dejenerasyon ile sonuçlanacak olan inflamasyon ve demiyelinizasyon başlamaktadır (43, 44).

Plaklar beyaz cevher ve gri cevherin ikisini de kapsayan beyin, spinal kord ve optik sinirde tüm SSS'yi kapsayacak şekilde bulunmaktadır (45). MS'in görünür klinik

septomlarının çoğu beyaz cevher lezyonları ile ilişkili olsa da diğer alanların tutulumu da oldukça önemlidir.

MS'in erken dönemleri (CIS ve RRMS) aktif demiyelinizan plakların varlığı ile karakterizedir ve bu lezyonlar ağır bir lenfosit infiltrasyonuna (ana olarak $CD8^+$ T hücreler ve $CD20^+$ T hücreler, az olarak da $CD4^+$ T hücreler) aktive olmuş mikrogliyalara (özellikle miyelin debris içermekte), makrofajlara ve büyük reaktif astrositlere sahip olmakta (46, 47). PPMS ve SPMS hastaları ise temel olarak inaktif lezyonlara sahiptir. İnaktif lezyonlar sınırları belirlenmiş, hiposelüler, belirgin demiyelinize, azalmış aksonal yoğunluğu olan, reaktif astrosit gliozisi görülen ve plak çevrelerinde belirginleşen mikrogliyal aktivite gösteren alanlardır (48).

MS hastalarının erken döneminde (CIS ve RRMS) ön beyin ve serebellumda şiddetli demiyelinizasyon görülmektedir (49). PPMS ve SPMS hastalarında ise bu alanlarda görülen şiddetli demiyelinazasyonun miktarı da belirgin olarak artmaktadır (50). Progresif MS'in şiddetli klinik vakalarında korteksin %60'ından fazlasında demiyelinizasyon görülebildiği belirtilmektedir. Gri cevher demiyelinizasyonu derin gri cevher çekirdeklerine kadar ulaşabilmektedir.

MS'in immün patofizyolojisi ile ilgili kanılarımız son dönemlerde oldukça ciddi değişimler göstermiştir. Klasik bilgi MS relapslarının T hücre aracılı olduğunu belirtmesine rağmen, şu an T hücreler, B hücreler, periferik hücreler, mikrogliya ve astrosit gibi yerleşik hücrelerin patofizyolojide çeşitli ilişkilerinin oldukça önemli olduğu bilinmektedir (51). Periferik immün hücreler ile beraber SSS-yerleşik hücrelerin salıverdiği çeşitli inflamasyon mediyatörleri santral parankimde demiyelinizasyona ve inflamasyona sebep olmaktadır. Progresif tip MS için ise SSS'de devam eden inflamasyonun ayrı bir patoloji oluşturduğu düşünülmektedir.

2.1.6. MS'in Tedavisi

MS tedavisinde oldukça fazla seçenek varmış gibi gözükse de özellikle progresif tip için oldukça kısıtlı tedavi seçeneği mevcuttur. MS tedavisi ana hatlarıyla hastalık modifiye edici (DMT, *disease modifying treatments*) ajanlarla inflamatuvar hastalık aktivitenin baskılanmasını ve uzun vadeli yönetimi sağlamak üzere klinik relapsları önlemek için kullanılan tedavileri içermektedir (19). DMT'ler arasında yer

alan interferon β (IFN β) ve glatiramer asetatın enjeksiyonluk formları güvenli klinik profilleri dolayısıyla uzun süre ilk sıra tedavi ajanı olarak kullanılmıştır. Fakat bu ajanların etkinliklerinin de çok yüksek olmadığı belirlenmiştir.

Güncel yaklaşımda MS hastalarının akut relapsının tedavisinde sırasıyla intravenöz metilprednizolon, plazmaferez ve intravenöz immünglobülin (IVIG) tedavileri uygulanmaktadır (52). Hastalık aktivitesinin baskılanması/önlenmesi amacıyla CIS ve RRMS hastalarının genel tedavisinde seçenecek ilaçlar ise şunlardır: interferonlar, glatiramer asetat, fingolimod, teriflunamid, dimetil fumarat, natalizumab, alemtuzumab, okrelizumab, kladribin, siponimod ve ritüksimab.

MS'in progresif tiplerinde ise tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı hale gelmektedir. CD20 monoklonal antikor olan okrelizumab, PPMS tedavisinde 24 haftalık sürede %25'lik hastalık progresyonu önleme başarısıyla kullanım onayı almıştır (53). Okrelizumaba rağmen MS'in progresif süreci yeni tedavi ajanlarına ve daha etkin tedavilere halen ihtiyaç duymaktadır. Diğer yandan, MS'in genel tedavi ajanlarının azlığı ve özellikle progresif tip MS'in tedavi ajanlarının nadirliği düşünüldüğünde; MS'in ilk bölümlerde anlatılmış olan kendine özgü ana semptomları haricindeki bulgularına yönelik ise henüz belirgin tedavi ajanlarının neredeyse hiç olmadığı görülmektedir.

2.2. MS Hayvan Modelleri

2.2.1. MS Modellerinin Güncel Durumu

MS'i tüm klinik ve patolojik özellikleriyle tam anlamıyla modelleyebilen şu ana kadar bir deney hayvanı modeli geliştirilememiştir. Fakat MS'in bugünkü tedavi yönetiminde geldiğimiz noktayı sağlayan bilgi birikiminin neredeyse tamamını da bu modellerden elde ettiğimiz yadsınmamalıdır. MS modellerinin bilinen en önemli genel sınıflaması şu şekildedir:

1. Deneysel Otoimmün/Allerjik Ensefalomyelit (DOE) modeli
2. Viral olarak indüklenen kronik demiyelinizan hastalık modeli
3. Toksik etki ile indüklenen model

2.2.2. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) Modeli

Bu güne kadar en çok çalışılmış ve en çok tecrübenin edinildiği MS modelidir. Temel olarak, deney hayvanının SSS'sinin bir komponenti antijen olarak kullanılarak kendisine adjuvan eşliğinde enjekte edilmekte ve otoimmün yanıt oluşturulması sağlanmaktadır. Bu antijenlerin yaygın olarak kullanılanları temel miyelin proteini (MBP), proteolipid protein (PLP) ve son dönemlerde daha yaygın olanı miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG)'dir. Bu antijenler haricinde hayvanda otoimmünite tetiklenmesi için spinal kord homojenatı kullanıldığı da olmaktadır. Bu durum ilk olarak 1933 yılında tavşan beyin homojenatının maymunlara uygulandığında maymunların spinal kord ve beyinlerinde demiyelinizasyon geliştiğinin farkedilmesiyle ortaya konulmuştur (54). Freund'un tam adjuvanı (CFA) ve pertussis toksin (PT) ise daha sonradan modele eklenerek hümmoral immün yanıtın potansiyasyonu sağlanmıştır (55, 56). Bu eklemeler ile DOE modeli MS'in o gün bilinen tek türü olan RRMS ile ciddi bir benzerlik göstermiştir. Bu eklemeler, ataklar ile giden osilasyonu sağlamak için yapılmaktadır (57). DOE modeli farelerde yapıldığında kuyruktan başlayıp asendan yayılan bir paralizi yapmaktadır (58). Bu model bir antijenin veya proteinin uygulanması ile aktif olarak yapılabildiği gibi, ensefalitojenik T hücrelerinin transferi ile pasif olarak da yapılabilmektedir (59). Çok yakın dönemlerde kullanılabilen antijenlerin çeşitliliği artmış ve nörofasin NF 155, geçici aksonal taşıyıcı protein 1 (*transient axonal glycoprotein-1*, TAG-1) gibi antijenlerin de uygulaması görülmüştür (60, 61).

DOE modeli olarak kullanılan deney hayvanlarında klinik durum DOE skoru ile takip edilmektedir. Relaps, remisyon veya progresyon tanımlamaları bu skorun seyrine göre yapılmaktadır. Örneğin DOE skorunun devamlı artması veya belirli bir yükseklikte seyretmesi progresyon olarak nitelendirilmektedir. Bu tanımlamalar MS hastalarının kliniğinde EDSS ile yapılan takibine benzemektedir. Hayvan modellerinde bu skora ait tanımlamalar MS'in klinik takibindeki gibi net kriterler içermese de genel kanı bu yöndedir.

DOE temelinde SJL/J farelerde RRMS kliniğinin C57BL6J farelerde ise PMS kliniğinin simüle edildiği düşünülmektedir. Fakat bu kanı, modellerin sadece klinik prezentasyonları dolayısıyla almış oldukları sınıflamadır ve örneğin progresif MS'in

çoğu özelliği bu model ile elde edilememektedir. Sıçanlarda yapılan DOE modelleri ele alındığında genel olarak Lewis veya Dark Agouti türü sıçanların kullanıldığı görülmektedir. Bu sıçanların immün modellere yakınlığı bilinmektedir (62). Diğer sıçan türlerinin dirençli olduğu ve bu direnç veya yakınlıkta majör histokompatibilite kompleks (MHC) haplotipinin önemli olduğu bulunmuştur (11). MS'in progresyon süreci tetiklenmeye çalışılırken de bu modeller kullanılmakta olup başarılılabildiğinde fare modellerinde olduğu ciddi bir yükseklikte seyreden klinik skor görülmektedir. Klinik skorun kuyruk ve beraberinde arka iki patinin paralizisine denk gelen skorlarda oluşu progresif süreçte genellikle görülmektedir ve bu klinik durum davranışsal testlerle NPS'lerin test edilebilmesini zorlaştırmaktadır. Dahası, bu skor bilinen modellerde hızlı bir şekilde yükselmekte ve MS'in tedavisinde oldukça büyük yeri olan monoklonal antikorlar gibi tedavilerin uzun dönemli takip gerektiren ilaç denemelerini yapmaya imkan tanımamaktadır.

Günümüzde, DOE modeli yapılırken kullanılan PT için çeşitli uygulama metodları bulunmaktadır. Bu toksini antijen uygulaması ile aynı gün veya aynı güne ek olarak rapel dozlarla yapan çalışmalar bulunmaktadır. PT'nin DOE modelindeki etkilerine dair çeşitli mekanizmalar öne sürülmektedir. PT'nin, KBB geçirgenliğini artırarak (63); bağışıklık sistemini Th1-hücre (yardımcı T hücresi tip 1) daha baskın olacak şekilde aktive ederek (64); hastalık seyrinin daha monofazik olmasını ve indüklenen demiyelinizasyonun daha baskın olarak spinal kord tutulumu yapmasını sağlayarak (65) DOE modeline katkı yaptığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

2.2.3. Theiler'in Mürin Ensefalomiyelit Virüsü Modeli

Epidemiyolojik çalışmalar erken yaşam dönemlerinde geçirilen viral enfeksiyonların, yakınlık genetik arka planı olan kişilerde otoimmünite gelişmesine sebep olabileceğini belirtmektedir (66). Fakat şu ana kadar MS'e sebep olduğu bilinen spesifik bir virüs belirlenebilmiş değildir. Epstein Barr Virüsü (EBV)'nin bu konuda rolü olabileceğine dair yayınlar olsa da henüz netleşmiş bir bilgi bulunmamaktadır (67). Farelerde SSS'de demiyelinizasyon en iyi olarak pikarnovirüs, bazı koronavirüs suşları ve fare hepatit virüsü (MHV) ile yapılabilmektedir (68). Theiler'in mürin ensefalomiyelit virüsü (TMEV) de pikarnovirüs ailesindendir. DOE'den farklı olarak bu model sadece farelerde geliştirilebilmekte ve sadece progresif klinik

oluşturabilmektedir. Fakat progresif kliniği çok hızlı ilerleyici ve ciddi dizabilite ile giden türden olmaktadır. Bu modelin DOE ve MS'ten önemli bir farkı ise aksonal hasarının miyelin orijinli şekilde (*inside-out* model) olarak görülmesidir (69). Fakat DOE modeli ve MS'de, aksonal hasar şiddetli demiyelinizasyona sekonder olarak oluşmaktadır (*outside-in* model).

2.2.4. Toksik Etki ile İndüklenen Model

Yukarıda bahsedilen modellere ek olarak demiyelinizasyon kimyasal ajanlarla da indüklenebilmektedir (70). Bu modeller MS'in immün patolojisini çalışmak için uygun olmasa da demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmak açısından oldukça uygun yöntemlerdir (71). Bu amaçla yaygın olarak kullanılan iki kimyasal ajan kuprizon ve lizolesitindir. Kuprizon bakır şelate edici bir ajandır ve normal beslenmeye katılarak uygulanmaktadır. Oligodendroglial hücre ölümü ardından demiyelinizasyon ve demiyelinizasyona bağlı olarak da astrosit ile mikroglia aktivasyonu gelişmektedir (72). Kuprizonun spesifik hedefi ise oligodendrositler olmaktadır. Diğer bir kimyasal ajan olan lizolesitin ise fosfolipaz A2 aktivatörüdür ve lokal enjeksiyonları ile fokal demiyelinizasyonlar geliştirilebilmektedir (73). Bu ajan ile demiyelinizasyon ise; oligodendrositlere verilen hasara sekonder olarak değil primer deterjan etkisi ile gerçekleşmektedir (74).

2.2.5. Yeni Model İhtiyacı

MS tarihsel olarak beyaz cevherin hastalığı olarak bilinmektedir. Fakat gri cevherin tutulumu uzun zamandır, hatta tanımlayıcısı Charcot (75) tarafından bile yüzeysel olarak ortaya konmuştur. Kurtzelnigg ve diğ. (76), PPMS ve SPMS'in diffüz beyaz cevher hasarının yanında belirgin kortikal demiyelinizasyon ile karakterize olduğunu belirtmiştir. Ek olarak meningeal inflamasyonun kortikal demiyelinizasyona eşlik ettiği patoloji, kronik progresif MS için oldukça önemli bir parametre olarak bildirilmektedir (77). Bu sebeplerle MS'in progresyonunu çalışmak için kullanılan DOE modellerinde meningeal alanda inflamasyon ve geniş yayımlı kortikal demiyelinizasyon yapılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla daha önce yapılmış çalışmaların en sonuncusunda, MOG ile immünizasyon sonrası 4. haftada serebral kortekse direkt sitokin enjeksiyonu sonucunda kortikal demiyelinizasyon elde

edilmiştir (12). Fakat bu model de, sadece kortikal demiyelinizasyonu barındırmakta ve MS'in diğer tüm klinik özelliklerinden yoksun kalmaktadır.

MS'in ana semptomları olan motor bulgularının dışındaki nöropsikiyatrik (non-motor) semptomlar hastalığın çok ciddi bir alanı olarak karşımıza çıkmakta ve bu semptomların kortikal demiyelinizasyon ile daha belirgin ilişki gösterdiği düşünülmektedir (8). Güncel literatürde progresif MS modeli olarak C57BL/6J farelerde MOG ile indüklenen ve DOE skorunun progresif olarak arttığı DOE modeli kullanılmaktadır (59). Fakat bu modelin de ilerleyici motor bulguları, progresif süreçte nöropsikiyatrik semptomların davranışsal testler ile çalışılmasını zorlaştırmaktadır.

Tüm anlatılan modeller ve MS bilgileri beraber düşünüldüğünde MS'in kronik sürecini ve bu süreçte görülen NPS'lerini değerlendirebileceğimiz çok yönlü bir model göze çarpmamaktadır. Bu bağlamda patofizyolojisi ve klinik özellikleriyle progresif MS'e benzeyen fakat davranış testlerini yapabilmeyi imkansız kılacak derecede motor bulgusu olmayan yeni MS modellerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda kronik progresif MS modelinin elde edilebilmesi için Wistar sıçanların kullanılması planlanmıştır. Bu sıçanlar otoimmün hastalıkların modellenmesinde görece dirençli olarak bilinen türlerdir. Çalışmamızda bu direncin klinik şiddeti azaltabilecek ve böylece NPS'lerin test edilmesini sağlayabilecek deneylerin mümkün kılınmasında bir avantaj olabileceği düşünülmüştür. Ek olarak, klinik seyrin daha yavaş progrese olması da uzun dönemli tedavi denemelerinde artan klinik şiddetin maskeleyici etkisini ortadan kaldırabilecektir.

2.3. Toll-Benzeri Reseptör 4 (TLR4)

Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) örüntü tanıma reseptörleri (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) ailesinin bir üyesidir ve ekstraselüler matriks tarafından patojen tanınmasına bağlı oluşturulan immün yanıtta önemli roller üstlenmektedir (78). TLR'ler Janeway'in (79) örüntü tanıma reseptörlerini tanımlayıcı özelliklerine ilişkin öngörülerini sağlayabilen ilk protein ailesi olarak bilinmektedir (80). PRR'lerin, Patojen İlişkili Moleküler Kalıplar (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Pattern*) olarak bilinen korunmuş mikrobiyal ürünleri tanıyan ve sonuç olarak bağışıklık ile konak savunmasını uyaran indükleyici kodlanmış proteinler olarak çalıştığı tahmin

edilmektedir. Memelilerin hücre zarında bulunan TLR'ler çeşitli mikrobiyal hücre yüzey bileşenlerini tanıyabilmektedir. En iyi bilinen TLR'lere örnek verilecek olursa LPS'yi tanıyan TLR4; flagellini tanıyan TLR5; bakteriyel lipoproteinleri tanıyan TLR1, TLR2 ve TLR6 göze çarpmaktadır. Bunların yanında endozomda bulunup nükleik asit tanıyabilen TLR3 (çift zincirli RNA), TLR7 (tek zincirli RNA), TLR8 (tek zincirli RNA), TLR9 (metillenmemiş CgP içeren tek zincirli DNA) ve TLR13 (bakteriyel ribozomal RNA)'de önemli olanlarındandır (80). İnsan TLR10'unun ise henüz net bir ligandının olduğu belirlenebilmiş değildir.

TLR'lere ligand bağlanması ile reseptör dimerizasyonu gerçekleşmekte ve TLR'ler, farklı sinyal yollarına aracılık eden bir dizi adaptör protein ile etkileşime girebilmektedir. Miyeloid diferansiyasyon primer yanıt proteini 88 (MyD88) en yaygın kullanılan TLR adaptör proteindir ve TLR3 hariç tüm TLR'lerin sinyal yolağında aracılık sağlamaktadır (81). Bu sinyal yolağı nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'ye kadar ilerlemekte ve MyD88-NF- κ B yolağı olarak adlandırılmaktadır.

SSS'nin ve immün sistemin etkileşimi klinik olarak gördüğümüz bir çok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde rol almaktadır (82). MS hastalığının da patofizyolojisinde TLR'lerin belirgin rolü olduğu düşünülmektedir (83). TLR'lerin en önemlilerinden biri olan TLR4'lerin MS ve DOE patofizyolojisinde rolü olduğu daha önce net olarak ortaya konmuştur (84). Bu bağlamda TLR modülasyonları ile beraber TLR4 inhibitörlerinin MS ve DOE tedavisindeki yeri de araştırılmaktadır (85).

2.3.1. Lipopolisakkaritler

Lipopolisakkaritler (LPS) gram negatif bakterilerin önemli bir dış membran bileşenidir. Deney hayvanlarında inflamasyon ve sepsis modellerinin oluşturulması açısından önemli bir yere sahiptir. Temel mekanizması da TLR4 agonizmasıdır (86). Çalışmamızda kullanılacak olduğu amaç olan KBB permeabilitesinde artış yapma özelliği ise farklı suşlar ve model organizmalarda daha önce belirlenmiştir (15). Çalışmamızda LPS'in, KBB geçirgenliğinde belirgin artış yapan dozunun kullanılması planlanmıştır. Fakat LPS, bu özelliğinin dışında DOE modellerinde daha önce farklı amaçlar ile özellikle adjuvan olması açısından kullanılmıştır (87).

LPS'nin DOE modellerinde adjuvan olarak kullanıldığı çeşitli metodlar denenmiştir. DOE modeli oluşturulurken uygulanacak immünizasyondan önce LPS verilerek immün sistemin modülasyonu sağlanmaya çalışılmıştır (88). İmmünizasyon yapılırken Freund'un adjuvanı yanında ek adjuvan olarak immünizasyon ile eş zamanlı ve PT'nin yerine kullanılarak denenmiştir (87). Düşük doz sistemik inflamasyon tetiklenmesi ve buna bağlı olarak remisyondaki demiyelinize lezyonların aktivasyon durumu araştırılmıştır (89). Çalışmamızda ise immünizasyondan belirli bir süre sonra programlı olarak KBB permeabilitesini artıran belirgin yüksek bir dozda DOE modeline katkısı araştırılmaktadır. Ek olarak çalışmamız dizaynında immünizasyon sırasında veya belli bir süre sonunda PT enjeksiyonu yapılmamakta ve immün modülasyon kronik süreçte sadece LPS ile tetiklenmektedir.

2.3.2. Pentoksifilin

Pentoksifilin bir metilksantin türevi olup genel olarak anti-inflamatuar özellikleri ile bilinmektedir (90). Aynı zamanda pentoksifilin viskoziteyi azaltarak kan akımının artışı sağlayabilen bir farmakolojik ajandır. Semptomatik kladikasyo için periferik arter hastalıklarında tedavi endikasyonu bulunmaktadır ve uzun zamandır bu endikasyonla kullanılırken güvenlik profilinin ilgili dozlarda başarılı olduğu ortaya konmuştur. Pentoksifilinin FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylı tek endikasyonu da periferik arter hastalığıdır. Fakat, resmi onayı bulunmasa da kronik venöz bacak ülserleri için önerildiği rehberler bulunmaktadır (91).

Pentoksifilin bilinen diğer ksantin türevleri gibi özgül olmayan fosfodiesteraz enzim inhibisyonu yapmaktadır (92). Tümör nekrozis faktör (TNF) ve lökotrien sentezi inhibisyonu yaparak hem inflamasyonu hem de doğal bağışıklık yanıtını baskılamaktadır (93, 94). Pentoksifilinin belirtilen ana etki mekanizmaları haricinde TLR4 antagonizması yaptığı da bilinmektedir (16, 92).

Pentoksifilinin MS ve DOE modellerinde daha önce yapılmış çeşitli çalışmaları bulunmaktadır. MS hastalarında yapılan klinik çalışmalarında ağırlıklı olarak negatif yönlü çelişkili sonuçlar saptanmıştır (95-97). Bilinen DOE modelinde yapılan çalışmalarda ise pentoksifilinin tedavi edici potansiyelinin olabileceği belirlenmiştir (98). Daha önce yapılan bu hayvan çalışmalarında pentoksifilinin TNF baskılayıcı özelliği dolayısıyla DOE'de etkili olabileceği hipotezi test edilmiştir (99).

Fakat TNF inhibisyonunun MS tedavisindeki başarısı da halen çelişkiler barındırmakta ve tartışılmaktadır (100). Çalışmamızdaki şekliyle MS'in kronik progresif süreci kapsamlı olarak modellenebildiğinde TLR4 antagonizmasının tedavideki yeri aydınlatılacaktır. Ek olarak MS'te de önemli bir NPS olan santral nöropatik ağrının tedavisinde de pentoksifilin etkili olabileceği saptanmıştır (18). Bu bağlamda MS ilişkili NPS'lerin modellenip test edilebildiği çalışmamızda pentoksifilin yeri araştırılacaktır.

Çalışmamızda, oluşturulacak modelin TLR4 agonizması ile potansiyelize edilebileceği ve model oluştuktan sonra TLR4 antagonisti pentoksifilin ile de tedavi edilebileceği hipotezi test edilecektir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

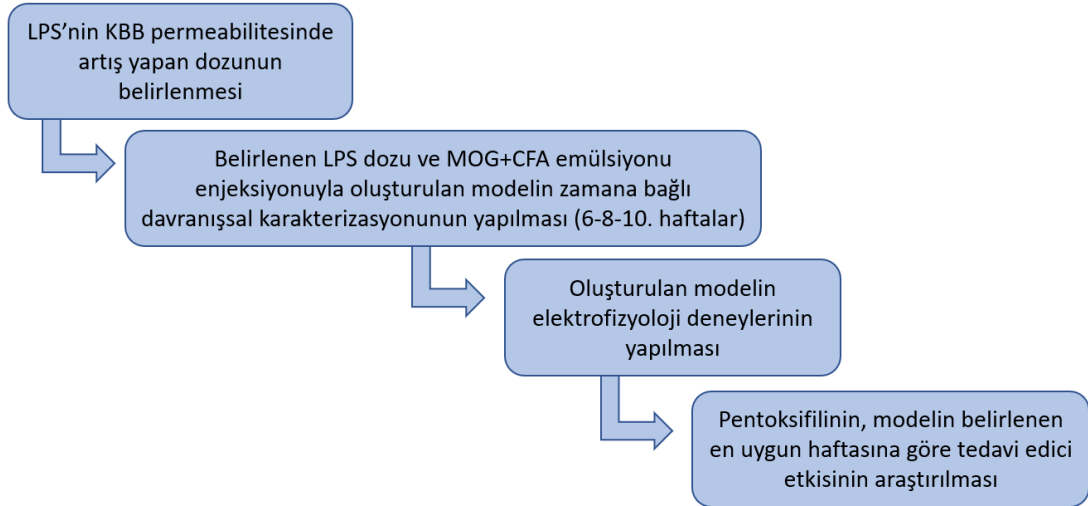
3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde 220-280 gram aralığında vücut ağırlığına sahip 8-10 haftalık dişi Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı (Ankara, Türkiye) Anonim Şirketi'nden satın alma yolu ile temin edildi. Sıçanlar tüm deney süresince Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Hayvan Laboratuvarı'nda barındırıldı. Hayvan Laboratuvarı, 21 ± 1 °C ve %45-60 nem ayarlarında tutuldu. Barınağın ışık ayarları 12 saat gece 12 saat gündüz şeklindedir ve ışıklar sabah 07:00'de açılmaktadır. Sıçanların deney süresince yem ve suya erişimleri *ad libitum* olarak sağlandı. Sıçanların aklimatizasyon süreci için deney başlangıcından iki hafta öncesinde temini sağlandı. Sıçanlar deney süresince kafeslerde 4 sıçan olacak şekilde barındırıldı.

Bu tez çalışmasında yapılacak deneyler için Hacettepe Üniversitesi – Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2023/06-04 karar numarası ve NESA Deney Hayvanları Laboratuvarı – Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2023/012 karar numarası ile etik kurul onayı alındı. Çalışmanın tüm raporlanma sürecinde *ARRIVE guidelines* (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) rehberlerinin önerilerine uyuldu.

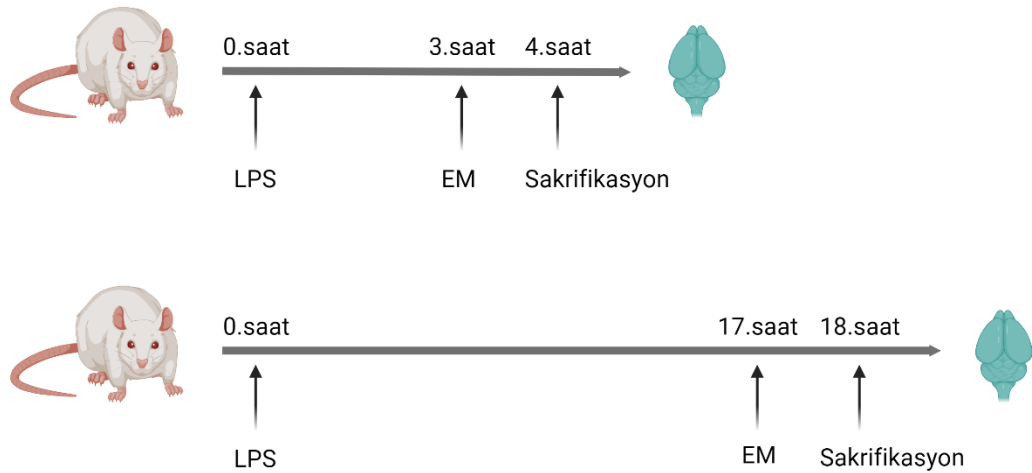
3.2. Deney Protokolü ve Grupları

Çalışmamız deneyleri LPS dozunun belirlenmesi, modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu, modelin elektrofizyolojik karakterizasyonu ve pentoksifilin etkisi şeklinde 4 ayrı bölümde yapıldı. 4 aşamada yapılan deneylerin genel akış şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



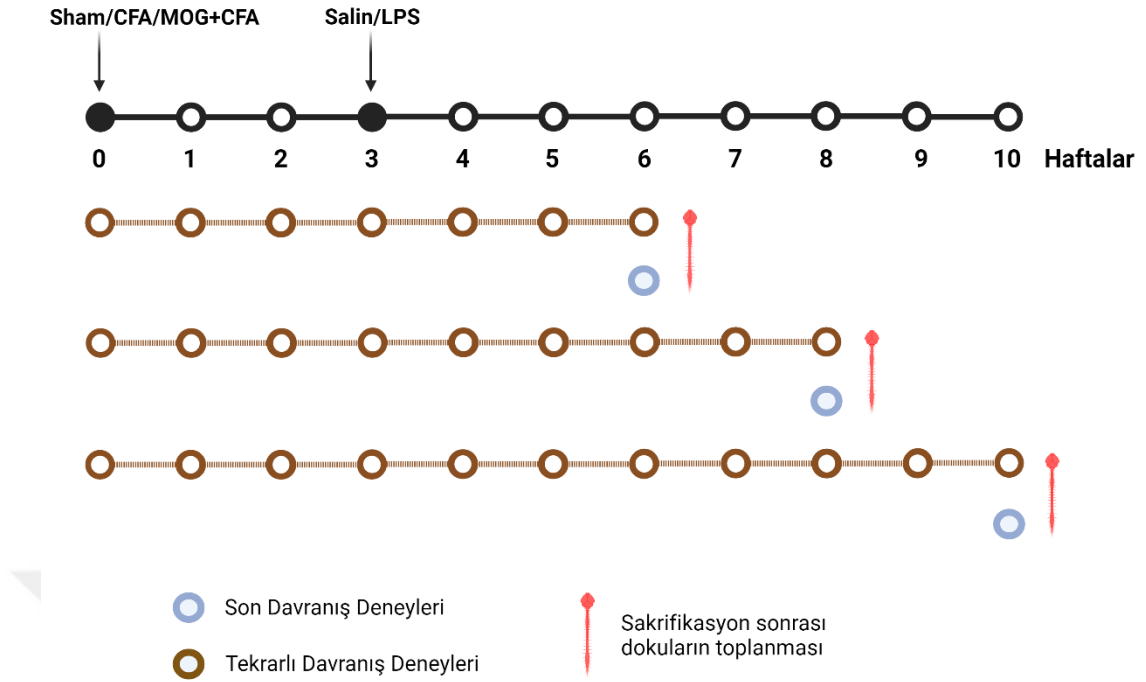
Şekil 3.1. Çalışmanın genel akış şeması. (LPS: lipopolisakkarit; KBB: kan beyin bariyeri; MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı)

İlk olarak oluşturulacak modelde kullanılacak LPS dozu belirlenmeye çalışıldı. LPS dozunun belirlenmesi deneyleri için KBB permeabilitesi değerlendirildi. Bu değerlendirme için LPS'nin 1 mg/kg, 4 mg/kg ve 10 mg/kg dozunun denenmesi planlandı. Fakat 4 mg/kg denemesinde başarıya ulaşıldığı için 10 mg dozundaki denemeler kullanılan deney hayvanı sayısının azaltılması ilkesi gereğince yapılmadı. Kullandığımız LPS çeşidi ve Wistar albino sıçan türü için KBB'nin açılması durumunda hangi saatte olacağı bilinmediğinden 4 ve 18. saatler incelendi. Bu deneylere ait deney protokolü Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Sıçanlar 5 ayrı gruba rastgele dağıtılarak deneye dahil edildi. Tüm deney grupları Tablo 3.1'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Protokolün 0.saatinde KBB'ye etkisi araştırılacak uygulama (salin veya LPS) yapıldı. LPS olarak gösterilen kısımda 4.saatte sakrifiye edilecek bir gruba LPS yerine salin enjeksiyonu yapılarak kontrol grubu oluşturuldu. Sakrifikasyondan bir saat önce sıçanlara anestezi uygulandı ve EM enjeksiyonu yapıldı. EM ile bir saatlik muamele sonrası sıçanlar sakrifiye edilip ilgili dokuları toplandı.



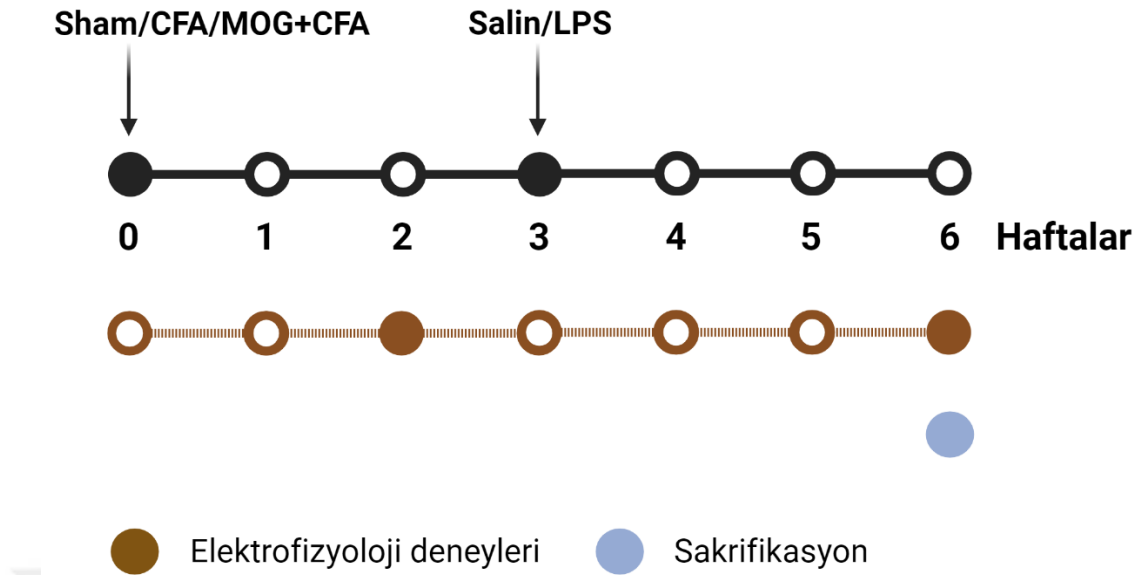
Şekil 3.2. Evans mavisi ile KBB permeabilite değerlendirmesi deney protokolü.
(LPS: lipopolisakkarit; EM: evans mavisi)

Belirlenen LPS dozu model oluşturulması ve karakterizasyonu deneylerinde kullanıldı. Model oluşturulurken 0.günde (0.haftada) MOG ve CFA ile oluşturulan emülsiyon sıçanlara uygulandı. Ardından 3.haftada LPS uygulaması yapıldı. Tüm deney grupları (Tablo 3.1) zamana bağlı olarak 6., 8. ve 10. haftada değerlendirildi. Bu haftalarda deneyleri sonlanan sıçanların dokuları toplandı. Sıçanlara model oluşturulmadan hemen önce ve haftalık olarak tekrarlı davranış deneyleri uygulandı. Bir sıçan için tek defa yapılan davranış deneyleri son davranış deneyleri olarak adlandırıldı ve protokole göre 6., 8. veya 10. haftada yapılarak sıçanların sakrifikasyonu gerçekleştirildi. İlgili deney protokolü Şekil 3.3'te yer almaktadır.



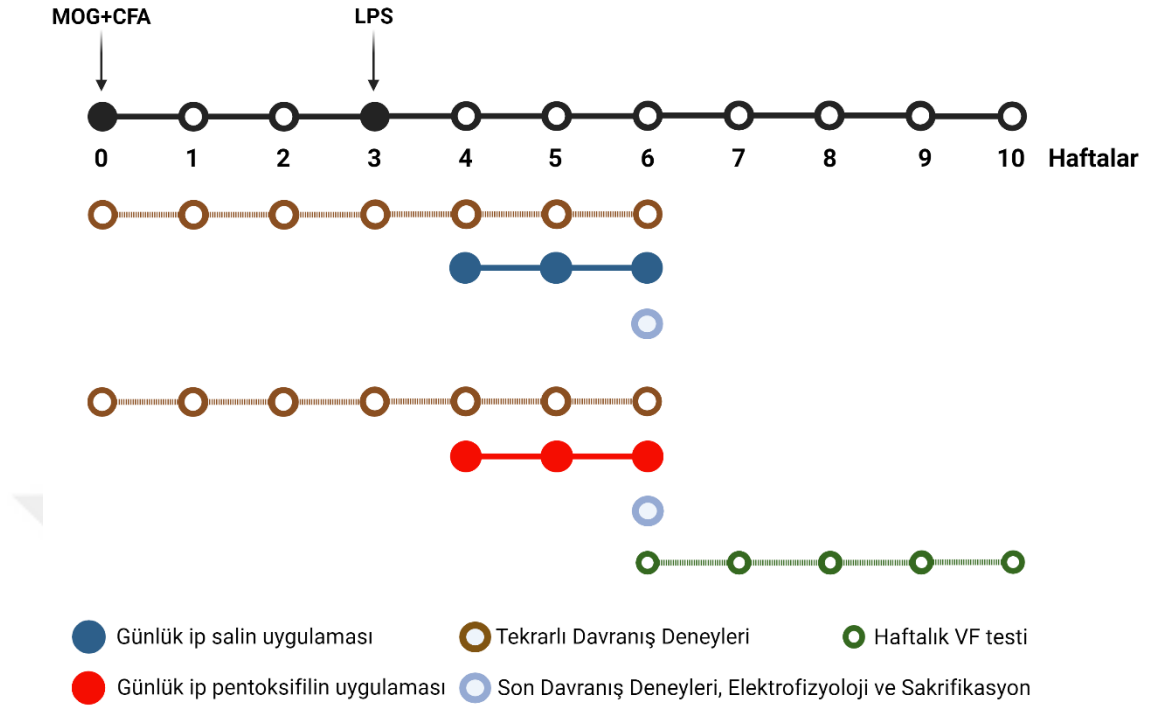
Şekil 3.3. Modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu deney protokolü. (Sham: sıçanların immünizasyon için uygulanan tüm anestezi ve enjeksiyonlarının etkin maddeler olmadan uygulandığı kontrol grubu; CFA: Freund'un tam adjuvanı; MOG: miyelin oligodendrosit glikoproteini; LPS: lipopolisakkarit)

Belirlenen LPS dozu ile model oluşturulup davranışsal karakterizasyon yapıldıktan sonra aynı modelde periferik sinir elektrofizyolojisi deneyleri ile tutulumun zamansal karakterizasyonu yapıldı. Bu deneyler için oluşturulan deney grupları Tablo 3.1'de, düzenlenen deney protokolü de Şekil 3.4'te bulunmaktadır. Elektrofizyoloji deneylerinde zamansal karakterizasyon yapılması planlanan haftalar modelin davranışsal karakterizasyonu sonrası kararlaştırıldı. Bilinen rutin modelde ve LPS eklenmesi ile gelişen değişimin incelenmesi amaçlandı. Sıçanlara 2. ve 6. haftalarda geri dönüşlü anestezi uygulandı ve deneyler anestezi altında yapıldı. 6.hafta sonrası sıçanlar sakrifiye edildi.



Şekil 3.4. Modelin elektrofizyolojik karakterizasyonu deney protokolü. (Sham: sıçanların immünizasyon için uygulanan tüm anestezi ve enjeksiyonlarının etkin maddeler olmadan uygulandığı kontrol grubu; CFA: Freund'un tam adjuvanı; MOG: miyelin oligodendrosit glikoproteini; LPS: lipopolisakkarit)

Modelin oluşturulup davranışsal ve elektrofizyolojik karakterizasyonu yapıldıktan sonra tedavi denemesine geçildi. Pentoksifilin, belirlenen zaman diliminde günlük olarak uygulandı. Pentoksifilinin akut ve kronik etkileri araştırıldı. Pentoksifilin deneylerinin protokolü Şekil 3.5'te, deney grupları da Tablo 3.1'de paylaşılmıştır. Pentoksifilin uygulaması deneyin 4.haftasında başlatıldı. İlk uygulama gününde von frey (VF) testi ile allodini üzerine akut etkisi incelendi. Akut testler yapılırken pentoksifilinin iki dozu ayrı günlerde denendi. Pentoksifilin enjeksiyonu yapılan gruba kontrol grubu olması açısından sadece salin enjeksiyonu yapılan deney grubu oluşturuldu. Bu deney grubu 6. haftada sonlandırıldı ve sakrifikasyon yapıldı. Pentoksifilin uygulanan grubun 6. haftada son davranış deneyleri ve elektrofizyoloji deneyleri tamamlandıktan sonra yarısı pentoksifilin tedavisi uygulanmadan haftalık VF testi değerlendirmesi ile takip edilmeye devam edildi. 10.hafta sonrası bu sıçanlar da sakrifiye edildi.



Şekil 3.5. Pentoksifilin etkisi deney protokolü. (MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı; LPS: lipopolisakkarit; ip: intraperitoneal; VF: Von Frey testi)

Tablo 3.1. Deney grupları

KBB Permeabilite değ�erlendirmesi ile LPS dozunun belirlenmesi						
Grup no	Salin	1 mg/kg	4 mg/kg	4.saat	18.saat	
1	+			+		
2		+		+		
3			+	+		
4		+			+	
5			+		+	
Modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu						
Grup ismi	CFA	MOG	LPS	6.hafta	8.hafta	10.hafta
Sham				+	+	+
CFA	+			+	+	+

MOG+CFA	+	+		+	+	+
Sham+LPS			+	+	+	+
CFA+LPS	+		+	+	+	+
MOG+CFA+LPS	+	+	+	+	+	+
Modelin elektrofizyolojik karakterizasyonu						
Grup ismi	CFA	MOG	2.hafta	LPS	6.hafta	
Sham			+		+	
CFA	+		+		+	
MOG+CFA	+	+	+		+	
Sham+LPS			+	+	+	
CFA+LPS	+		+	+	+	
MOG+CFA+LPS	+	+	+	+	+	
Pentoksifilin etkisi						
Grup ismi	MOG+CFA+LPS			Pentoksifilin		
MOG+CFA+LPS	+					
MOG+CFA+LPS+Pentoksifilin	+			+		

LPS: lipopolisakkarit; CFA: Freund'un tam adjuvanı; MOG: miyelin oligodendrosit glikoproteini; LPS ve pentoksifilin uygulamalarının yapılmadığı durumlarda salin enjeksiyonu yapılmıştır.

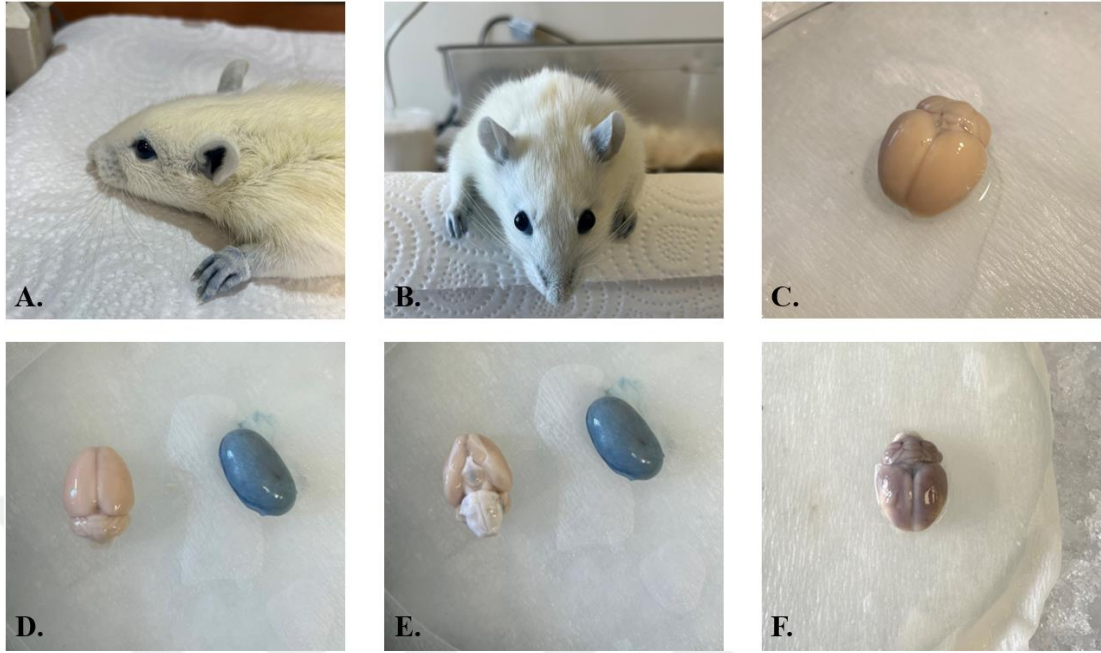
3.3. Kan Beyin Bariyeri Permeabilite Değerlendirmesi

Sıçanların KBB permeabilitesi, Evans mavisinin (EM) santral sinir sistemi dokularına ekstravaze olan miktarının floresans özelliği dolayısıyla spektrofotometrik ölçülmesi ile değerlendirildi. Moleküler ağırlığı 180 Da'dan yüksek olan boyaların KBB'yi geçemediği bilinmektedir. Evans mavisini ise 961 Da moleküler ağırlığıyla bu işlem için oldukça sık kullanılan önemli bir inert boyadır. Ek olarak, iv olarak verilen EM, albumin ile güçlü ve geri dönüşlü olarak bağlanıp yüksek moleküler ağırlıklı (68,5 kDa) bir kompleks oluşturur. Beyin dokularına sızan bu kompleksin dokulardan ekstrakte edilip ölçülmesi ile KBB permeabilitesi belirlendi (101).

EM solüsyonu %2 w/v olarak salin içerisinde hazırlandı. Uygulama öncesinde sıçanlara 1,4 g/kg üretilen dozu ile anestezi sağlandı. Anestezi oturduktan sonra lateral kuyruk veninden damar yolu erişimi sağlandı ve EM solüsyonu iv olarak 3 mL/kg

sıçan dozunda uygulandı. Bu erişimin sağlanamaması durumunda sıçanların alt karın bölgesine oblik bir kesi atılıp, deri ve yağ doku geçilerek inguinal ligamana ulaşıldı. Sağ elini kullanan araştırmacılar için sol femoral vene erişimin daha kolay olduğu belirtildiğinden ilk sol femoral ven denendi, buradan da erişim sağlanamaz ise sağ femoral vene erişim sağlanmaya çalışıldı. Bu girişimlerden sonra bölgeye steril gazlı bez ile tampon yapıldı ve cerrahi kapama işlemi kanama durduğunda yapıldı. Enjeksiyon sonrası yaklaşık 5 ila 10 saniye içerisinde sıçanın kulaklarının, gözlerinin ve patilerinin maviye dönmesiyle işlemde emin olunmuştur (Şekil 3.6). EM uygulaması sonrası sıçanlar bir saat süreyle EM'ye maruz bırakıldı. Bu süreçte rektal termometre ile geri dönüşlü olarak çalışan homeotermik battaniye (Harvard Apparatus, ABD) yardımıyla sıçanların vücut ısıları 37 °C'de tutuldu. Bir saat sonunda sıçanların anestezisi kontrol edildi ve toraks bölgeleri açılıp salin ile transkardiyel perfüzyon yapıldı. Perfüzyon için 300 mL salin kullanıldı. Sonrasında sıçanların beyin dokuları toplandı ve beyinler, serebellum, hipokampus, orta beyin ve korteks olacak şekilde diseke edildi. Diseksiyon işleminde ilk olarak serebellum tek parça olarak ayrıldı, ardından korteksial alan iki hemisfere ayrıldı, hemisferlerden de orta beyinler kesildi. Hipokampus izole edildikten sonra kalan parçalar serebral korteks olarak işleme alındı. İşlem sonrası hızlıca yağ doku ağırlıkları tartıldı ve 1 g doku başına 1 mL'lik %50 (w/v) olarak hazırlanmış trikloroasetik asit (TCA) ile muamele edildi. TCA eklenen dokulardan hipokampus 2 dk, diğer beyin dokuları ise 3 dk olacak şekilde ultrasonik homojenizatör (Sonoplus mini 20, Bandelin, Almanya) ile homojenize edildi. Dokular içerisinde bulundukları tüpler ile 10000 g'de 20 dk süre ile santrifüj (Sigma 3K30 Centrifuge, SciQuip, Shrewsbury, İngiltere) edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar -80 °C'de analiz süresine kadar saklandı.

Spektroskopik ölçümler için 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 750 ng/mL, 1000 ng/mL, 2500 ng/mL, 5000 ng/mL, 7500 ng/mL, 10000 ng/mL konsantrasyonlarında EM solüsyonları hazırlandı. Örneklerden 50 µL alınarak plaka kuyucuğuna yerleştirildi, pipet ucuyla al ver yapılarak ve mekanik olarak karıştırma yapılarak 150 µL ethanol ile homojen olarak karıştırıldı. Plakadan 620 nm'de spektrofotometre (Multiskan GO, Thermo Fischer Scientific, ABD) ile absorbans ölçümü yapıldı ve standartlara göre oluşturulan matematiksel model ile örneklerin EM konsantrasyonları belirlendi.



Şekil 3.6. KBB permeabilite deneylerine ait sıçan ve doku fotoğrafları. A-B. Sıçana evans mavisi uygulandıktan sonraki görünüm. **C.** KBB'si intakt sıçan beyni. **D-E.** KBB'si intakt sıçan beyninin sırasıyla dorsal ve ventral görüntüsünün aynı sıçan testisi ile kıyas edilebilir görüntüleri. **F.** KBB'si tamamen hasarlanmış sıçan beynine ait görüntü.

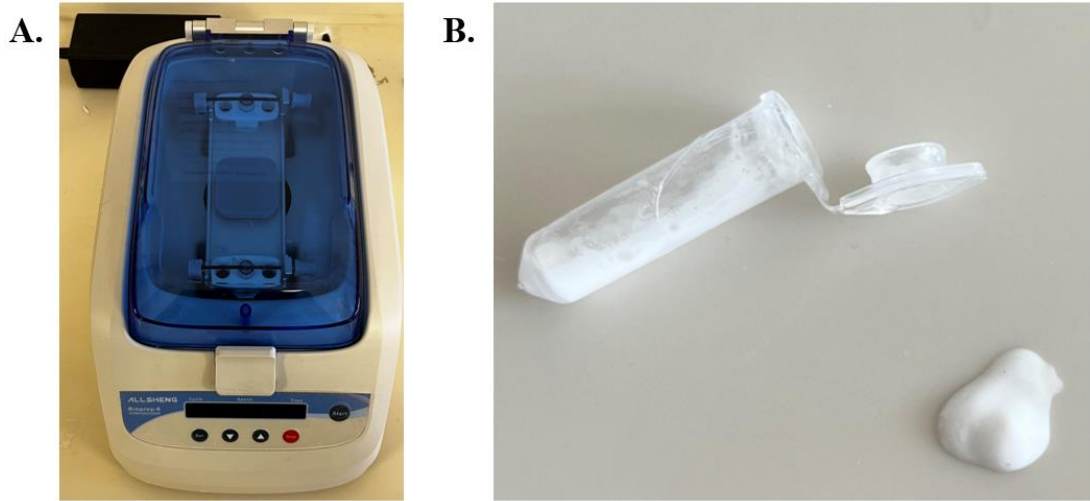
3.4. LPS Uygulaması

Çalışmamızda kullanılan LPS çeşidi O55:B5 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Almanya) suşudur. LPS dozlarının mortalite veya şiddetli septik klinik oluşturmada KBB etkisinin araştırılması için belirlenen dozlarının kararı Anabilim Dalı'mızın daha önceki tecrübelerine göre verildi (102). Hangi saatlerde bakılması kararı ise Kikuchi ve diğ. (15)'nin çalışmasına göre planlandı. LPS'nin hazırlanmasında çözücü olarak salin kullanıldı. KBB permeabilitesi inceleme deneylerinde 1 mg/kg sıçan dozu kullanımında 0,25 mg/1 mL salin çözeltisi hazırlanırken; 4 mg/kg sıçan dozu kullanımında 1 mg/mL salin konsantrasyonunda hazırlama yapıldı. Sadece salin uygulanan sıçanlara ise 4 mL/kg sıçan hacminde

uygulama yapıldı. Tüm LPS ve salin uygulamaları ip olarak yapıldı. LPS çözeltileri her kullanılacağında taze olarak hazırlandı.

3.5. İmmünizasyon

Sıçanların immünizasyonu için MOG ile CFA'dan oluşan emülsiyonun kuyruk köküne subkütan enjeksiyonu uygulandı. Kullanılan antijen MOG₁₋₁₂₅ (Anaspec Inc. & Eurogentec US, CA, ABD) rekombinant sıçan antijenidir. 1 mL'de 1000 µg MOG içermektedir. Şirketin kullanım önerisine göre seyreltilmesi için pH'ı 4 üzerinde olan solüsyon kullanılmamalıdır. Bu öneriye binaen seyreltme için pH'ı 3,75'e ayarlanmış asetik asit solüsyonu hazırlandı. Solüsyonun hazırlanmasında glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. 20 µg MOG antijeni stoktan alınarak 1'e 5 olarak seyreltildi ve 100 µL çözeltilisi elde edildi. Emülsiyon için eşit hacimde Freund'un tam adjuvanı (CFA) hazırlandı. CFA (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Almanya) kalın uçlu enjektöre, şişesi tam karıştırılarak çekildi ve 100 µL hacimde eklendi. Ardından oluşan karışımın emülsiyon haline gelmesi için homojenizatör (Bioprep-6, Allsheng, Hangzhou, Çin) kullanıldı. Kullanılan homojenizatör ve elde edilen emülsiyon formu Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Homojenizatörde 4000 rpm (*rate per minute* – dakikadaki dönüş hızı)'de, aralarda 30 sn bekleme süresi olan 1 dakikalık 20 siklus uygulandı ve bilye kullanılmadı. 20 siklus uygulaması, antijenin aşırı ısınmasını ve bu sebeple yapısal değişiklik olmasını önlemek için ikiye bölündü ve 10. siklus sonrası 5 dakika buz üzerine alınarak ara verildi. Homojenizasyon sonrası en az iki saat emülsiyon yapısını koruyabilen emülsiyonlar kullanıldı. Bir sıçan için 20 µg MOG dozu belirlendiğinden ve her enjeksiyonda 4 sıçana aynı gün uygulama yapılması şeklinde planlama yapıldığından, kayıplar da düşünülerek yukarıdaki hacimlerin 4,5 katı immünizasyon emülsiyonu hazırlandı.



Şekil 3.7. Emülsiyon oluşturmada kullanılan homojenizatör ve elde edilen emülsiyon formu. A. Homojenizatör. B. Emülsiyon formu

Sıçanlara emülsiyon enjeksiyonu yapılırken ağırlı olması ve kuyruk köküne bir süre bası gerektirmesi dolayısıyla gaz anestezi ile sıçanlar anestezi altındayken işlem yapıldı (Şekil 3.8). Gaz anestezi olarak sevofluran (Sevorane, AbbVie Inc. North Chicago, Illinois, ABD) seçildi ve kendi özel gaz vaporizatörü kullanıldı. Sıçan ilk olarak kapalı bir cam fanusa alındı ve kapak kapalı durumda 2 L/dk O₂ eşliğinde %6'lık sevofluran ile indüksiyon yapıldı. Sıçan, anesteziye girmesiyle beraber fanustan alındı ve maske ile solutmaya geçildi. 2 L/dk O₂ eşliğinde %3'lük sevofluran ile idamesi sağlandı. İşlem süresi indüksiyon için yaklaşık 1 dk, idame ve enjeksiyon için 2 dk ve işlem sonrası ayılmaya kadar geçen süre için 2 dk şeklinde toplam 5 dakikadır.



Şekil 3.8. İnhaler anestezi sistemi.

3.6. Vücut Ağırlığı Ölçümü

Deneyde yer alan tüm sıçanların haftalık olarak vücut ağırlıkları ölçüldü ve gram olarak kayıt edildi. Haftalık ölçümler o hafta ki ilk uygulama olarak yapıldı. KBB permeabilite testinde yer alan sıçanların deney öncesi ve sakrifikasyon öncesi vücut ağırlıkları kayıt edildi. Ek olarak, deney protokolüne göre 0. ve 3. haftada (MOG ve LPS enjeksiyonları zamanında) sıçanların vücut ağırlıkları enjeksiyon hemen öncesi ve 3 gün boyunca her gün şeklinde takip edildi.

3.7. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) Skoru

Çalışmamız boyunca sıçanların klinik durumunun değerlendirmesi DOE (deneysel otoimmün enfalomyelit) skoru ile yapıldı. Sıçanlar deney süresince her gün skorlandı. Kullandığımız DOE skoru, çeşitli yazarlarca daha önceden fazlaca kullanılan skorlamaların birlikte kullanılmış halidir (103, 104). Çeşitli klinik gözlemler için kullanılan skor puanları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. DOE skorlamasına ait klinik özellikler

Skor	Klinik özellik
0,0	Normal motor özellikler
0,5	Kuyrukta hafif düşüklük; Kuyruğun uç veya orta kısmındaki doğal gerginliğin kaybolması
1,0	Komple kuyruk düşüklüğü
2,0	Komple kuyruk düşüklüğü ve arka patilerde zayıflık/kuvvet kaybı; Hafif paraparezi veya ataksi
3,0	Komple kuyruk düşüklüğü ve arka tek patide paralizi
4,0	Komple kuyruk düşüklüğü ve komple arka pati paralizisi
5,0	Komple arka pati paralizisi ve parsiyel ön pati paralizisi; Komple arka pati paralizisi ve üriner inkontinans
6,0	Ölüm

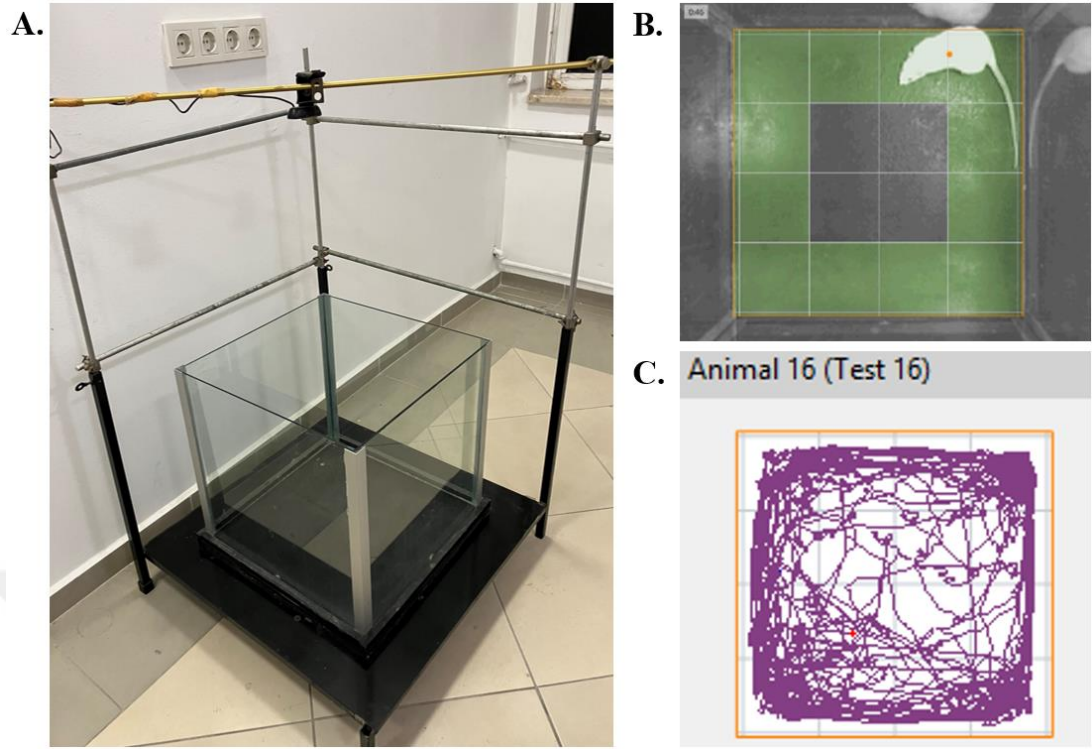
3.8. Davranış Deneyleri

Çalışmamızda tekrarlayan ve tek sefere mahsus olacak şekilde yapılan çeşitli davranış deneyleri kullanıldı. Bu davranış deneylerinden açık alan arena testi, Von Frey filamanı testi, tutma (agresyon) testi ve Rotarod testi protokol başlangıcında ve her hafta olacak şekilde yapıldı. Bu deneyler “tekrarlı davranış deneyleri” olarak adlandırılmıştır. Yükseltilmiş artı labirent testi, Porsolt zorunlu yüzme testi ve edilgen kaçınma testi protokole göre deneylerin sonlanacağı hafta ve tek defaya mahsus olmak üzere yapıldı. Bu deneyler ise “son davranış deneyleri” olarak adlandırılmıştır. Sıçanların davranış deneyleri, sıçanlar barınaktan davranış laboratuvarına getirildikten

45 dk sonra başlatıldı. Bu süre sıçanların alışması için tanınmıştır. Tekrarlı davranış deneylerinin sıralaması tutma testi, açık alan arena testi, Von Frey filamanı testi ve rotarod testi şeklindedir. Son davranış deneylerinin sıralaması ise en az stresli testten en çok stresli olana şeklindedir: yükseltilmiş artı labirent testi, edilgen kaçınma testi ve Porsolt zorunlu yüzme testi. Ek olarak sıçanların son haftasına denk gelen tekrarlı davranış deneyleri o haftanın 0. gününde yapılırken son davranış deneyleri kendi protokolleri de göz önüne alındığında son haftanın 1., 2. ve 3. gününe denk gelmektedir. Sakrifikasyon işlemi son davranış deneyleri tamamlandıktan sonra gerçekleştirildi. Tüm davranış deneyleri video kayıt sistemleri ile kayıt altına alındı ve bu görüntüler bazı testler için (açık alan arena testi, yükseltilmiş artı labirent testi, Porsolt zorunlu yüzme testi ve edilgen kaçınma testi) görüntü işleme programı ANY-maze (Stoelting Europe, Dublin, İrlanda) ile değerlendirildi. Diğer testlerin sonuçları ise ya deney sırasında ya da kayıtlı görüntülerden hesaplandı.

3.8.1. Açık alan arena testi

Bu test ile sıçanların lokomotor durumları ve nadiren anksiyete ilişkili davranışları değerlendirilmektedir (105). Fakat çalışmamızda tekrarlı ölçümleri sadece lokomasyon ve eksplorasyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Tüm sıçanlara immünizasyon enjeksiyonu öncesi ve haftalık olarak uygulanmış olup tekrarlı davranış deneylerindendir. Test için bir kenarı 45 cm olan kare camlardan oluşmuş üstü açık altı ise siyah zeminle kaplı bir küp yapısı kullanıldı (Şekil 3.9). Platforma hep aynı tarafa yüzü dönük olacak şekilde bırakılan sıçan siyah zemin üzerinde 60 dakika süre ile video takip sistemi ile kayıt altına alındı. Test içerisindeki sıçanın bu süre zarfında toplam almış olduğu yol, ortalama hız verisi, maksimum hız verisi, yaptığı rotasyon sayısı, alttaki kare platforma göre alanın merkezinde ve periferinde geçirmiş olduğu süreler değerlendirildi. Alt karenin %24'lük kısmı merkez, geri kalanı ise perifer olarak incelendi.

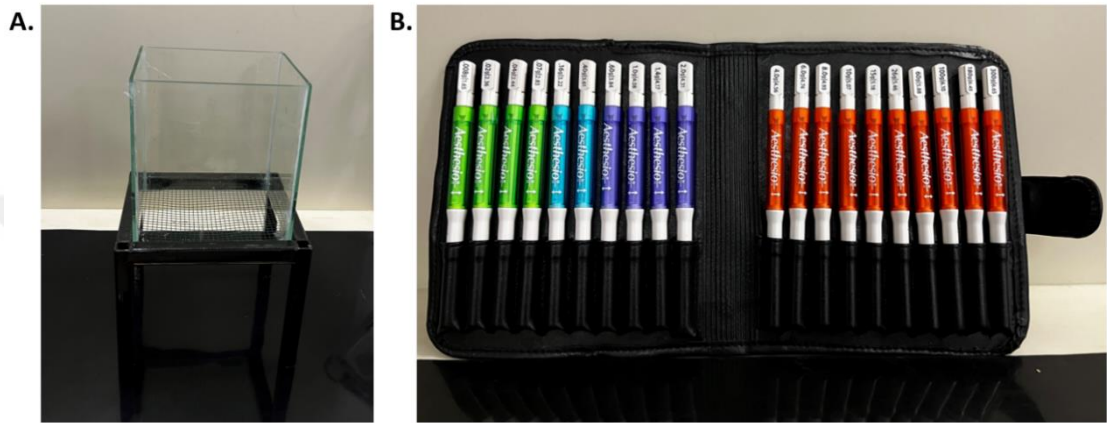


Şekil 3.9. Açık alan arena testi. A. Test platformu. **B.** Test esnasında görüntü işleme programından alınan takip ekranı. **C.** Rastgele bir sıçanın test bitiminde, programdan elde edilen test esnasındaki merkez noktasının tüm hareketinin çizgisel hali.

3.8.2. Von Frey Filamanı Testi

Sıçanların ağrı benzeri davranışlarını değerlendirmek amacıyla mekanik allodini testi olarak kullanılmıştır (106). Tüm sıçanlara immünizasyon enjeksiyonu öncesi ve haftalık olarak uygulandı. Tekrarlı davranış deneylerindendir. Test aparatı, yerden 20 cm yükseklikte ayakları olan, bu yükseklikteki alt zemini 0,5 cm’lik kare delikli sert fileden oluşan ve üzerinde yüksekliği, eni ve boyu sırasıyla 22 cm; 15,5 cm ve 19,5 cm olan üstü açık cam kısımdan oluşmaktadır (Şekil 3.10A). Sıçanlar test aparatına alındıktan sonra 8 dakika alışmaya bırakıldı. Ardından sıçanların arka patilerini çeşitli filamanlara (Aesthesio®, DanMic Global, LLC, ABD) göre çekme durumları kayıt edildi (Şekil 3.10B). Sıçanların ilk olarak sağ arka patisi ve 2 dk ara sonrasında aynı protokolle sol arka patisi incelendi. Deneye 4 g’lık filaman ile başlanmış, sırayla artırılarak sıçanın patisini ilk çektiği filamandan sonra “artırma-ve-düşürme (*up-and-down*)” metoduna göre 4 filaman daha uygulanmış ve test

sonlandırılmıştır. Fakat eşiğin çok düştüğü deney protokolünün son haftalarında 2; 1,4 ve 1 g'lık filamanlar da kullanıldı. Sıçanların mekanik allodini durumlarının değerlendirmesi % 50 geri çekme eşik değerleri olarak “*up-and-down*” metodu ile açık erişimli https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/ web sitesi üzerinden hesaplandı (107).



Şekil 3.10. Von Frey Filamanı testi. A. Von Frey testi için yapılan aparat. **B.** Taktıl duyu değerlendiricisi filamanlar.

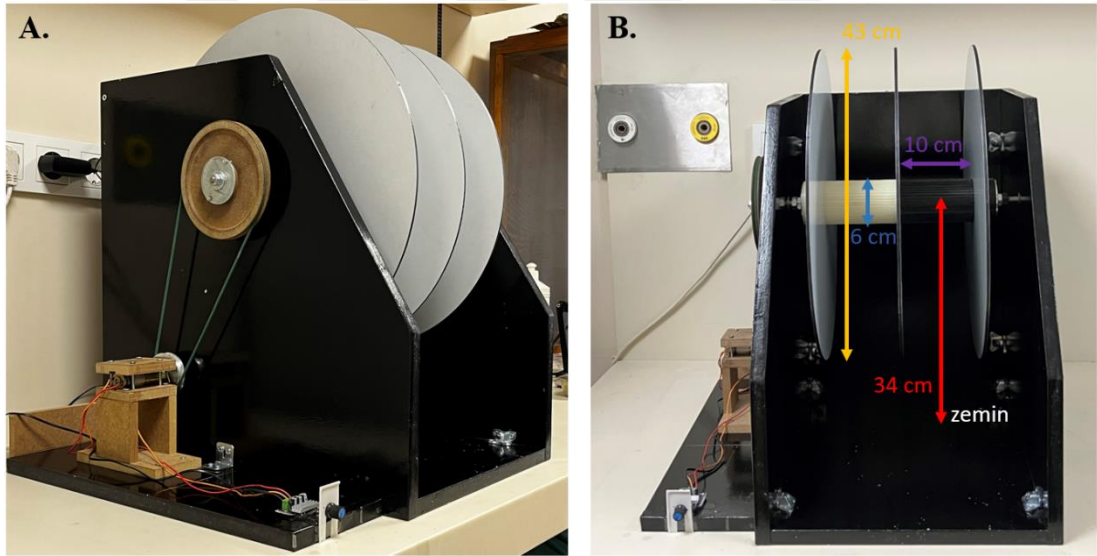
3.8.3. Tutma Testi

Sıçanların agresyon benzeri davranışlarını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (108). Haftalık olarak uygulanan tekrarlı davranış deneylerindendir. Sıçanların eldiven ile tutmaya karşı verdiği yanıtlar skorlandı. Skorlama şu şekildedir (109): 0 – sıçan tutmaya izin verir ve kaçmak için herhangi bir çabası olmaz; 1 – tutmaya izin verir fakat kaçmaya çalışır; 2 – elden uzağa kaçar ve yakalanmaktan kurtulmaya çalışır; 3 – ellenmekten aktif olarak kaçar ve tutulduğu zaman çığlık atar, ağzını açar veya ısırır; 4 – ellenmeye izin vermez ve yüksek sesle çığlıklar atarak ele saldırır.

3.8.4. Rotarod Testi

Sıçanların motor koordinasyon ve denge durumu değişimlerini değerlendirmek için kullanılmıştır (110). Çalışmamızda kaba motor disfonksiyonun

değerlendirilmesini sağlamıştır. Tüm sıçanlara immünizasyon enjeksiyonu öncesi ve haftalık olarak uygulandı. Tekrarlı davranış deneyleri arasındadır fakat alıştırmaya gerektirdiğinden sıçanlar deneylere başlanmadan 2 veya 3 gün önce 5 seans alıştırmaya seansına maruz bırakıldı. Test sisteminde aynı anda iki sıçanın test edilebileceği iki şerit bulunmaktadır ve platformlardan düşme yüksekliği 34 cm'dir (bu mesafe ortadaki milin merkez noktasına zeminden ölçülen mesafedir). Şeritlerin enine genişliği 10 cm, şeritte dönen milin çapı ise 6 cm'dir. Şeritlerin iki kenarındaki daire plakaların çapı ise 43 cm'dir (Şekil 3.11). Haftalık deneylerin başlangıcında sıçanlar cihaza ilk yerleştirildiğinde döndürme yapılmadan 1 dakika boyunca habitüasyon yapıldı. 20 rpm hızında sabit hızda değerlendirme yapıldı. Her sıçan 5 dakika boyunca bu hızda izlendi. Düşen sıçanların düşme süreleri kayıt edildi. İlgili sürede düşmeyenler ise 300 saniye olarak kayıt edildi. Bu ölçüm 4 kez yapılmış ve ortalaması alınmıştır. 4 deneme süreci arasında 20 dakika bekleme süresi bırakıldı.

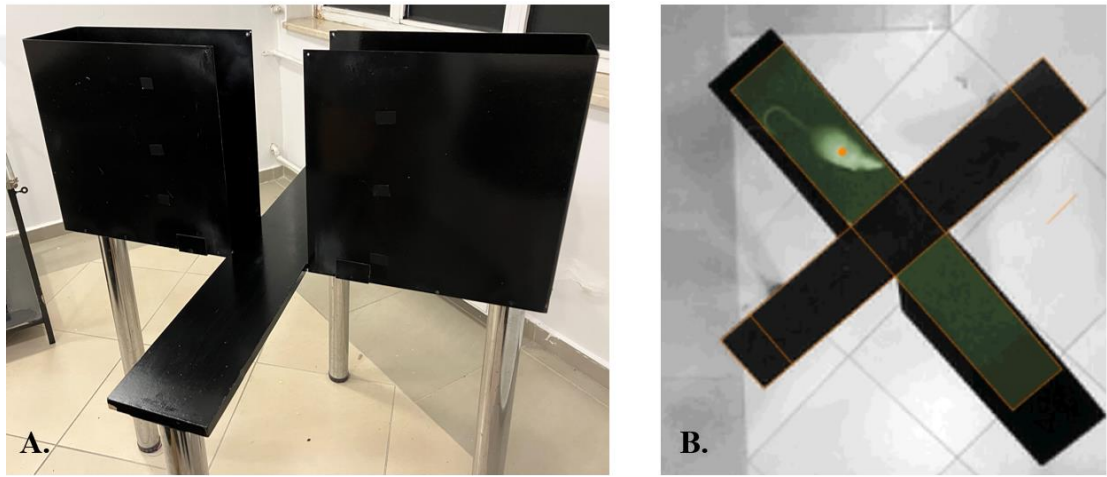


Şekil 3.11. Rotarod testi. A. Rotarod test sisteminin soldan görünüşü ve elektronik aksamı. B. Rotarod test sisteminin karşıdan görünüşü ve ölçüleri.

3.8.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Bu test ile sıçanların anksiyete ilişkili davranış durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır (111). Son davranış deneylerindendir ve tek defa deney sürecinin son

haftasında uygulandı. Test için kullanılan aparatın 4 kolu mevcuttur ve karşılıklı iki kolu açık, karşılıklı iki kolu kapalıdır. Dört kol artı şeklinde birbirlerine dik olarak yerleştirilmiş ve zemin ile duvarlar siyah olarak tasarlanmıştır. Kolların eni 15 cm, boyu 45 cm, kapalı kolların yukarı doğru duvar yüksekliği ise 40 cm'dir (Şekil 3.12). Aparatın zemini ayaklar aracılığıyla yerden bir metre yükseltilmiştir. Bu testte sıçanlar yüzü, açık kollardan herhangi birine dönük olarak aparata bırakıldı ve 5 dakika boyunca video takip sistemi ile izlendi. Sıçanın açık kollarda bulunma süresi, bu kollarda katettiği mesafe ve açık kollara geçme sayısı değişkenleri belirlendi.

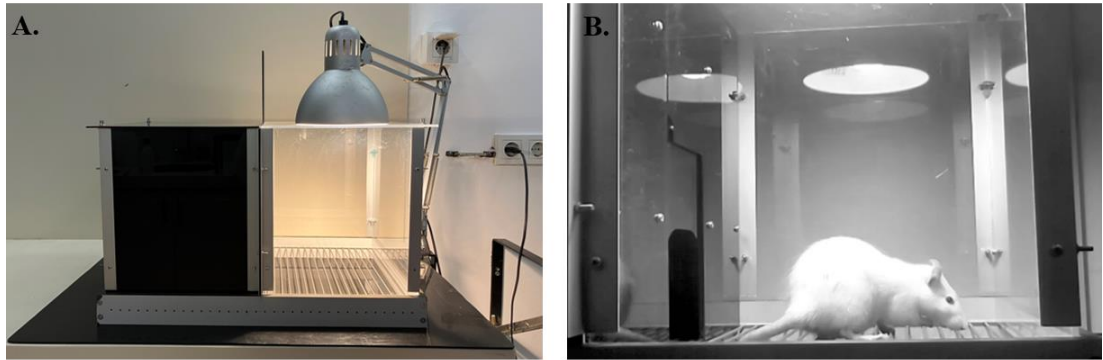


Şekil 3.12. Yükseltilmiş artı labirent testi. A. Test platformunun çaprazdan görüntüsü. B. Test esnasında görüntü işleme programından alınan takip ekranı.

3.8.6. Edilgen Kaçınma Testi

Bu test ile sıçanların öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır (112). Son davranış deneylerinin ikincisidir. Test için birbirlerine bir geçit (9 cm genişliğinde dikey sürgülü kapı ile kapanabilen) aracılığıyla açılan biri aydınlık (26x30 cm) diğeri de karanlık (26x30 cm) olmak üzere iki farklı kompartman içeren platform (52x30 cm) kullanıldı (Şekil 3.13A). Platformun tabanı 15 mm aralıklarla yerleştirilmiş paslanmaz çelik çubuklardan oluşmaktadır. Bu test üç aşamadan oluşmaktadır: İlk aşamada aydınlık kompartmana sıçan konulduktan sonra kompartmanlar arasındaki kapı açılarak sıçanın platformu serbestçe keşfetmesi

beklendi. Sıçan karanlık kompartmana geçer geçmez aradaki dikey sürgülü geçit kapatıldı, sıçanın karanlık kompartmana geçene kadar geçirdiği süre kaydedildi ve sıçan karanlık kompartmanda 30 sn tutularak kafesine geri alındı. İlk aşamadan 5 dakika sonra ikinci aşama yapıldı. İkinci aşamada, ilk aşamadan farklı olarak sıçan karanlık kompartmana geçtiğinde tabandaki çubuklar aracılığıyla 3 saniye boyunca, 50 Hz frekansında, 1 mA amplitüdünde, kare dalgalarından oluşan elektrik şoku verildi. Şokun ardından ikinci aşama sonlandırıldı, sıçan kafesine geri alındı. İkinci aşamadan 24 saat sonra ise hayvanın hafızasını test etmek için üçüncü aşama yapıldı. Bu aşamada aydınlık kompartmana bırakılan sıçanın video kaydı yapıldı ve karanlık kompartmana geçişine kadar geçen süre not edildi (Şekil 3.13B). Sıçan 300 saniye boyunca karanlık kompartmana geçmez ise test tamamlanıp sonuç 300 sn olarak kayıt edildi.

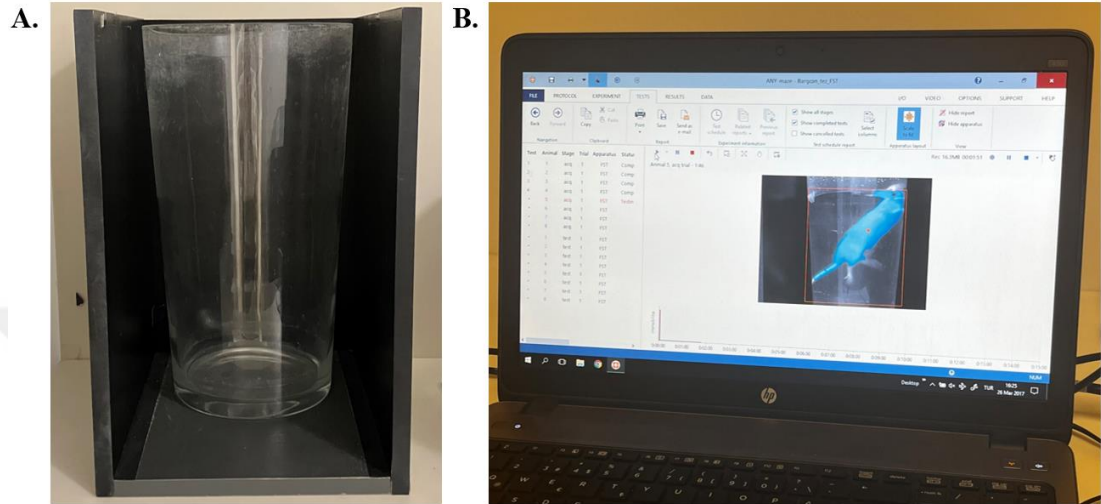


Şekil 3.13. Edilgen kaçınma testi. A. Test aparatı. **B.** Test sırasında kaydedilen video kaydından alınan görsel.

3.8.7. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi

Bu test ile sıçanların depresyon benzeri duygudurumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır (113). Son davranış deneylerinin sonuncusudur. Test için 10 cm yarıçapında, 60 cm yüksekliğinde ve içi 40 cm yüksekliğe kadar 21°C sıcaklıktaki su ile doldurulmuş üstü açık şeffaf cam silindir kullanıldı (Şekil 3.14). Bu test iki aşamadan oluşmaktadır: İlk aşamanın amacı sıçanların platformdan kaçamayacaklarını öğrenmeleridir. İlk aşamada 15 dk süre ile sıçan silindirde yüzdürüldü. Birinci aşamadan 24 saat sonra ikinci aşamaya geçildi ve sıçan 5 dakika

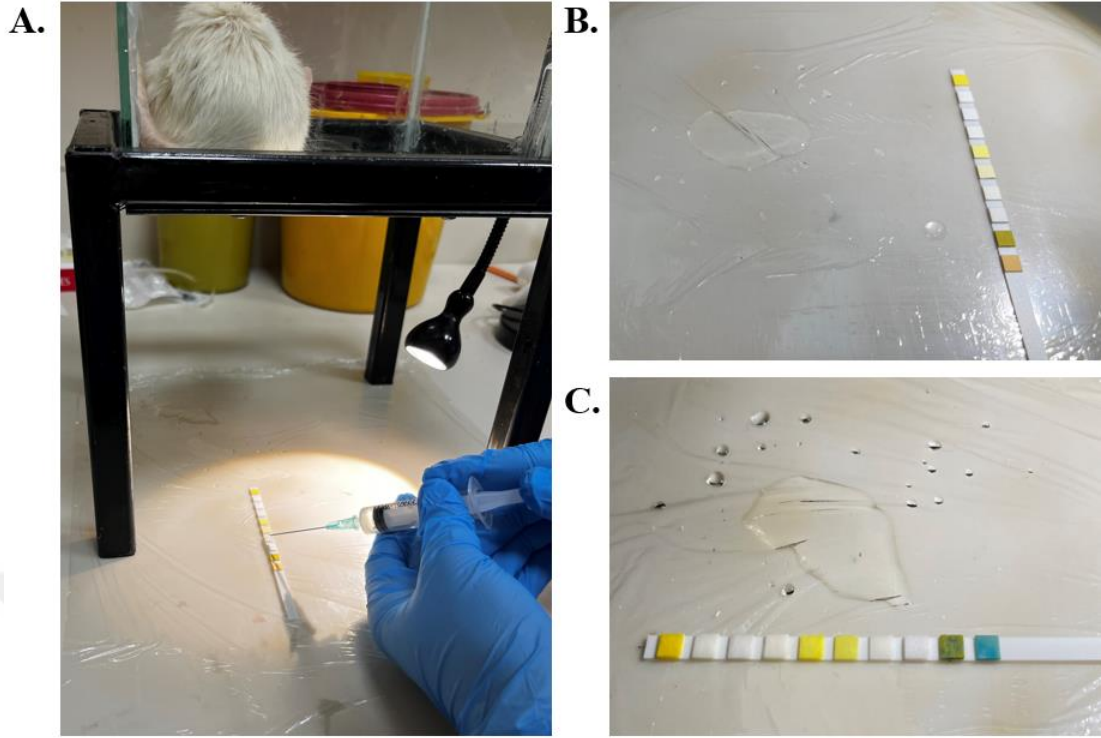
boyunca aynı aparatta yüzdürüldü. Test genel protokolde son haftanın 2. ve 3. gününe tekabül etmektedir. İkinci gün yapılan 5 dakikalık seans video kayıt sistemi ile kayıt edilip sıçanın immobil süresi görüntü işleme sistemiyle analiz edildi.



Şekil 3.14. Porsolt zorunlu yüzme testi. A. Siyah tahta aparat içerisinde cam havuz. **B.** Test sırasındaki kayıttan alınan görsel

3.9. Tam İdrar Tetkiki

Sıçanların genitoüriner sistem tutulumunun indirekt olarak ortaya konulması amacıyla tam idrar tetkiki analizi yapıldı. Bu analiz için idrar test çubukları kullanıldı (Mission® Expert urinalysis strips, Hangzhou, Çin). Testler haftalık olarak tekrar edildi ve haftada bir yapıldı. İdrar örneğinin alınabilmesi için sıçanlar alt zemini fileli ve yerden yükseltilmiş aparata konuldu. Bu aparat Von Frey testinde de kullanıldığından ilgili bölümde anlatılmıştır. Aparatın altında yer alan zemin steril naylon ile kaplandı. Aparata konulan sıçanın idrarını yapması beklendi ve non-invaziv olarak örnek toplandı. İdrar örneği oluşur oluşmaz idrar çubuğu ile test yapıldı. Örnek oluştuğu yerden steril enjektör ile alındı ve test çubuğuna uygulandı. Testin değerlendirme süreci için üretici firmanın önerileri takip edildi. Örnek alınma süreci ve idrar testi çubuğu Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.15. İdrar örneği alınma prosedürü ve tam idrar tetkiki. A. İdrar örneğinin oluşmasının hemen ardından steril enjektör ile alınıp test çubuğuna uygulama. **B.** Test çubuğunun idrar örneği uygulanmadan önceki görüntüsü. **C.** Test çubuğunun idrar örneği uygulandıktan sonraki görüntüsü.

3.10. Siklus Tayini

Çalışmamızda dişi sıçanlar kullanıldığı ve davranış deneyleri yapıldığı için sıçanların sıklardan etkilenebilecek davranış deneylerinin yapılmasından hemen sonra siklus tayini yapıldı. Siklus tayini ile sıçanların aynı sıklusa getirilmesi değil, rutin deney protokollerinden ayrılmadan deneye alındığı anda hangi sıklusta olduğunun belirlenmesi amaçlandı. Ek olarak davranış deneylerinin bitiminde sakrifikasyondan hemen önce tekrar siklus tayini yapılarak ek değerlendirme yapıldı. Bu bağlamda haftalık davranış deneylerinde bu belirleme yapılmamış olup sadece son davranış deneylerinde siklus tayini kullanılmıştır.

Siklus tayini için 150 μ L'lik steril salin mikropipet ile sıçanın vajinasına uygulandı. Aynı sıvı geri çekilerek lama yayma yapıldı. Vajinal lavaj yayması kuruduktan sonra siklus tayini yapmak üzere boyama yapıldı. Boyamada sırasıyla

fiksatif, eozin ve tiyazin uygulaması yapıldı. Bunun için Çabuk Boyama Seti (Diff Quick boya seti, Mediko Kimya, ADR grup, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Siklus değerlendirmesi yapılırken sıçanların proöstrus ile östrus evresi -östrus (Ö)- ve metöstrus ile diöstrus evresi ise -diöstrus (D)- olarak 2 grupta ele alındı (114, 115).

3.11. Modifiye DOE skoru

Çalışmamızda, rutinde kullanılan DOE skoruna ek olarak, parametreleri ve hesaplama sistemi tarafımızca belirlenmiş “Modifiye DOE skoru” kullanıldı. Rutinde kullanılan skorun üriner sistem tutulumunu ve belirgin (ileri seviye) olmayan motor tutulumu göstermekte yetersiz kalabildiği belirlendi. Ek olarak sıçanlar için ortaya konulan nörolojik skorlama sistemlerinde yer alan ekstansiyon ve fleksiyon özellikleri de rutin DOE skoruyla ortaya konamamaktadır. Fakat progresif süreçte bu özelliklerin belirgin rolü bulunduğundan değerlendirilmelerinin katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Li ve diğ. (116), sıçanlarda inme çalıştıkları makalelerinde nörolojik tutulumun şiddetini belirlemek için “modifiye nörolojik şiddet skoru” ölçeğini kullanmıştır. Bu değerlendirmeye göre sıçanlar, kuyruklarından kaldırıldıktan sonra arka ve ön patilerini ekstansiyon durumuna getirmektedir. Nörolojik tutulumun şiddeti arttıkça arka ve ön patilerin bu hareket sırasında ekstansiyon yerine fleksiyonda olabildiği belirtilmiştir.

Modifiye DOE skoruna ait klinik gözlemler ve ilgili skor puanları Tablo 3.3’te gösterilmiştir. Ek olarak toplam skorun hesaplaması da ayrıntısıyla paylaşılmıştır. DOE skorundan en fazla 12, açık alan arena testi parametrelerinden en fazla 2, TİT parametrelerinden en fazla 2 ve son olarak sıçan kaldırıldığında pati durumu testinden en fazla 2 puan alınabildiğinden en yüksek toplam skor 18, en düşük toplam skor ise 0’dır.

Tablo 3.3. Modifiye DOE skoru parametreleri

Klinik özellikler			Skor
DOE skoru			DOE skoru X 2
+			
Açık alan arena testi'ne göre	Maksimum hız paramatresi	<belirlenen değer	1
		>belirlenen değer	0
	Katedilen toplam mesafe	<belirlenen değer	1
		>belirlenen değer	0
TİT'e göre	Nitrit	(+) ise	1
		(-) ise	0
	Lökosit	(+) ise	1
		(-) ise	0
Sıçan kuyruğundan kaldırıldığında	Ön patiler	Fleksiyon	1
		Ekstansiyon	0
	Arka patiler	Fleksiyon	1
		Ekstansiyon	0
Toplam skor			Tüm sütunun toplamı

DOE: deneysel otoimmün ensefalomyelit; TİT: tam idrar tetkiki

3.12. Serum ve Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinin Toplanması

Deney protokolünün “model oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu” kısmında yer alan sıçanların sakrifikasyonu sırasında ilk olarak BOS ardından da kan örneği alındı. Bu örneklerin alımına geçmeden önce sıçanlar sakrifikasyon için 1,4 g/kg sıçan dozu ile üreten anestezisi altına alındı. Anestezinin oturduğundan emin olunduktan sonra BOS örneği alımı için sıçan cerrahi tablayla stereotaksik çerçeveye dorsumu üstte olacak şekilde sabitlendi. BOS örneğinde kan kontaminasyonu olmaması için Barthel ve diğ. (117)'nin sisterna magnadan mikrocerrahi ile örnek alma metodu kullanıldı. Sıçanın kafa arkası ve boyun derileri tıraş edildi. Sıçanın burnu aşağı bakacak şekilde çerçeveye sabitlendi. Bu sabitlemede burnun zemine yaklaşık 70-80 derece açıyla durması sağlandı. Ardından yukardan aşağı bir kesi atıldı ve etraf kaslar temizlendi. Oryantasyonun kaybedilmemesi için orta hatta kalındı. Küçük

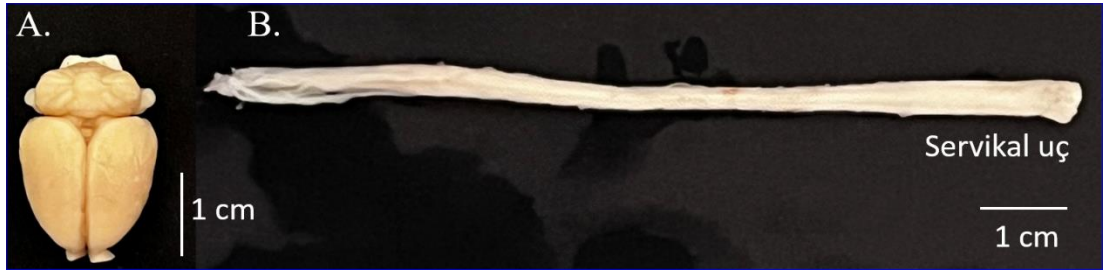
kanamaların tamamı kontrol altına alındı ve dura belirgin olarak görüldüğünde insülin enjektörü ucuna sarı uç (30G) takılarak sisterna magnaya erişim sağlandı. Yaklaşık 100 µL'lik örnek toplandı. Bu işlemten hemen sonra sıçan stereotaksik çerçeveden alındı, dorsumu üzerine yatırıldı. Kan alımı için abdominal cerrahi ile karın açıldı, bölgeye ulaşıldı ve inferior vena kavadan (sol renal ven ile sol iliolumbar ven arasındaki alan) yaklaşık 5 mL kan alındı. BOS örneği steril bir tüpe, kan örneği ise sarı tüpe alındı, örnekler oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi (Eppendorf® Centrifuge 5804, Hamburg, Almanya). Süpernatantları toplanan örnekler -80 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.13. Doku Toplanması ve Trimlenmesi

Serum ve BOS örneği toplanan sakrifikasyon aşamasındaki sıçanların histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri için dokuları da toplandı. Bu doku toplama süreci için PBS (fosfat tamponlu salin)'li paraformaldehit hazırlandı. Paraformaldehit %4'lüktür ve pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Bu PBS'li paraformaldehit ile transkardiyel perfüzyon yapıldı.

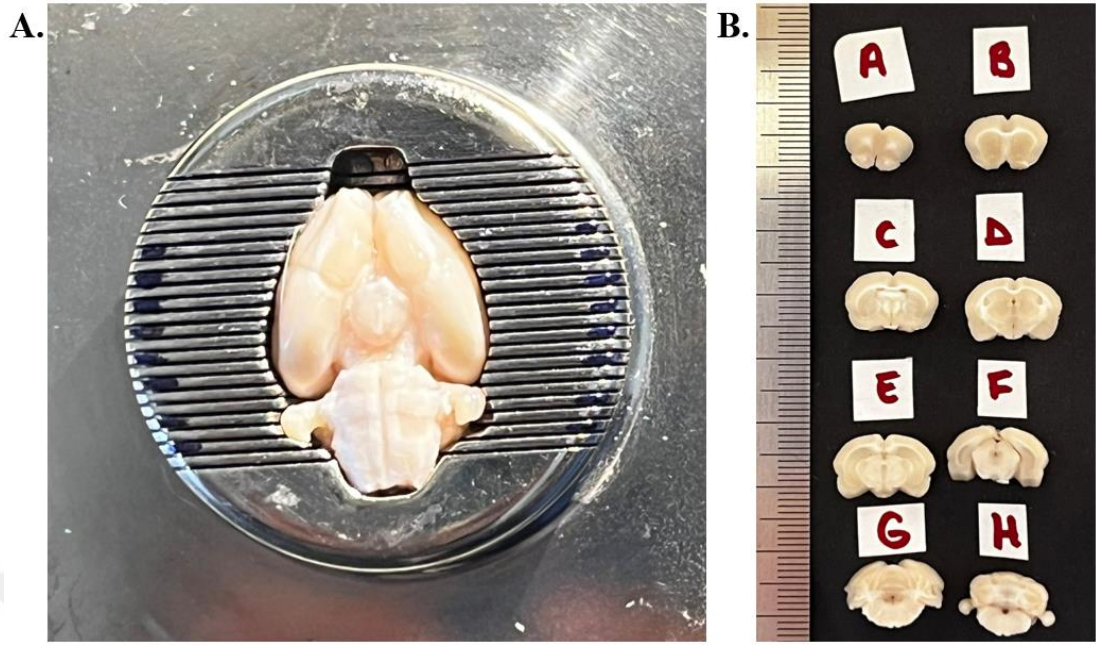
Anestezi altındaki ve yukarıda bahsi geçen kan örneği toplanmış sakrifikasyon aşamasındaki sıçanın karın ve toraks bölgesi tüm cildi açıldı. Periton açılarak diyafram serbestlendi. Ardından toraks geniş bir bölge olarak kostalarla birlikte açıldı ve kalp tamamen erişilir hale getirildi. Sol ventriküle hazırlanmış olan topuzlu ve künt uçlu enjektör ile girildi. Enjektör ucu aort başlangıcına kadar ilerletilip kleplendi. Ardından sağ atriya, kanın drene olabilmesi için kesi atıldı. Yaklaşık 60 mL'lik enjektörler ile soğutulmuş salin uygulaması sağ atriya'dan drene olan kanın berraklaşmasına kadar sürdürüldü. Drene olan sıvı berraklaşınca pH'ı 7,4'e ayarlanmış 0,1 M PBS içerisinde % 4'lük (ağırlıkça) hazırlanmış paraformaldehit ile perfüzyon yapıldı. 300 mL uygulama yapıldı. Perfüzyon işlemi tamamlandıktan sonra sıçan dekapite edilerek tüm beyni, ardından spinal kordu, bilateral optik sinirleri ve bilateral siyatik sinirleri alındı.

Toplanan dokular tamponlu paraformaldehit içerisinde 24 saat +4 °C'de post-fiksasyona maruz bırakıldı. Post-fiksasyon sonrası beyin ile spinal kord dokusu Şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.16. İzole edilen beyin ve spinal kord dokuları A. Beyin dokusu. B. Spinal kord dokusu

Beyin dokularının bölgesel incelemesinin yapılabilmesi için sıçan beyni matriksi kullanılarak trimleme yapıldı. Trimlemenin standart olabilmesi için 200-400 gram sıçan beyni için tasarlanan RBM-4000C (ASI-instruments, Warren, Michigan, ABD) aparatından yararlanıldı. Beyin matriksi ile beyinlerin trimlenmesi ise Defazio ve diğ. (118)'nin belirttiği metodoloji ile yapıldı. Bu metodolojiye göre A, B, C, D, E, F, G ve H harfleri ile belirtilen 8 beyin kesiti elde edilmektedir. Çalışmamız için trimlenen bir beyin dokusunun matriks içindeki ve trimlendikten sonra harfine göre dizilmiş hali Şekil 3.17'de paylaşılmıştır. Şekil 3.17A'da yer alan gösterimde matriksin üzerine asetatlı kalem ile işaretleme yapılmıştır. Bu işaretlemelerin hemen üstündeki ilk kesit çizgisinde beynin koronal eksenini boyunca kesme işlemi uygulandı. Yukarıdan aşağı dokuların kesit alınan yerleri sırasıyla 6, 8, 10, 12, 14, 16, 19 ve 21. kısımlardır. A, B, C, D, E, F, G ve H harfleri de sırasıyla bu koronal kesitlere tekabül etmektedir. Paxinos Atlası (119)'na göre ise A harfi bregma +3'e H harfi ise -10'a denk gelmektedir.



Şekil 3.17. Beyin matriksi içinde ve trimleme sonrası beyin dokuları A. Beyin matriksi içinde dorsolateral yüzü üzerine yatırılmış beyin dokusu B. Trimlenmiş beyin dokusu

Beyin dokusunun haricinde alınan spinal kord dokusu da trimlendi. Spinal kord dokusunun trimlenmesi ise sırasıyla servikal, torakal, lumbal ve sakral bölümlerinden alınan 0,5 cm'lik koronal kısımlar şeklinde yapıldı. İlk 3 bölge için 2 doku kesiti, sakral için ise 1 doku kesiti alındı. Bölgelerin anatomik ayrımı yapılırken C8 servikal siniri, servikal veya lumbal bölgedeki kalınlaşma, filum terminale yapısı gibi nirengi noktaları ve ek olarak spinal sinir çıkıntılarının sayılması yöntemi kullanıldı. Optik sinirler optik kiazma yapısıyla birlikte bütün olarak, etraf dokudan izole edilmek suretiyle trimlendi. Siyatik sinirler ise iki taraftan 1 cm'lik parça şeklinde trimlendi.

3.14. Doku Takibi ve Kesit Hazırlanması

Trimlenmiş beyin dokuları AB, CD, EF, GH kesitleri beraber olacak şekilde 4 kaset; spinal kord dokuları servikal, torakal, lumbal ve sakral ayrı ayrı olacak şekilde 4 kaset; optik sinir ve siyatik sinirler de 1 kaset olacak şekilde yerleştirildi ve etiketlendi. Doku takip işlemleri öncesinde paraformaldehitin uzaklaştırılması

amacıyla çeşme suyu altında 2 saat süreyle yıkandıktan sonra, rutin doku takip işlemleri otomatik doku takip cihazında gerçekleştirildi ve sırasıyla tanımlanan şu aşamalardan geçirildi: Kısaca; sırasıyla %50 - %70 -%96 ve mutlak alkol serilerinde birer saat bekletildikten sonra 2 seri ksilen, %50/%50 ksilen-parafin ve 2 seri parafin istasyonunda 30 dk, 45 dk ve 45 dk sürelerinde tutuldu. Tüm bu işlemler tamamlandıktan sonra dokuların parafin gömme işlemine geçildi. Gömme işlemi sırasında ısıtıcı tabla (Leica Biosystems, HI 1220 Flattening table, Illinois, ABD) ve sıvı parafin sağlayıcısı (Leica Biosystems, EG1120 Paraffin Wax Dispenser, Illinois, ABD) kullanıldı. Dokular takip kasetleri içerisinden alındı ve incelenecek yüzeyi alta gelecek şekilde metal bloklara gömülerek üzerlerine takip kasetlerinin kapaksız hali yerleştirildi. Bloklar soğuması için soğutucu tabla (Maxotech, Cooling plate, İstanbul, Türkiye) üzerine kondu. Parafinin katılaşma süreci tamamlandıktan sonra parafin bloklar demir bloklardan çıkarıldı ve muhafaza edildi.

Parafin bloklardan kesitler tam motorize mikrotom ile alındı (Leica Biosystems, RM2255, Illinois, ABD). Kesitlerden bilateral değerlendirme de yapılacağından tamamen düz ve iki tarafı eşit kesitler için önce gerektiğinde tıraşlama yapıldı. Kesitler 3 veya 5 µm kalınlığında alındı. Alınan kesitler 48 °C’de ayarlı su banyosu (Leica Biosystems, HI 1210 Water bath, Illinois, ABD) üzerine alındıktan sonra lamlara geçirildi. Lamlar immünohistokimya da yapılacak olması dolayısıyla pozitif yüklü olarak temin edildi. Üzerinde kesit bulunan lamlar en yüksek sıcaklığı 56 °C olacak şekilde 3 saat etüvde tutuldu. Etüvden alınan kesitler muhafaza edildi.

3.15. Histopatolojik İncelemeler

Beyin ve omurilik dokularında deneysel otoimmün ensefalomiyelit ve demiyelinizasyona ait karakteristik histopatolojik değişikliklerin ortaya konabilmesi için hematoksilen ve eozin (HE) boyaması ve luksol hızlı mavi (*luxol fast blue*) ile kresil viyole (*cresyl violet*)’nin beraber kullanıldığı LFB/CV boyaması yapıldı (120).

Hematoksilen eozin boyama protokolü şu şekildedir: Kesitler, deparafinizasyon için 10 dakika süreyle iki seri ksilende bekletildikten sonra sırasıyla absölü alkol, %95, %70 ve %50’lik alkol çözeltilerinde 5’er dakika bekletildikten sonra distile suya alınarak rehidre edildi. Harris hematoksileni boyasında 5 dakika bekletilen kesitler çeşme suyunda yıkandı. Lityum karbonat solüsyonunda dekolorize

edilerek çeşme suyunda tekrar yıkama yapıldı. Sonrasında 1 dakika süreyle de eozin boyaması yapıldı. Ardından yükselen alkol yüzdesiyle (%50 – 70 - 80 – 90 ve absolü alkol serileri) dehidrasyon sürecine geçildi ve ksilen ile 5 dakikalık iki bekleme seansı yapıldı. Ksilenden alınan kesitler, entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

LFB/CV boyaması ise satın alınan ticari kitin föyünde yer alan öneriler doğrultusunda yapıldı (Diapath S.p.A., 010226, Luxol fast blue acc. Kluwer – Barrera, Martinengo, İtalya). Kesitlere ilk olarak deparafinizasyon ve %95 alkole kadar hidrasyon uygulandı. Ardından kesitlere LFB uygulanarak 60 °C'deki etüvde inkübasyon yapıldı. %95'lik etil alkol ile kristal kaybolana kadar yıkanan kesitler distile sudan geçirildi. Lityum karbonat ile yarım dakikalık muamele sonrasındaki basamakta ışık mikroskopu ile gri cevher yapılarının beyaz cevher yapılarından ayrımının yapılabildiği kontrol edildi. Ardından %70'lik etil alkol uygulanan kesitlerdeki miyelin yapılarının maviye döndüğü mikroskop ile tekrar kontrol edildi. İki kere distile sudan geçirilen kesitlere 10 damla CV ve 5 damla aktive edici asit tamponu damlatıldı. Sonrasında 15 dakika 56 °C'ye ayarlı etüvde bekletildi. Kesitlerdeki Nissl tanecikleri pembeleşene kadar %95'lik etanol uygulandı. Son olarak ksilenden geçirilen kesitler entellan damlatılarak lam ile kapatıldı.

HE boyaması ile beyin ve omurilik dokularında gliosis, perivasküler ve meningeal inflamasyon, mikroglia, akson veya nöron dejenerasyonu incelendi. Hasarın hiç olmamasından kademeli olarak yükselişine sırasıyla 0; 1; 2; 3; 4 ve 5 şeklinde skor verildi (121). Bu skor inflamasyon skoru olarak kayıt edildi. LFB/CV boyası ile demiyelinizasyon değerlendirmesi de 0 ile 4 arasındaki skalada yapıldı (120, 122). Referans değerlendirmede de uygulandığı şekilde spinal kord kesitleri için kabul görmüş 0 ve 4 arasındaki skorlama yapıldı. Beyin için yapılan incelemelerde ise daha önce belirlenmiş olan miyelin boyaması skorlamasının çalışmamıza uyarlanmış hali kullanıldı (123). Fakat bu değerlendirmede bölgelerin incelenmesi ayrı yapıldı. Trimlenen dokularda C ve D beyin bölümlerinde subpial korteks, hipokampus, lökomalazi ve perivasküler demiyelinizasyon şeklinde 4 alt kategoride skor verildi. Histopatolojik değerlendirmede trinoküler araştırma mikroskopu (Olympus BX51, Tokyo; Japonya) ile dijital kamera (Olympus DP25, Tokyo, Japonya) ve bilgisayar programı (Olympus DP2-BSW, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Değerlendirmeleri yapan

değerlendirici patoloji alanında ve daha özel olarak demiyelinizasyon konusunda tecrübeli idi. Deney grupları açısından kör çalışıldı.

3.16. İmmünoperoksidaz İncelemeler

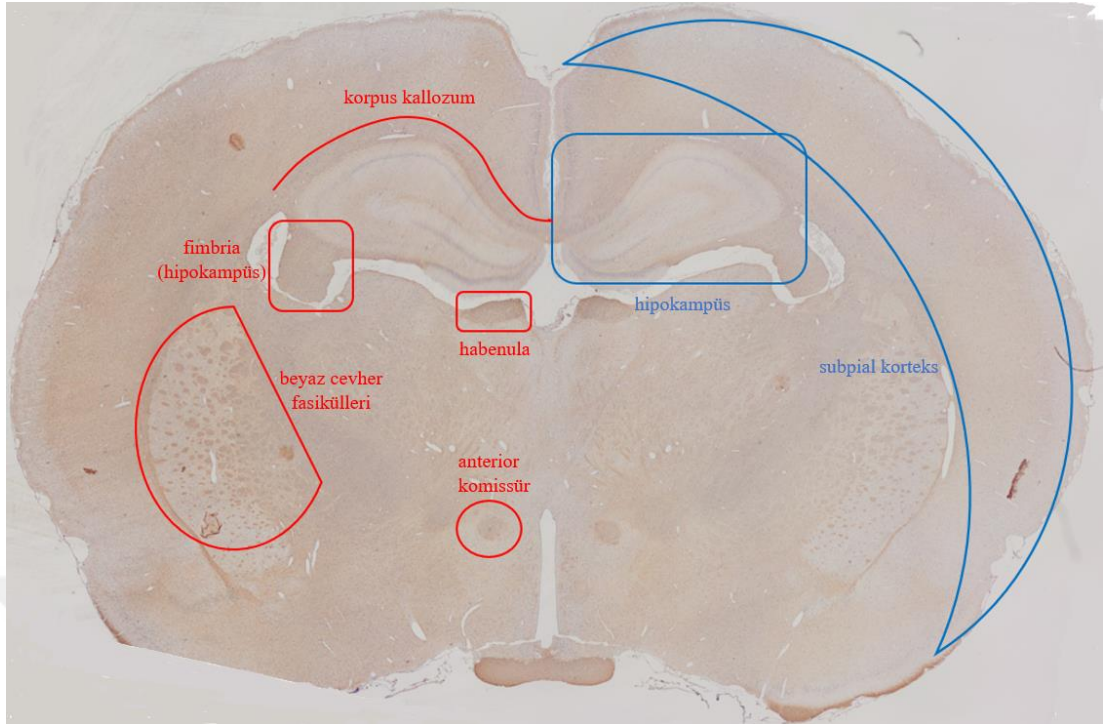
Çalışmamızda, demiyelinizasyon derecesi ve demiyelinize alanlardaki mikrogliyal aktivitenin kantifiye edilmesi amacıyla immünoperoksidaz test ile, ilgili antijenik yapılar ortaya konularak analiz edildi. İncelenen kesitteki miyelin kaybının belirlenmesinde temel miyelin protein (*myelin basic protein* – MBP) ve mikrogliyal aktivitenin belirlenmesinde iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* – IBA1) antijenlerine spesifik antikorlar kullanılarak indirekt immünoperoksidaz test gerçekleştirildi. İmmünoperoksidaz testler otomatize immün boyama cihazıyla (Leica Biosystems, BOND-MAX Fully automated IHC staining system, Illinois, ABD) yapıldı (Şekil 3.18).

MBP boyaması için primer antikor olarak poliklonal tavşan antikor (BSB 5779, Bio SB, Santa Barbara, ABD) kullanıldı. Kullanıma hazır formdaki antikor geri çekme (*retrieval*) solüsyonu olarak etilen diamin tetra asetik asitte (EDTA) 20 dk kaynatıldı ve 45 dk inkübasyon süresi uygulandı. Sekonder elemanlar için cihaz ile uyumlu kullanıma hazır kitten (Leica Biosystems, DS9800, BOND Polymer Refine Detection, Illinois, ABD) yararlanıldı. Bu kit içerisinde, peroksit bloğu, post primer, polimer reaktifi, diaminobenzidin (DAB) kromojen ve hematoksilen karşı boyasını içermektedir. Kesitler, hidrojen peroksit için 10 dk; post primer için 8 dk; polimer reaktifi için 8 dk; DAB kromojen için 8 dk; hematoksilen için 10 dk bekleme sürelerine tabi tutuldu ve her basamakta yıkama solusyonuyla yıkandı. Ardından dehidre edilip entellanla kapatıldı. Uygulamalar için pozitif kontrol olarak beyin dokusu kullanıldı.



Şekil 3.18. Tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı.

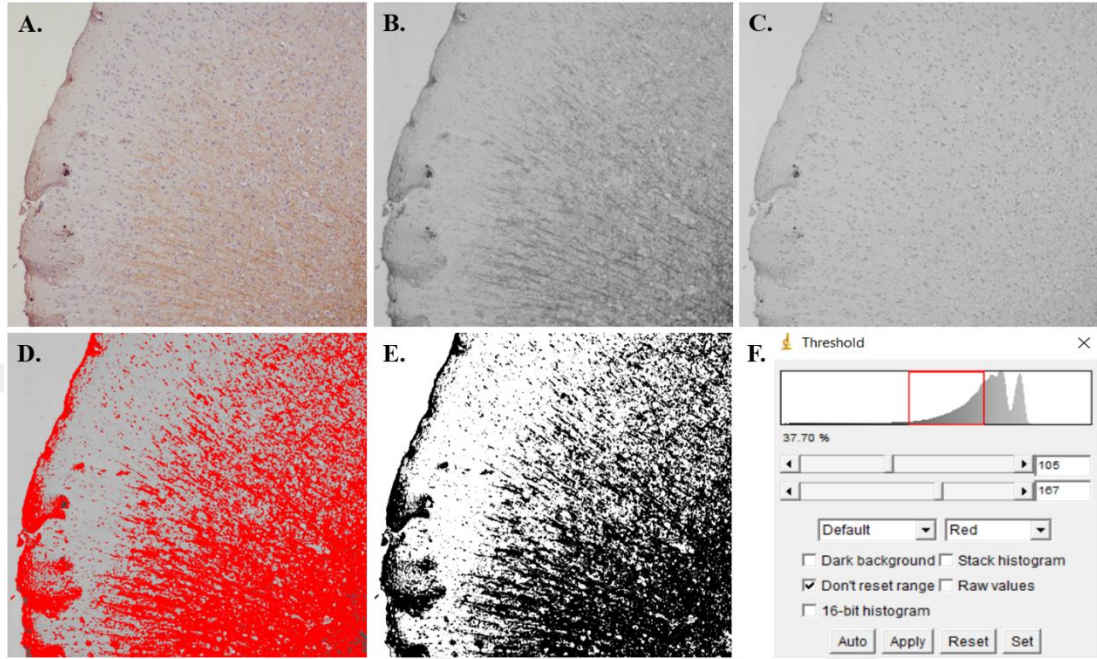
Histokimyasal boyamalarda olduğu gibi MBP için de beyinde C ve D trimleme bölgelerinden alınan kesitler kullanıldı. MBP ile demiyelinizasyon değerlendirmesi için MBP boyalı alanın nicelik olarak sayımı yapıldı (124). Bunun için açık erişimli ImageJ yazılımı (<https://imagej.net/ij/>, NIH ImageJ software, ABD) kullanıldı. MBP hesaplamaları için subpial korteks, hipokampus, beyaz cevher, spinal kord beyaz cevheri ve spinal kord gri cevheri için inceleme yapıldı. Şekil 3.19’da beyinde analizi yapılan bölgelerin özet gösterimi yapılmıştır. Şekil 3.19’da kullanılan beyin kesiti görseli bu çalışmada boyanan dokulardan oluşturulmuş olup ilgili kesitte tüm alanlar gezilerek 4X büyütmede çekilen 28 adet fotoğrafın, Photoshop® (Adobe Inc., ABD) programı ile üst üste birleştirilmesi sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.19. MBP ile boyanmış subgross doku görüntüsü üzerinde analizi yapılan gri ve beyaz cevher beyin bölgelerinin gösterimi. (Kırmızı gösterimler beyaz cevherin, mavi gösterimler ise gri cevherin incelenen bölgeleridir)

MBP ölçümleri için kesitlerin aynı alanından aynı büyütmeye fotoğraflar çekildi. Ardından bu fotoğraflar ImageJ yazılımında açılarak “Image → Color → Split Channels” şeklindeki sıralamayla (mavi), (yeşil) ve (kırmızı) olarak 3 farklı fotoğraf haline getirildi. Miyelin boyaması (mavi)-kodlu şekilde belirlendi. Sonrasında ilgili fotoğraf seçilip “Image → Adjust → Threshold” şeklindeki sıralamayla şekil üzerinde ilgi alanlarımızı renk skalasında kırmızı boyamamızı sağlayacak ayar sayfası açıldı. Ayar sayfasında ilgi alanlarının boyandığından ve kenar boyaması (*edge staining*) gibi gürültü olabilecek koyulukta alanların boyanmadığından emin olunduktan sonra “Apply” denilerek siyah/beyaz görüntü elde edildi. Programda “Analyze → Set Measurements” kısmından ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri seçildi. Ardından analizi yapılan şekilde -ilgi alanının şekline göre tüm fotoğraf ise dikkörtgen çizim ile veya dağınık bir şekil ise tamamen elle belirleme seçenekleri ile- ilgi alanı seçildi. Son olarak da “Analyze → Measure” sıralaması ile ölçüm yapıldı. Elde edilen ortalama değerler, analiz edilen fotoğraf için miyelin

miktarı olarak kayıt edildi. Tüm bu anlatım süreçleri Şekil 3.19’da örnek bir boyama fotoğrafı üzerinde görseller ile açıklanmıştır.



Şekil 3.20. MBP immünohistokimya boyaması analizi için ImageJ programı ile değerlendirme. A. Subpial korteks alanından çekilen hematoxilen ve MBP ile immünohistokimyasal boyanmış fotoğraf. B. A’daki görselin ImageJ programında renk ayrımı yapıldıktan sonraki (mavi)-miyelin yapısı görseli. C. A’daki görselin ImageJ programında renk ayrımı yapıldıktan sonraki (kırmızı)-çekirdek yapısı görseli. D. B görselindeki miyelin boyasının F görselindeki eşik değeriyle elde edilen ve miyelinin kırmızı renge boyandığı görüntü. E. D görselinin siyah/beyaz analize hazır hali. F. Eşik değeri ayarlamasının yapıldığı program ekranı. (MBP: temel miyelin protein)

Allograft İnflamatuvar Faktör 1 (*Allograft Inflammatory Factor 1*, AIF1) olarak da bilinen IBA1 proteininin beyin ve spinal kord dokularında mikrogliya aktivasyonu tayini için boyaması yapıldı. IBA1 boyaması için monoklonal antikoru (Thermo Fisher Scientific, MA5-27726, monoklon: GT10312, ABD) kullanıldı. Boyama için 1:100 dilüsyon uygulandı. 20 dk EDTA’da kaynatılma ve sonrası süreçleri için yukarıda

MBP boyamasında belirtilen yöntemin aynısı takip edildi. Beyin hücreleri içerisinde IBA1 geni çok kuvvetli ve spesifik olarak mikroglialar içerisinde eksprese edilmektedir. Bu sebeple beyindeki mikroglia aktivasyonunu göstermekte oldukça spesifik bir belirteç olduğu düşünülmektedir (125). IBA1+ boyanan hücrelerin morfolojik özellikleri ile aktivasyon tayini yapılabildiği gibi belli bir alandaki mikroglia sayısının belirlenmesi ile de mikroglial aktivasyon tayini yapılabilmektedir (126). Çalışmamızda da çeşitli bölgelerden belli büyüklükteki alana düşen IBA1+ hücre sayısı belirlenmiştir.

Analizi yapılan alanlar trimlenen beyin bölgeleri C ve D'den alınan kesitlerden seçildi. MBP boyaması ile aynı kesitlerin eşleniği olarak alındı. MBP'de bahsedilen subpial korteks, hipokampus, beyaz cevher, spinal kord beyaz cevheri ve spinal kord gri cevheri alanları değerlendirildi. Fakat burda MBP'den farklı olarak demiyelinize ve demiyelinize olmayan alanların ayrı incelemesi yapıldı.

3.17. Vücut Sıvılarında Sitokin Seviyeleri Tayini

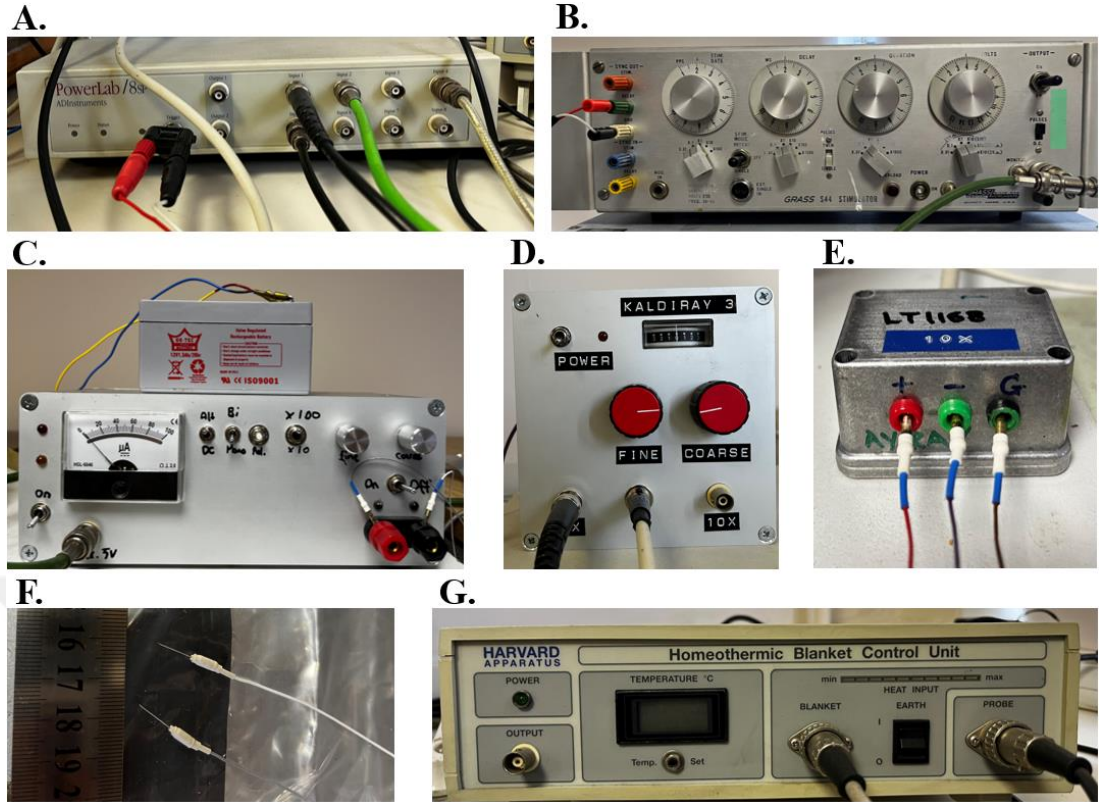
Serum örneği toplama işlemleri daha önce ayrıntılı olarak anlatılan sıçanların bu örnekleri ile Tümör Nekrozis Faktör - Alfa (TNF- α) ve İnterlökin-1beta (IL-1 β) değerleri çalışıldı. Bu inceleme için enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) yöntemi kullanıldı. TNF- α (ELK Biotechnology, ELK1396, Denver, ABD) ve IL-1 β (ELK Biotechnology, ELK1272, Denver, ABD) için ELISA deneyleri satın alınan ticari kitler ile yapıldı. Deney aşamaları firmanın deney föyü önerisine göre gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçümlerin (Multiskan GO, Thermo Fischer Scientific, ABD) ikisi de 450 nm'de yapıldı. Bu deneylerin yapılmasında sınırlı sayıda örnek test edilebildiğinden sadece ana deney grupları ve ana zaman kesitleri için sonuç elde edildi.

3.18. Elektrofizyoloji İncelemeleri

Elektrofizyoloji deneyleri ile, oluşturulan sıçan modelinde periferik sinir tutulumu olup olmadığı, tutulum var ise zamansal değişimi ve sıçanlarda görülen allodini ile periferik sinir hipo/hipereksitabilite ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Minimal-invaziv bir yöntem olması avantajıyla tekrarlanabilir ve deney protokolünün devam etmesi sağlanabilir olduğu için daha önce Teixeira ve diğ. (127)

tarafından fare kuyruk siniri ve kasında yapılan teknik kullanıldı. Bu elektrofizyoloji tekniğinde, temel olarak bir sinirin gövdesi elektriksel olarak uyarıldığında yanıt olarak uyarılan tüm sinir veya kas fibrillerinin birlikte aktivitesi sonucu oluşan bileşik aksiyon potansiyeli (*Compound Action Potential, CAP*) kaydı yapılmaktadır. Sinirden alınan kayıtlardaki duyuşal sinir kaydı “bileşik sinir aksiyon potansiyeli” (*Compound Nerve Action Potential, CNAP*) olarak; motor sinir kaydı “bileşik kas aksiyon potansiyeli” (*Compound Muscle Action Potential, CMAP*) olarak adlandırılmaktadır.

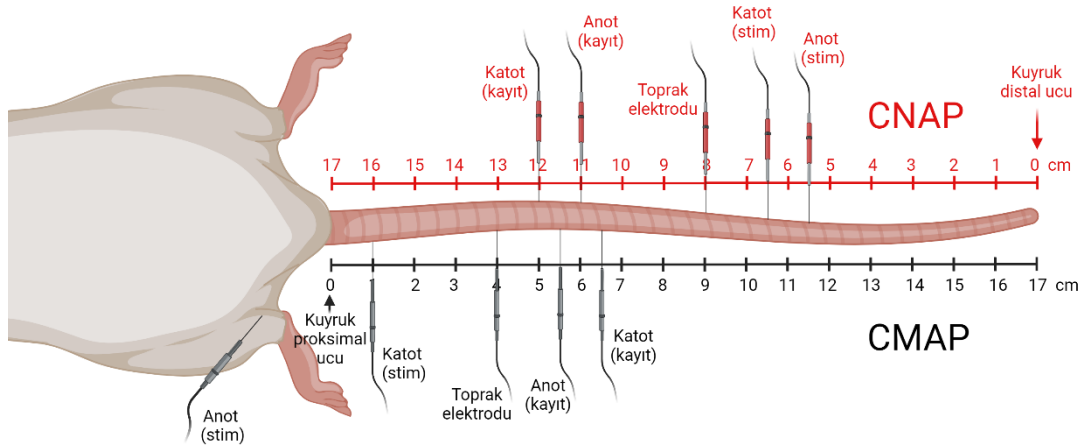
Elektrofizyolojik kayıtların alınacağı deney düzeneğine ait aparatlar Şekil 3.21’de gösterilmiştir. Elektriksel uyarılar kare dalga uyarı üreten stimülatör (Grass Instrument, S44, Massachusetts, ABD) ile verildi. Stimülatörden çıkan uyarı sabit akım ünitesi (Stimulus isolation and Constant Current Unit, YSED, Ankara, Türkiye) ile sabit akıma çevrildi ve izole edildi. Anot ve katot şeklinde iki elektrotla çıkışı sağlandı. Aksiyon potansiyellerinin kaydı anot, katot ve toprak elektrotları 10X “headstage” (Ayıray, YSED; Ankara, Türkiye)’e bağlanarak alındı. Kullanılan 5 elektrodun tümü iğne elektrot idi (Grass Instruments, Massachusetts, ABD). Sonrasında, yükseltici (Kaldıray, DC amplifier, YSED, Türkiye) ile sinyaller amplifiye edildi. Verilerin dijitalasyonu veri toplama sistemi (PowerLab/8sp, ADInstruments, Avustralya) ile yapıldı. Bilgisayardaki elektronik kayıtlar ise bilgisayar programı (LabChart 7, ADInstruments, Avustralya) ile elde edildi. Elde edilen kayıtların değerlendirmesi de aynı yazılımın okuma programı (LabChart 8 Reader, ADInstruments, Avustralya) ile yapıldı. Ek olarak, sıçanların tüm elektrofizyolojik kayıtları gürültüyü önlemek amacıyla oluşturulmuş faraday kafesi içinde alındı.



Şekil 3.21. Elektrofizyoloji deney düzeneği parçaları. A. Dijitalizasyon için veri toplama cihazı. **B.** Stimülatör. **C.** Üzerinde güç kaynağı ile beraber sabit akım ünitesi ve stimulus izolasyon ünitesi. **D.** Kaldıray. **E.** Ayıray. **F.** İğne elektrotlar. **G.** Homeotermik battaniyenin kontrol ünitesi

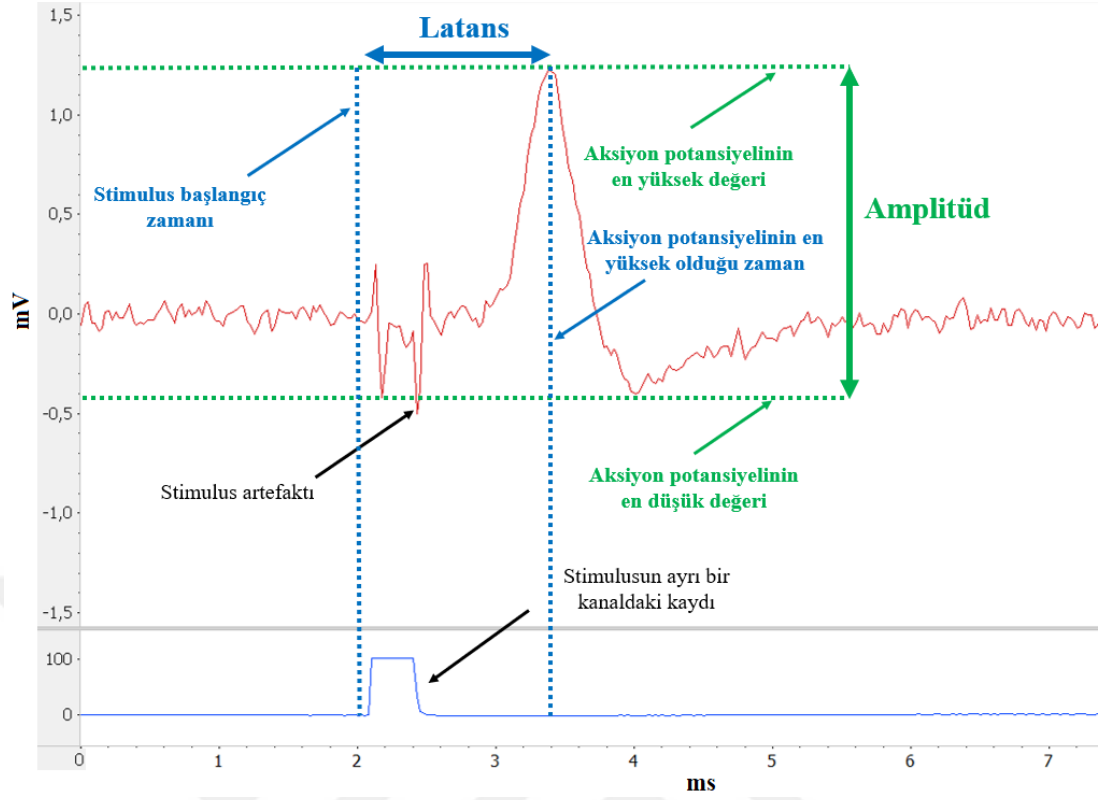
Sıçanların anestezisi 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazinin ip uygulaması ile elde edildi. Anestezisinin oturduğundan emin olunan sıçan, vücut sıcaklığının deney süresince 37 °C’de sabit kalmasını sağlayacak homeotermik battaniye (Harvard Apparatus, ABD) üzerine alındı. Sıçana rektal prob yerleştirildikten sonra kuyruk uzunluğu ölçüldü. Deney süresince çalışılan sıçanların kuyruk uzunluğu ortalaması yaklaşık 17 cm olarak tespit edildi ve bu uzunluğa bağlı olarak işlem yapıldı. Deney protokolümüze göre ilk olarak CNAP kaydı alındı. Bu kayıt için sıçanın kuyruğunda distal uç 0 cm kabul edilerek; 5,5 ve 6,5 cm noktalarına stimülasyon elektrotlarının sırasıyla anot ve katot olanı, 8 cm noktasına da toprak elektrodu yerleştirildi. Ek olarak kaydın alınması için 11 ve 12 cm noktalarına da kayıt elektrotlarının sırasıyla anot ve katot olanı yerleştirildi (Şekil 3.22, kırmızı gösterim). Elektrotlar yerleştirildikten ve

sıçanın vücut sıcaklığı sabitlendikten sonra bazal CNAP kaydı alındı. Bu kayıta ilk olarak 4 V, 300 μ s, 2000 μ A ile bazal kayıt elde edildi. 2 ms gecikme (*delay*) konularak sinyallerin görünürlüğü artırıldı. Bazal CNAP kaydı elde edildikten sonra stimülasyon şiddeti-yanıt eğrisinin çizilmesi için 100 μ A ile başlanıp 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 2000, 2400 ve gerektiğinde 3000 μ A ile aksiyon potansiyeli kaydı alındı. Refrakter periyot (RP) kaydı için ise elektrotların yeri aynı şekilde bırakıldı ve stimülatör ayarları değiştirildi. Stimülasyon süresi 60 μ s'ye düşürülürken uyarı kısmı tekliden (*single*) çiftliye (*twin*) alındı. Gecikme kısmı 0,2 ms'den başlanarak gerekli süreler kadar kayıt boyunca artırılarak araştırma yapıldı. Sabit akım ünitesindeki akım ayarı da 5000 μ A'e ayarlandı. Refrakter periyot kaydı için iki ard arda stimülasyonun tamamıyla tek aksiyon potansiyeli oluşturduğu en yüksek süre ve iki ard arda stimülasyonun ayrı ayrı tamamıyla iki aksiyon potansiyeli oluşturduğu en düşük süre araştırıldı (Şekil 3.24). CNAP kaydı tamamlandıktan sonra CMAP kaydına geçilmesi için elektrotların yeri değiştirildi. Uyarı elektrotlarının anot olanı sol arka pati bilek iç kısmına, katot olanı ise kuyruk proksimal ucundan 1 cm distale yerleştirildi. Sırasıyla 4 cm; 5,5 cm ve 6,5 cm kuyruk proksimal ucundan mesafelere toprak ve kayıt elektrotlarının anot ile katot olanı yerleştirildi (Şekil 3.22, siyah gösterim). CNAP kaydı ile benzer şekilde bazal kayıt, stimülasyon şiddeti-yanıt kaydı ve refrakter periyot kaydı yapıldı. Sıçanların kuyruğunda belirtilen noktalara elektrot yerleştirilmesi kararı ise ön kayıtlarla belirlendi. Alınan aksiyon potansiyelinin değerlendirmeye imkan sağlayabilecek büyüklükte olmasını sağlayan mesafe seçimleri yapıldı. Ek olarak, kuyruğun distal ucuna doğru incelme eğilimiyle çok ince bir bölgede elektrodun çıkma ihtimali ve yeteri sinir lifinin uyarıdan etkilenebilmesi kaygısı önlenmeye çalışıldı.

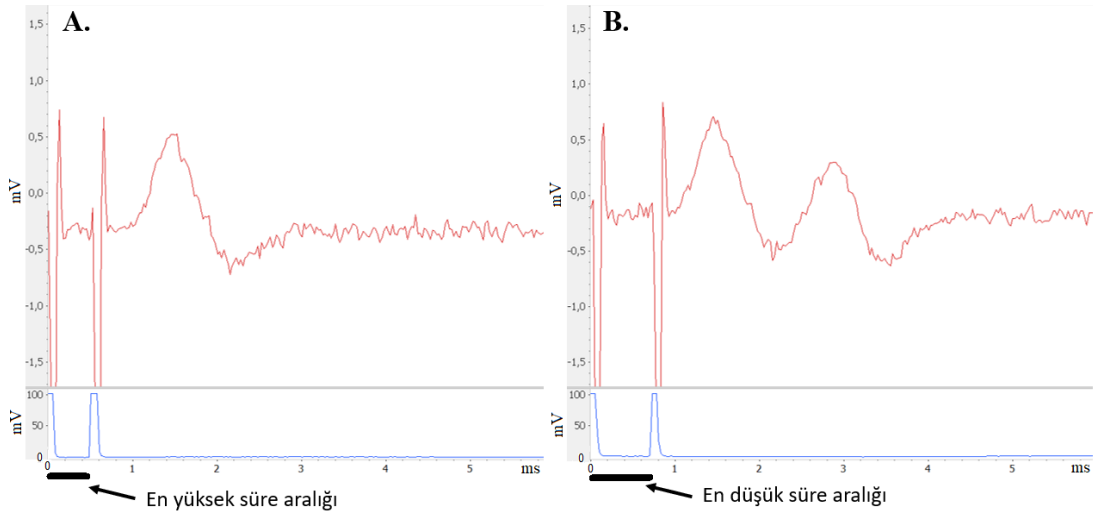


Şekil 3.22. Duyusal ve motor sinir potansiyeli kaydı protokolü (Kırmızı renk ile gösterilen kısım duysal sinir potansiyeli kaydına, siyah renk ile gösterilen kısım ise motor sinir potansiyeli kaydına ait şematizasyondur. Bu şekil Biorender.com uygulaması ile bu uzmanlık tezi için hazırlanmış ve YW26A13DGM kabul kodu ile yayınlanma lisansı alınmıştır.)

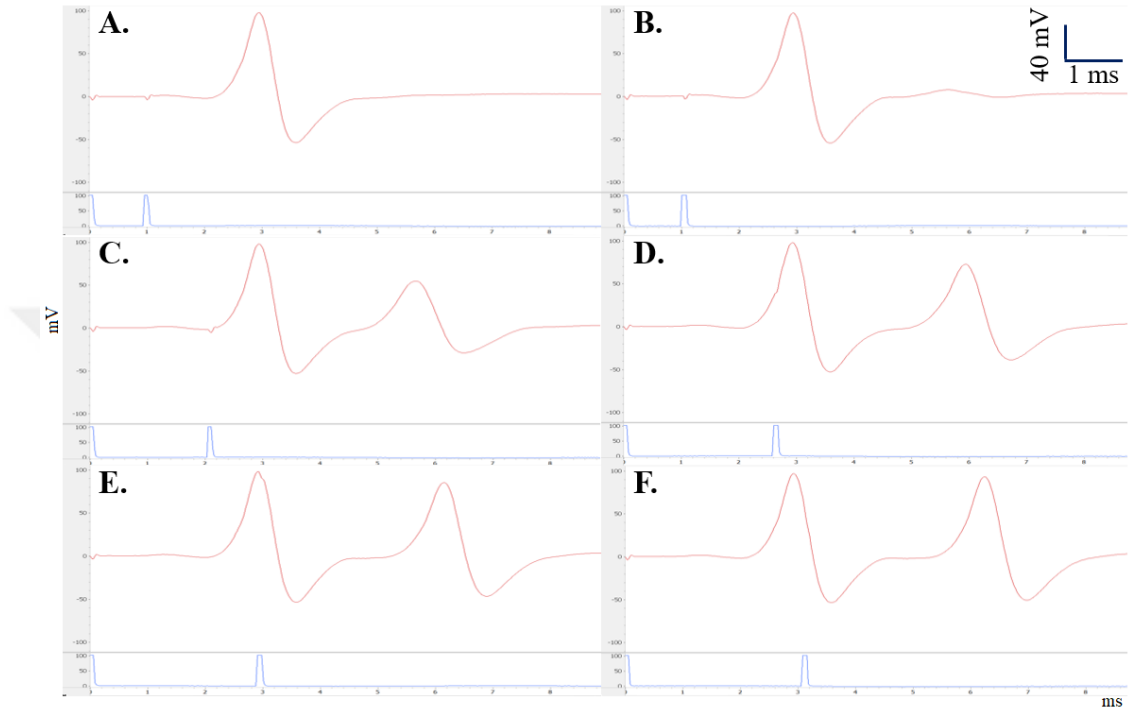
Periferik sinirden alınan aksiyon potansiyeli kaydında latans incelemesi yapılarak demiyelinizasyon, amplitüd incelemesi yapılarak aksonal hasar ve/veya demiyelinizasyon ve maksimum amplitüdün yarısını oluşturan stimulus akımı incelemesi yapılarak eksitabilite durumu değerlendirildi. Ek olarak sinirin refrakter periyodu incelemesi ile de ek bir eksitabilite parametresi daha araştırıldı. CNAP kaydında değerlendirme yapılırken incelenen değerler Şekil 3.23'te gösterilmiştir. Latans değişkeni stimulusun başlama anı ile en yüksek aksiyon potansiyelinin ölçüldüğü zaman arasında geçen süredir. Amplitüd değişkeni ise aksiyon potansiyelinin en yüksek değeri ile en düşük değeri arasındaki farktır. CMAP kaydında incelenen değişkenlerin de hesaplama metodolojisi aynıdır. Eksitabilite durumu hesaplamasında maksimum amplitüdün yarısı amplitüd değerini oluşturan stimulus şiddetinin değeri kullanıldı. Bu değer SI50 (*stimulus intensity*) olarak ifade edildi. Refrakter periyot belirlenmesinde iki ayrı değer ölçüldü. İlk refrakter periyot değerlendirmesinde, ikinci aksiyon potansiyelinin oluşmadığı maksimum stimuluslar arası süre kullanıldı. Diğer değerlendirmede ise ikinci aksiyon potansiyelinin tam anlamıyla oluşmasını sağlayan minimum stimuluslar arası süre kullanıldı.



Şekil 3.23. Bileşik aksiyon potansiyeli kaydından örnek bir trase ve latans ile amplitüd değişkenlerinin hesaplaması gösterimi.



Şekil 3.24. Refrakter periyot hesaplamaları A. Sadece tek aksiyon potansiyeli oluşturan çiftli uyarının en yüksek süre aralığı. B. Tamamıyla iki ayrı aksiyon potansiyeli oluşturabilen çiftli uyarının en düşük süre aralığı.



Şekil 3.25. Bileşik motor aksiyon potansiyeli kaydına ve refrakter periyot araştırılması sürecine dair sıralı trase görselleri. A. Stimuluslar arası süre 0,92 ms. B. Stimuluslar arası süre 0,99 ms. C. Stimuluslar arası süre 2,00 ms. D. Stimuluslar arası süre 2,55 ms. E. Stimuluslar arası süre 2,80 ms. F. Stimuluslar arası süre 3,05 ms.

3.19. Pentoksifilin Uygulaması

Pentoksifilin (Trentilin, Santa Farma ilaç Sanayi A.Ş., İstanbul, Türkiye) 50 mg/kg ve 100 mg/kg sıçan dozları kullanıldı (18). İlacın uygulama çözeltisi 20 mg etkin madde/1 mL izotonik çözelti (salin) şeklinde idi ve enjeksiyonlar intraperitoneal (ip) olarak yapıldı. Sıçan başına uygulanan sıvı dozu ise 5 mL/kg sıçan şeklinde idi. Akut uygulamalarda (50 mg/kg sıçan) da enjeksiyon yapılan sıvı miktarının aynı

olması için 10 mg etkin madde/1 mL izotonik çözelti hali kullanıldı. Kontrol gruplarına da 5 mL/kg sıçan dozunda salin uygulandı.

Akut uygulama haricinde ilacın uygulama dozu 100 mg/kg sıçan'dı. Tüm uygulanma dönemi boyunca her gün enjeksiyon yapıldı. Haftalık deneyler yapılırken önce o haftanın deneyi yapıldı ve ardından o günkü enjeksiyon yapıldı. Sonrasında akut etki de incelendi.

Pentoksifilin etkisinin araştırıldığı protokolde, östrus dönemlerinde tüm sıçanların açık kolda geçirdiği süre belirgin düşük olduğundan ve bu dönemde değerlendirme yapıldığında maskeleye yapabileceğinden sıçanların diöstrus döneminde test edilmesine karar verildi.

3.20. İstatistiksel Metodoloji

Çalışmamız verilerinin analiz edilmesinde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, ABD) ve SPSS Statistics 22 (IBM, New York, ABD) programları kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (Standart Error of the Mean, SEM) olarak belirtildi. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tüm deney grupları analiz yapılmadan önce “Shapiro-Wilk testi” ve “D’Agostino-Pearson testi” ile normallik dağılımı açısından araştırıldı. Gruplardan en az birinin normal dağılmadığı durumlarda non-parametrik testler, tüm gruplar normal dağıldığında ise parametrik testler seçildi. İki grubun sayısal ölçümlerinin kıyaslanacağı durumlarda “Bağımsız örneklem t testi” veya “Mann-Whitney U testi” kullanıldı. 2’den fazla grubun sayısal ölçümlerinin kıyasında ise “tek yönlü ANOVA (varyans analizi, *Analysis of Variance*) testi” veya “Kruskal-Wallis testi” yapıldı. “Tek yönlü ANOVA testi” sonrası çoklu karşılaştırmalar için “Tukey testi”; “Kruskal Wallis testi” sonrası çoklu karşılaştırmalar için ise “Dunn testi” *posthoc* test olarak seçildi. 2’den fazla grubun en az 2 ayrı hafta veya siklus dönemi gibi 2 değişkenli kıyasları için “iki yönlü ANOVA testi” yapıldı. Aynı deney hayvanının tekrarlı ölçümleri durumunda ise “tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” seçildi. Bu ANOVA testleri sonrasında da çoklu karşılaştırmalar için “Tukey testi”; “Dunnnett testi” veya “Sidak testi” *posthoc* test olarak uygulandı.

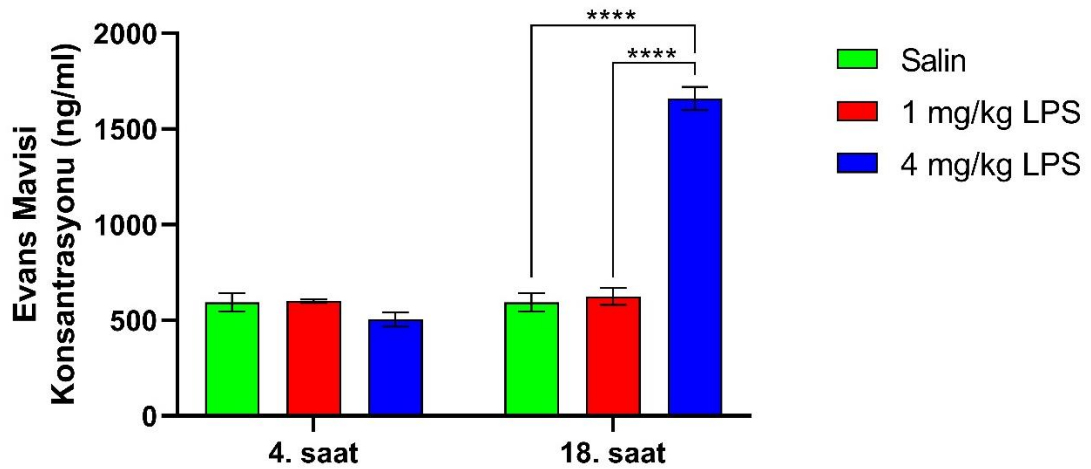
İki sayısal ölçüm arasındaki ilişkinin araştırılması için parametrik test olarak “Pearson testi”; non-parametrik test olarak ise “Spearman testi” kullanıldı. Bu testler sonucu elde edilen r değeri 0,2-0,4 arasında düşük düzeyli; 0,4-0,6 arasında orta düzeyli; 0,6-0,8 arasında yüksek düzeyli ve 0,8-1 arasında ise çok yüksek düzeyli ilişki olarak yorumlandı. Sayısal ölçüm değeri ile tanı koymada eşik değer belirlemek için ROC (Receiver-Operating Characteristic) eğrisi analizi yapıldı. Belirlenen duyarlılık ve özgüllük değerlerinden özgüllükten daha az olacak şekilde ödün verilerek eşik değeri seçildi.



4. BULGULAR

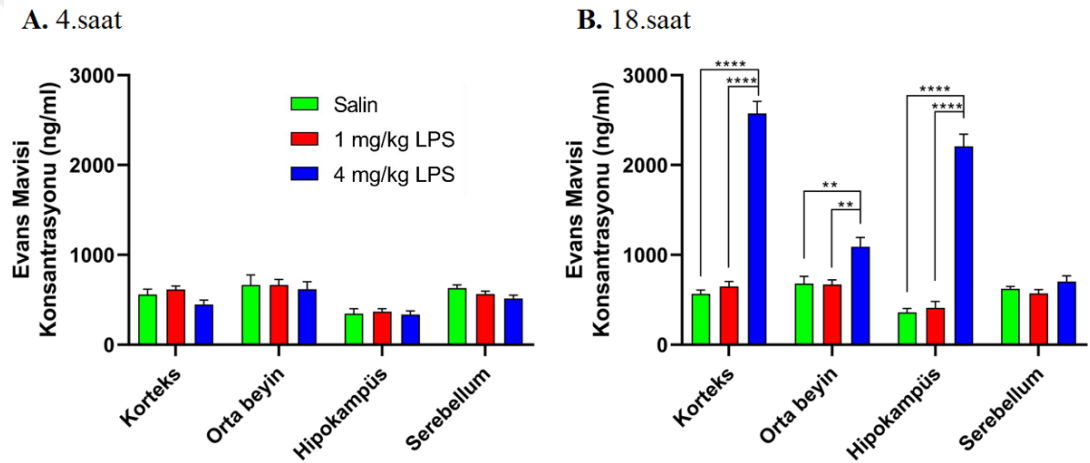
4.1. LPS'nin KBB Permeabilitesi Üzerine Etkisi

LPS'nin KBB permeabilitesinde artış yapan dozunun belirlenmesi için iv verilen evans mavisinin beyin dokusuna ekstrasvazasyonunu temel alan yöntem kullanıldı. 4. saatte sıçanların tüm beyinlerinde değerlendirilen evans mavisi konsantrasyonu Salin, 1 mg/kg LPS ve 4 mg/kg LPS grupları için benzer bulundu { $F(2,7)=2,399$; $p=0,1609$ }. 18.saatte yapılan deneylerde ise gruplar arasında fark bulundu { $F(2,7)=131,7$; $p<0,0001$ }. Çoklu karşılaştırmalar sonucunda Salin ve 1 mg LPS grubu arasında fark olmadığı; 4 mg/kg LPS grubunda Salin ve 1 mg/kg LPS gruplarına göre evans mavisi konsantrasyonunun daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,0001$). 1 mg/kg LPS 4. ve 18. saatlerde KBB permeabilitesini değiştirmez iken 4 mg/kg LPS uygulaması 18. saatte KBB permeabilitesini artırdı. Şekil 4.1'de gruplara ait değerlerin bar grafiği paylaşılmıştır.



Şekil 4.1. LPS'nin 4 ve 18. saatlerde KBB permeabilitesi üzerine etkisi. 4. saatte LPS hem 1 mg/kg hem de 4 mg/kg dozda permeabilite değişikliğine yol açmadı. 18. saatte 4 mg/kg LPS ile KBB permeabilitesi Salin ve 1 mg/kg LPS gruplarına göre artmıştı (**** $p<0,0001$). (Gruplar arasında “tek yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra çoklu karşılaştırmalar için *posthoc* “Tukey testi” kullanılmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata göstermektedir. Grup başına n=3-4’tür. LPS: Lipopolisakkarit)

LPS'nin KBB permeabilitesi üzerine etkisinin değerlendirildiği bu deneylerde etkinin bölgesel ayrımının yapılması için korteks, orta beyin, hipokampus ve serebellum beyin bölgeleri ayrı ayrı analiz edildi. 4. saatte Salin, 1 mg/kg LPS ve 4 mg/kg LPS grupları arasında tüm beyin bölgelerinde evans mavisi konsantrasyonu benzer bulundu { $F(2,28)=2,327$; $p=0,1162$ }. 18. saatte yapılan deneylerde ise 4 mg/kg grubunda diğer gruplara göre korteks ($p<0,0001$), orta beyin ($p<0,01$) ve hipokampüste ($p<0,0001$) belirgin KBB permeabilitesi artışı olduğu belirlendi { $F(2,36)=247,9$; $p<0,0001$ }. Serebellumda 18. saat de dahil olmak üzere bakılan zaman dilimlerinde 4 mg/kg LPS ile belirgin bir permeabilite değişikliği saptanmadı.

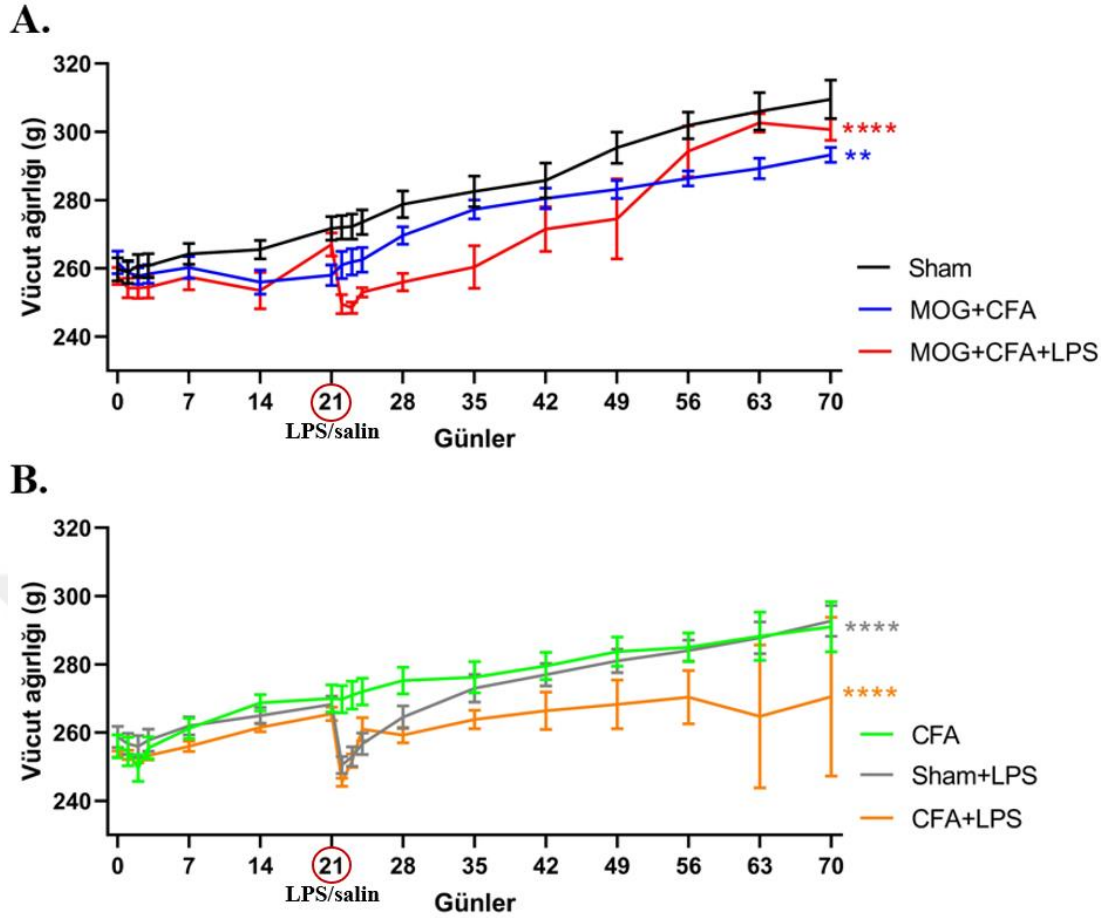


Şekil 4.2. LPS'nin korteks, orta beyin, hipokampus ve serebellum olarak izole edilen beyin alanlarındaki KBB permeabilitesine bölgesel etkisi. A. 4. saat. 1 mg/kg ve 4 mg/kg LPS'nin çeşitli beyin bölgelerindeki KBB permeabilitesi üzerine etkisi yoktu ($p>0,05$). B. 18.saat. 4 mg/kg LPS grubunda korteks, orta beyin ve hipokampus bölgelerinde Salin ve 1 mg/kg LPS gruplarına göre KBB permeabilitesi daha fazla idi, sadece serebellumda gruplar arasında fark yoktu (sırasıyla p değerleri ** $<0,0001$; ** $<0,01$; **** $<0,0001$; $>0,05$). (Gruplar arasında "iki yönlü ANOVA testi" yapıldıktan sonra çoklu karşılaştırmalar için *posthoc* "Tukey testi" kullanılmıştır. Bar grafikler ortalama $\pm$ standart hata göstermektedir. Grup başına n=3-4'tür. LPS: Lipopolisakkarit)**

4.2. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların Genel Klinik Seyri ve Vücut Ağırlığı

Deney sürecimizde sıçanlardan sadece bir tanesi LPS enjeksiyonu sonrası öldü; 1 tanesi de kronik süreçte DOE skoru 5'e ulaştığı için sakrifiye edildi. Bu durumlar haricinde herhangi bir mortalite gerçekleşmedi. Mortalite dışındaki diğer bulgular ek görsel bulgular olarak ileriki bölümlerde anlatılmıştır.

Modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu deney setine ait süreçte sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. 6 grubun verisi aynı grafikte paylaşıldığında okunma zorluğu oluşturduğundan Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS grupları bir grafikte CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS grupları da ikinci bir grafikte görselleştirildi. İstatistiksel analizler ise tüm grupları birlikte kapsayarak yapıldı. Bu gösterim şekli ilerleyen veri paylaşımlarında da kullanıldı. Gruplara göre tüm deney süresince vücut ağırlığı değişimi incelendiğinde gruplar arasında fark bulundu $\{F(80,621)=3,952; p<0,0001\}$. Grupların tüm ölçümlerdeki ortalama vücut ağırlıkları Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS grupları için sırası ile 275,7 g; 269,9 g; 267,8 g; 265,9 g; 259,4 g; 262,1 g olarak hesaplandı. CFA grubunun deney süresince vücut ağırlığı Sham grubunun vücut ağırlığı ile benzerdi. MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının deney süresince vücut ağırlığı Sham grubuna göre daha düşüktü (sırasıyla p değerleri $<0,001$; $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,0001$; Şekil 4.3). 0. ve 21. günde yapılan enjeksiyonlar sonrası vücut ağırlığının yakın takibi için günlük ölçümler de gösterilmiştir. Deneylerin başlangıcında sıçanların vücut ağırlıkları yaklaşık 260 gram iken protokol sonlandırıldığında ortalama ağırlıklar 260 - 310 gram arasında ölçüldü. LPS enjeksiyonu yapılan grupların 21. günden sonraki ölçümlerinde belirgin vücut ağırlığı düşüşü olduğu görüldü. Düşüş ortalaması LPS uygulanan 3 grup için 24. saatte 18,4 g; 48. saatte 15,8 g ve 72.saatte 10,0 g'dı, 1. haftasında ise 7 g olarak hesaplandı. Bu düşüş, protokolün aynı gününde salin enjeksiyonu yapılan gruplarda ise görülmedi.



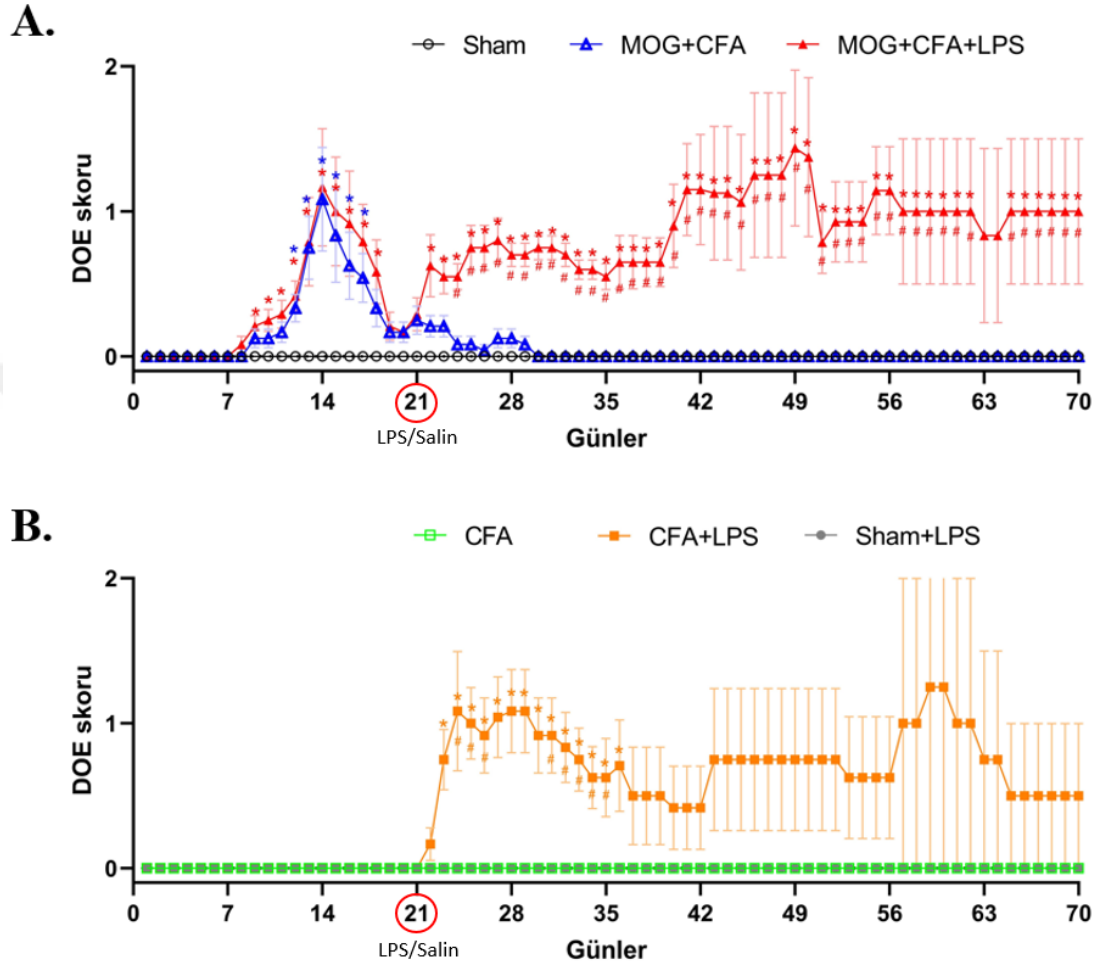
Şekil 4.3. Modelin oluşturulması deneyleri süresinde sıçanların vücut ağırlıkları değişimi. **A.** Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının vücut ağırlığı değişimleri. MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının vücut ağırlığı Sham grubuna göre deney süresince daha düşüktü (sırasıyla p değerleri $** < 0,01$ ve $**** < 0,0001$) **B.** CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının vücut ağırlığı değişimleri. Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının vücut ağırlığı Sham grubuna göre deney süresince daha düşük bulundu ($****p < 0,0001$). (“Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama±standart hata göstermektedir. Grup başına n=8’dir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

4.3. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların DOE skoru

Modelin oluşturulması ve davranışsal karakterizasyonu deney protokolü boyunca sıçanların her gün DOE skoru kayıt edildi. Belirlenen en yüksek DOE skoru

5 en düşük DOE skoru ise 0'dı. Belirlenen en yüksek günlük ortalama DOE skoru 49. günde MOG+CFA+LPS grubundaydı ve 1,44 bulundu. Sıçanların bireysel en yüksek DOE skorlarının görüldüğü günler ise 13, 14 ve 15. günler oldu. MOG+CFA uygulanan iki gruptaki tüm sıçanların LPS enjeksiyonuna kadar geçen 3 haftalık sürede DOE skorunun en az bir ölçümde >1 olma olasılığı % 29,2 olarak hesaplandı. Aynı dönemde DOE skorunun en az bir ölçümde 1 olma olasılığı %37,5; en az bir ölçümde 0,5 olma olasılığı ise %83,3 bulundu. MOG+CFA+LPS grubundaki sıçanların 3. hafta LPS enjeksiyonu sonrası DOE skorunun en az bir ölçümde >1 olma olasılığı %50; en az bir ölçümde 1 olma olasılığı %91,7 ve en az bir ölçümde 0,5 olma olasılığı %100 hesaplandı. 70 günlük DOE skorunun gruplara göre seyri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarının DOE skoru 70 gün boyunca 0'dı. DOE skoru MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarında Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarına göre yüksek bulundu ($F(69,1122)=4,078$; $p<0,0001$). Gruplar arasında her gün ölçülen DOE skoru tüm ikili grup kombinasyonları için kıyas edildi. Şekil 4.4'te Sham grubuna ve rutin kullanılan DOE modeli olan MOG+CFA grubuna karşı fark belirlenen gruplar özellikle gösterilmiştir. Fakat bu gösterim sırasında anlamlı tüm p değerleri için derecesinden bağımsız tek "*" veya "#" işareti kullanıldı. MOG+CFA+LPS grubunun DOE skoru 9. gün itibari ile Sham grubundan yüksekti. Bu fark 19, 20 ve 21. günlerde kayboldu ve 22. günde geri oluşup 70. güne kadar devam etti. MOG+CFA grubunun DOE skoru ise 12. gün itibari ile Sham grubundan yüksek belirlendi. Bu fark 17. güne kadar devam etti. 17. gün sonrası tüm deney süresince Sham grubu ile benzerdi. CFA+LPS grubunun DOE skoru ise 23. gün itibari ile Sham grubundan yüksekti ve bu fark 36. güne kadar devam etti. DOE skoru 70. güne kadar CFA+LPS grubu için ortalamada 0'a hiç düşmese de Sham grubuna göre diğer günlerde fark saptanmadı ($p>0,05$). Oluşturduğumuz modelin (MOG+CFA+LPS grubu) bilinen rutin modele (MOG+CFA grubu) göre yapılan kıyas analizinde ise 24. günde fark saptandı ve MOG+CFA+LPS grubunun DOE skoru MOG+CFA grubundan daha yüksek bulundu ($p<0,05$). 24. günde başlayan bu fark 70. güne kadar devam etti ve sadece 63 ile 64. günlerde bu fark tespit edilemedi. CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre yapılan kıyas analizinde ise DOE skorunun 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34 ve 35. günlerde CFA+LPS grubundan daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Ek olarak CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre DOE skorunun

daha düşük olduğu günler ise MOG+CFA grubunun Sham grubuna göre farklı olduğu günler ile aynı olup şekilde gösterilmedi.



Şekil 4.4. Modelin oluşturulması deneylerinde günlük DOE skoru. A. Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının DOE skoru değişimi. MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının Sham grubuna göre DOE skoru yüksek bulundu ($p<0,05$). MOG+CFA grubunun 12-17. günlerde; MOG+CFA+LPS grubunun ise 9-18, 22-62 ve 65-70. günlerde DOE skoru Sham grubuna göre daha yüksek belirlendi ($*p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun ise 24-62 ve 65-70. günlerde MOG+CFA grubuna göre DOE skoru daha yüksek saptandı ($\#p<0,05$). **B.** CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının DOE skoru değişimi. CFA ve Sham+LPS gruplarının DOE skoru Sham grubu ile tamamen benzer iken CFA+LPS grubunun DOE skoru Sham grubundan daha yüksek bulundu ($p<0,05$). 23-36. Günler arasında CFA+LPS

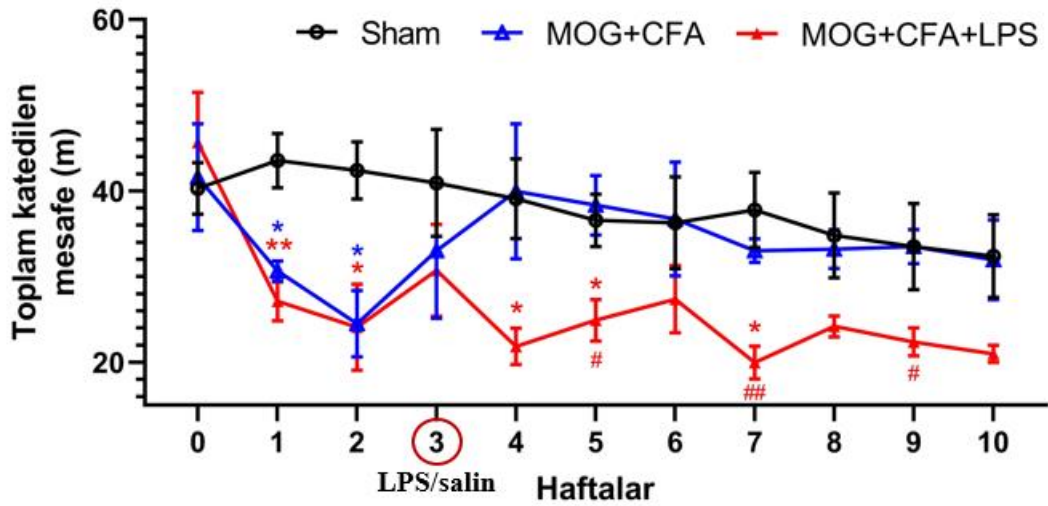
grubunun DOE skoru daha yüksekti (* $p<0,05$). CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre DOE skorunun daha yüksek olduğu günler ise 24-26 ve 31-34. günlerdi (# $p<0,05$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Dunnett testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama değer ve daha az koyulukta standart hata göstermektedir. Grup başına $n=12$ ’dir. Günlük gruplar arası analizler için ise “tek yönlü ANOVA testi” yapılmış ve ardından *posthoc* “Tukey testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre günlük karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üzerine “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre günlük karşılaştırma analizinde fark belirlenen grupların da kendi renginde ortalama verisi altına “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler sadece $p<0,05$ olarak değerlendirilmiştir. DOE: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit; MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

4.4. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Davranış Bulguları

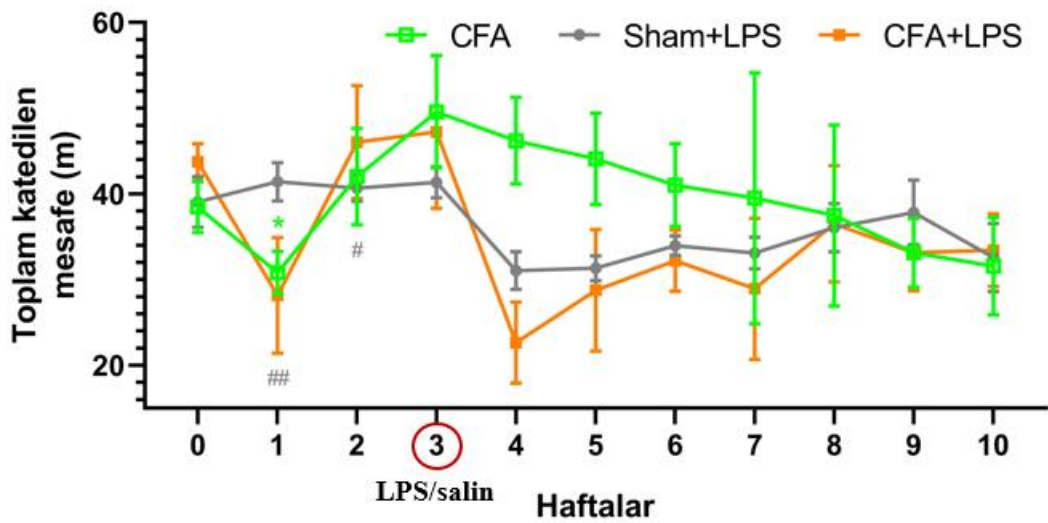
Sıçanlar protokol başlarken ve sonrasında haftalık olarak açık alan arena testi ile takip edildi. Tüm sıçanların 0. hafta toplam katettikleri mesafe ortalama $\pm$ standart sapma değeri $40,95 \pm 14,28$ m olarak hesaplandı. Belirlenen en düşük haftalık ortalama toplam katedilen mesafe $19,98$ m ile MOG+CFA+LPS grubunun 7. haftasında elde edildi. Belirlenen en yüksek haftalık ortalama toplam katedilen mesafe ise $49,56$ m ile CFA grubunun 3. haftasında belirlendi. Grupların zamana göre genel eğilimindeki kıyası yapıldığında fark belirlendi $\{F(50,348)=2,049; p<0,0001\}$ ve MOG+CFA+LPS grubunun toplam katedilen mesafesinin Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS gruplarına göre daha düşük olduğu bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,05$; $<0,0001$; $<0,05$). Haftalık olarak gruplar arasında yapılan kıyaslar ise Sham ve MOG+CFA gruplarına göre ayrı ayrı yapıldı. MOG+CFA+LPS grubunun toplam katedilen mesafesi 1, 2, 4, 5 ve 7. haftalarda Sham grubundan daha düşük bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,05$; $<0,05$; $<0,05$; $<0,05$). MOG+CFA grubunun da 1. ve 2. haftalarda Sham grubuna göre toplam katedilen mesafesi daha düşüktü ($p<0,05$). CFA grubunun ise sadece 1. haftada toplam katedilen mesafesi Sham grubundan düşüktü ($p<0,05$). Tüm bu analiz sonuçları Şekil 4.5’te p değerinin

derecesine göre “*” simgesi ile gösterilmiştir. CFA grubu için birinci haftadan sonra toplam katedilen mesafe ortalaması sham grubunun üstüne çıktı fakat fark belirlenmedi. MOG+CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubu ile kıyasında ise 5, 7 ve 9. haftalarda MOG+CFA+LPS grubunun toplam katedilen mesafesi daha düşük belirlendi (sırasıyla p değerleri: <0,05; <0,01; <0,05). MOG+CFA grubu ile kıyasta Sham+LPS grubunun 1 ve 2. haftalarda daha yüksek toplam katedilen mesafeye sahip olduğu belirlendi (sırasıyla p değerleri: <0,01 ve <0,05). MOG+CFA grubuna göre kıyas sonuçları Şekil 4.5’te *p* değerinin derecesine göre “#” simgesi ile paylaşılmıştır.

A.



B.



Şekil 4.5. Açık alan arena testinde gruplara göre haftalık toplam katedilen mesafe. **A.** Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının haftalık toplam katedilen mesafe değişimi. MOG+CFA+LPS grubunun diğer tüm gruplara göre toplam katedilen mesafesi daha düşüktü ($p<0,0001$). MOG+CFA+LPS grubunun Sham grubuna göre 1, 2, 4, 5 ve 7. haftalarda toplam katedilen mesafesi daha düşüktü (** $p<0,01$ ve diğer tümü * $p<0,05$). MOG+CFA grubunun ise sadece 1 ve 2. haftada daha düşüktü (* $p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre 5, 7 ve 9. haftalar da toplam katedilen mesafesi daha düşük bulundu (# $p<0,05$; ## $p<0,01$ ve # $p<0,05$). **B.** CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının haftalık toplam katedilen mesafe değişimi. Sham grubuna göre sadece CFA grubunun 1. haftasında fark vardı ve CFA'nın mesafesi daha düşüktü (* $p<0,05$). MOG+CFA grubu ile yapılan kıyasta ise sadece Sham+LPS grubunun toplam katettiği mesafenin 1 ve 2. haftalarda daha yüksek olduğu bulundu (## $p<0,01$ ve # $p<0,05$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ 'dir. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üzerine “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark belirlenen grupların da kendi renginde ortalama verisi altına “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

Sıçanların ağrı-benzeri davranışlarının belirlenmesi için sağ arka patiden mekanik allodini değerlendirildi. Gruplar arasında haftalık pati geri çekme eşiği açısından fark bulundu { $F(50,378)=3,231$; $p<0,0001$ } ve MOG+CFA+LPS grubunun pati geri çekme eşiği diğer tüm gruplara göre düşüktü. CFA+LPS grubunun MOG+CFA+LPS grubu hariç diğer tüm gruplara göre pati geri çekme eşiği daha düşüktü. CFA ve MOG+CFA gruplarının ise sadece Sham grubuna göre pati geri çekme eşiği düşüktü. Sham+LPS grubu ile Sham grubunun pati geri çekme eşiği

benzerdi. Bu analizlere ait *posthoc* Tukey testinden elde edilen düzeltilmiş *p* değerleri Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Von Frey filaman testi sonuçlarının gruplar arasındaki ikili kombinasyonlarına ait analiz sonuçlarının düzeltilmiş *p* değerleri

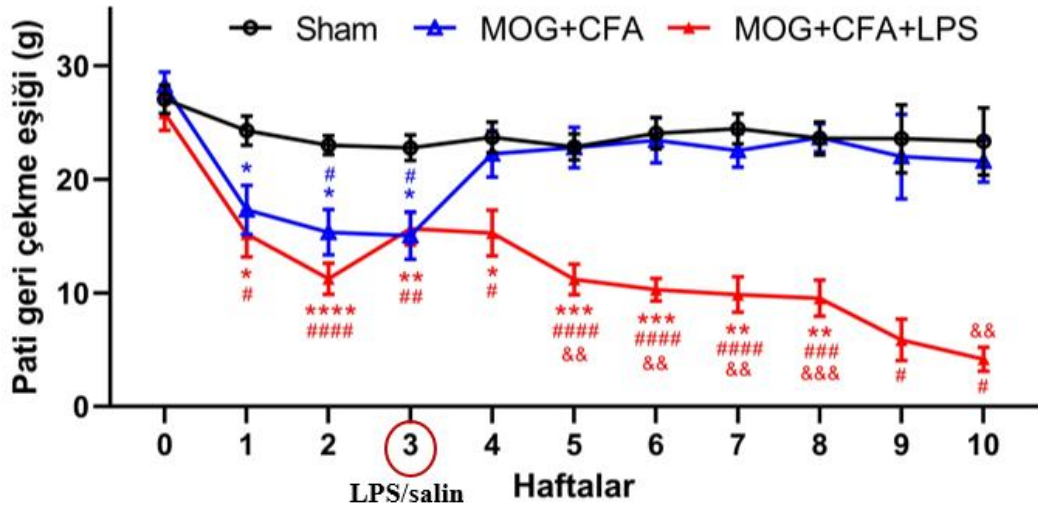
Gruplar	Sham	CFA	MOG+ CFA	Sham+ LPS	CFA+ LPS	MOG+ CFA+LPS
Sham	-	0,0184	0,0126	0,4329	<0,0001	<0,0001
CFA	*	-	>0,9999	0,6528	0,0203	<0,0001
MOG+CFA	*	x	-	0,6176	0,0178	<0,0001
Sham+LPS	x	x	x	-	<0,0001	<0,0001
CFA+LPS	****	*	*	****	-	0,0113
MOG+ CFA+LPS	****	****	****	****	*	-

CFA: Freund’un tam adjuvanı; MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; LPS; lipopolisakkarit; x: fark yok. “*” simgesinin sayısı farkın derecesini göstermektedir.

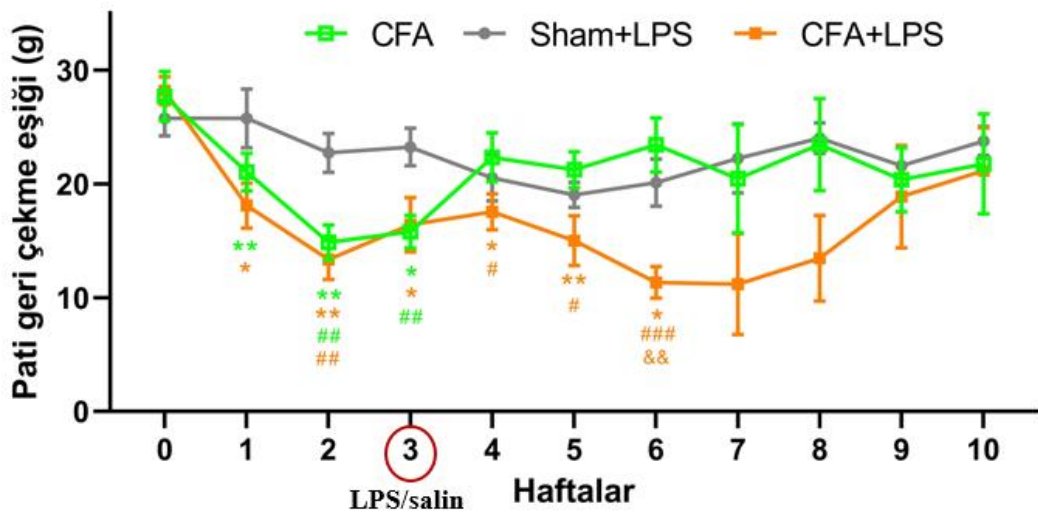
Grupların zamana karşı değişimlerinin genel analizi dışında her grubun her haftasının 0.hafta (bazal) ölçüm değerine göre, tüm grupların haftalık olarak Sham ve MOG+CFA grubuna göre kıyasları yapıldı (Şekil 4.6). MOG+CFA grubunun pati geri çekme eşik değeri kendi bazal ölçüm değerine göre 1, 2 ve 3. haftada düşüktü ($p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun ise pati geri çekme eşik değeri kendi bazal ölçümüne göre 1. haftadan 8. haftaya kadar daha düşüktü, 9 ve 10. haftada da anlamlı değere oldukça yakındı (sırasıyla *p* değerleri: $<0,05$; $<0,0001$; $<0,01$; $<0,05$; $<0,001$; $<0,001$; $<0,01$; $<0,01$; 0,0569 ve 0,0503). MOG+CFA grubunun pati geri çekme eşik değeri Sham grubuna göre 2 ve 3. haftada daha düşüktü ($p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun ise 10 haftanın tamamında pati geri çekme eşik değeri Sham grubundan düşüktü (sırasıyla *p* değerleri: $<0,05$; $<0,0001$; $<0,01$; $<0,05$; $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,05$; $<0,05$). MOG+CFA+LPS şeklinde oluşturduğumuz model grubunun pati geri çekme eşiği, MOG+CFA şeklindeki bilinen rutin modelin pati geri çekme eşiğinden haftalık kıyasta 5, 6, 7, 8 ve 10. haftalarda daha düşük bulundu ($p<0,01$ ve sadece 8.

haftada $<0,001$). CFA grubunun pati geri çekme eşik değeri kendi bazal ölçüm değerine göre 1, 2 ve 3. haftada daha düşüktü (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,01$; $<0,05$). CFA+LPS grubunun ise pati geri çekme eşik değeri kendi bazal ölçümüne göre 1. haftadan 6. haftaya kadar daha düşüktü ($p<0,05$ ve sadece 2 ve 5. haftada $<0,01$). CFA grubunun pati geri çekme eşik değeri Sham grubuna göre 2 ve 3. haftada daha düşüktü ($p<0,01$). CFA+LPS grubunun ise 2, 4, 5 ve 6. haftada pati geri çekme eşik değeri Sham grubundan düşüktü (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,05$; $<0,05$; $<0,001$). MOG+CFA grubuna göre CFA+LPS grubunda sadece 6. haftada daha düşük pati geri çekme eşik değeri saptandı ($p<0,01$).

A.



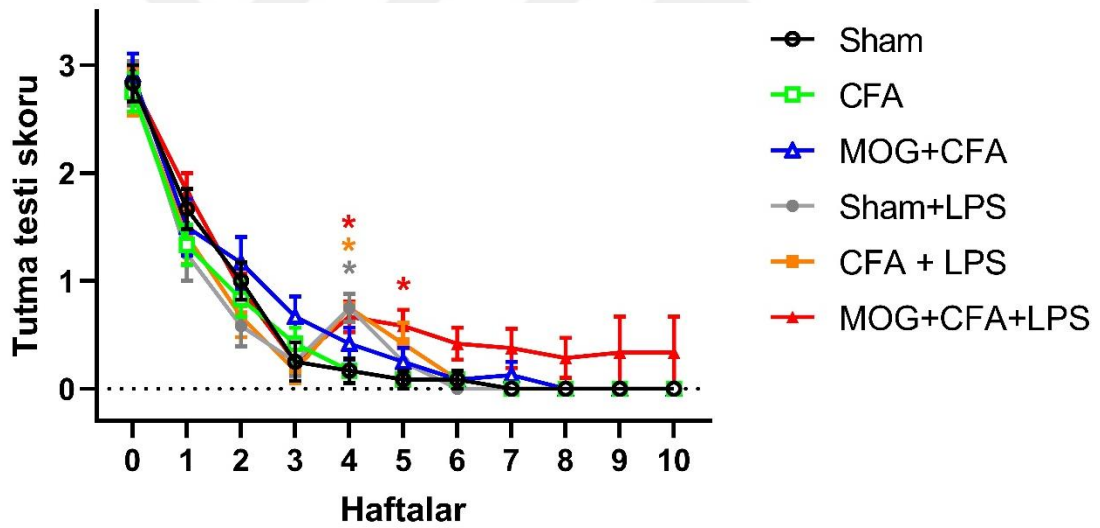
B.



Şekil 4.6. Von Frey filamanı testinde gruplara göre haftalık pati geri çekme eşik değerleri. **A.** Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının haftalık pati geri çekme eşik değeri değişimi. MOG+CFA+LPS grubunun pati geri çekme eşik değeri 1. haftadan 8. haftaya kadar bazal ölçüm değerine göre düşüktü (* $p<0,05$; **** $p<0,0001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$; *** $p<0,001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; ** $p<0,01$). MOG+CFA grubunun ise sadece 1, 2 ve 3. hafta da pati geri çekme eşik değeri bazal ölçümüne göre daha düşüktü (* $p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun Sham grubuna göre tüm haftalarda pati geri çekme eşik değeri düşüktü (# $p<0,05$; ##### $p<0,0001$; ## $p<0,01$; # $p<0,05$; ##### $p<0,0001$; ##### $p<0,0001$; ##### $p<0,0001$; ### $p<0,001$; # $p<0,05$; # $p<0,05$). MOG+CFA grubunun ise sadece 2. ve 3. haftada sham grubuna göre pati geri çekme eşik değeri düşüktü (# $p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre 5, 6, 7, 8 ve 10. haftalarda pati geri çekme eşik değeri daha düşüktü (&& $p<0,01$ ve sadece 8. haftada && $p<0,001$). **B.** CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının haftalık pati geri çekme eşik değeri değişimi. CFA+LPS grubunun pati geri çekme eşik değeri 1. haftadan 6. haftaya kadar bazal ölçüm değerine göre düşüktü (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$). CFA grubunun ise sadece 1, 2 ve 3. haftada pati geri çekme eşik değeri bazal ölçümüne göre daha düşüktü (** $p<0,01$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$). CFA+LPS grubunun Sham grubuna göre 2, 4, 5 ve 6. haftalar da pati geri çekme eşik değeri düşüktü (## $p<0,01$; # $p<0,05$; # $p<0,05$; ### $p<0,001$). CFA grubunun ise sadece 2 ve 3. haftada Sham grubuna göre pati geri çekme eşik değeri düşüktü (## $p<0,01$). CFA+LPS grubunun MOG+CFA grubuna göre sadece 6. haftada pati geri çekme eşik değeri daha düşüktü (&& $p<0,01$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ ’dir. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. Her grubun haftalık ölçümlerinin kendi bazal ölçümüne göre yapılan kıyas analizinde fark belirlenen ortalama değeri altına grubun kendi renginde “*” simgesi konulmuştur. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması altına “#” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark belirlenen grupların da kendi renginde ortalama verisi altına “&” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri

derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

Sıçanların haftalık olarak yapılan agresyon testi sonuçlarına göre zamansal değişim açısından 6 grup arasında fark bulunmadı. Sadece gruplar haftalık olarak Sham grubuna göre kıyas edildiğinde 4. ve 5. haftada fark belirlendi. 4. haftada Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının agresyon testi skoru Sham grubundan daha yüksekti ($p<0,05$). 5. haftada ise sadece MOG+CFA+LPS grubunun tutma testi skoru Sham grubundan daha yüksekti ($p<0,05$). Haftalık olarak agresyon test skoru tüm gruplarda düşmekteydi fakat MOG+CFA+LPS grubunda 0,3 ortalama skor değeri 4. hafta sonrası sürekli saptandı.

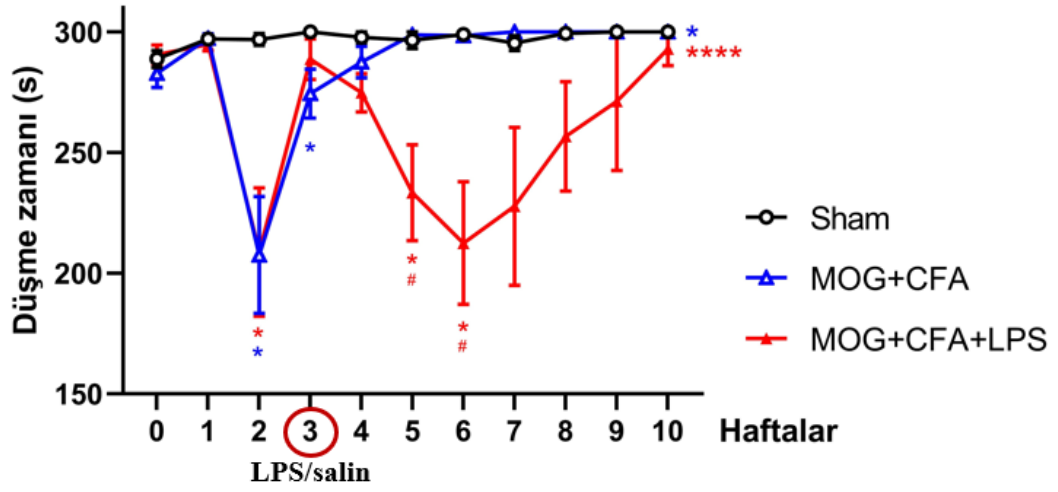


Şekil 4.7. Agresyon testinde gruplara göre haftalık tutma testi skoru. Sıçanların tutma testi skoru tüm gruplar için ilk haftadan itibaren düşmekteydi. LPS alan grupların tutma testi skoru 4. haftada Sham grubunun tutma testi skorundan daha yüksekti ($*p<0,05$). 5. haftada ise sadece MOG+CFA+LPS grubunun tutma testi skoru Sham grubundan daha yüksekti ($*p<0,05$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ ’dir. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc*

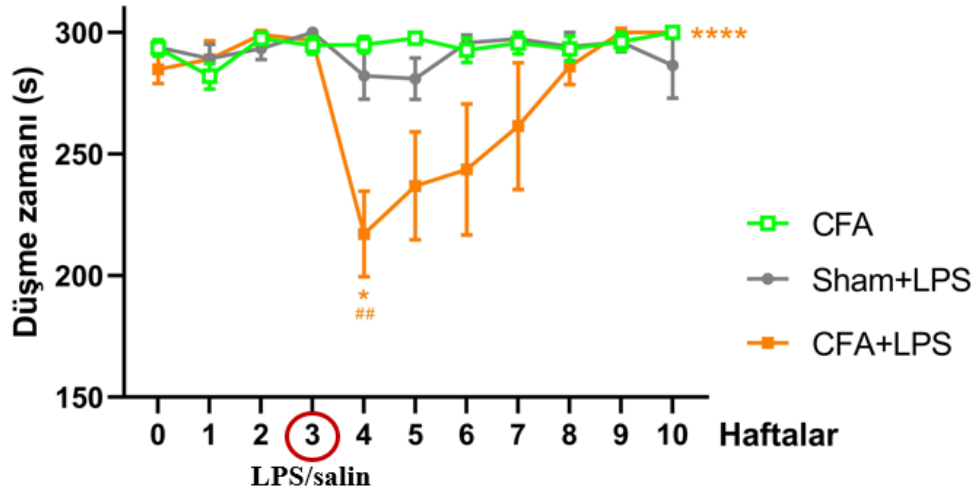
“Dunnett testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üstüne “*” simgesi konulmuştur. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

Sıçanların kaba motor ve denge durumlarını değerlendirmek için rotarod testi yapıldı ve düşme süresi değerlendirildi. Tüm sıçanların 0. hafta düşme süresi ortalaması 289 s olarak hesaplandı. Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının tüm deney süresince düşme süresi ortalaması ise sırasıyla 297 s; 293,8 s; 283 s; 291,6 s; 270,3 s ve 256,7 s bulundu. Zamana bağlı olarak gruplar arasında fark belirlendi{ $F(50,513)=4,503$; $p<0,0001$ }. MOG+CFA, MOG+CFA+LPS ve CFA+LPS gruplarının düşme süresi Sham grubunun düşme süresinden düşüktü (sırasıyla p değerleri: $<0,05$; $<0,0001$; $<0,0001$). Sham grubuna göre haftalık olarak yapılan kıyasta ise MOG+CFA grubunun düşme süresi 2 ve 3. haftada Sham grubundan düşüktü ($p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun düşme süresi 2, 5 ve 6. haftada Sham grubuna göre düşüktü ($p<0,05$). CFA+LPS grubunun ise 4. haftada Sham grubuna göre düşme süresi daha düşük bulundu ($p<0,05$). MOG+CFA grubuna göre yapılan kıyasta MOG+CFA+LPS grubunun düşme süresinin 5 ve 6. haftada ($p<0,05$); CFA+LPS grubunun ise sadece 4. haftada düşme süresinin daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,01$).

A.



B.



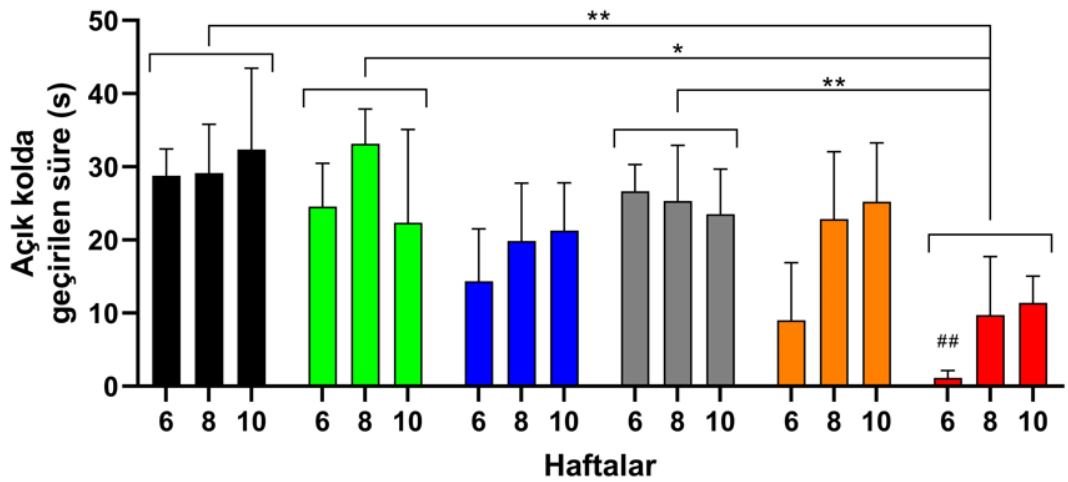
Şekil 4.8. Rotarod testinde gruplara göre haftalık düşme süresi. A. Sham, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının haftalık düşme süresi değeri değişimi. Sham grubuna göre MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının düşme süresi düşük bulundu (* $p < 0,05$ ve **** $p < 0,0001$). MOG+CFA grubunun düşme süresi 2 ve 3. haftada Sham grubundan daha düşüktü (* $p < 0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun ise 2, 5 ve 6. haftada düşme süresi Sham grubundan daha düşük hesaplandı (* $p < 0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun düşme süresi 5 ve 6. haftada MOG+CFA grubunun düşme süresine göre düşüktü (# $p < 0,05$). **B.** CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının haftalık düşme süresi değeri değişimi. CFA+LPS grubunun düşme süresi Sham grubundan daha düşük bulundu (**** $p < 0,0001$). CFA+LPS grubunun 4. haftada düşme süresi hem Sham grubundan hem de MOG+CFA grubundan daha düşüktü

(* $p<0,05$ ve ## $p<0,01$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ ’dir. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üstüne “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üstüne “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

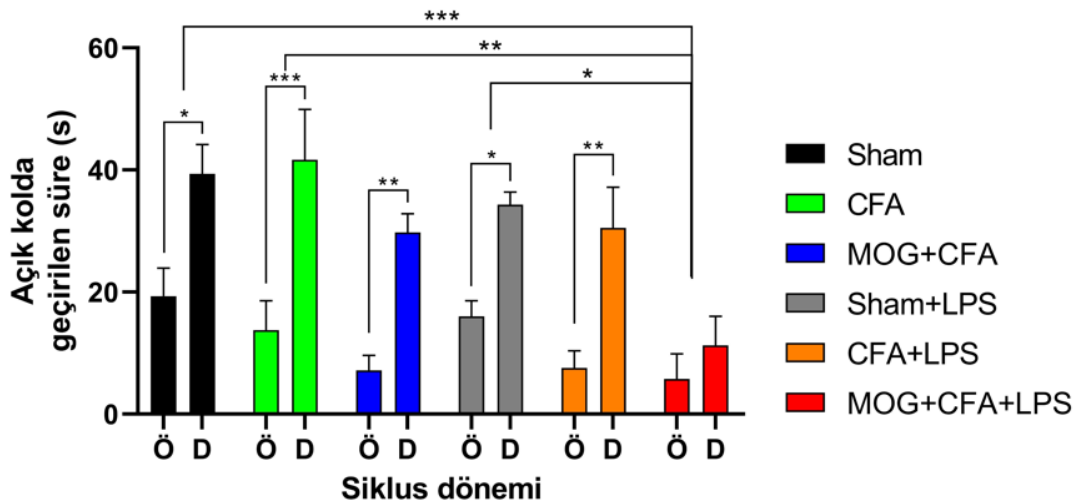
Tekrarlayan davranış deneyleri haricinde tek defaya mahsus olarak değerlendirilen davranış deneyleri de yapıldı. Bu deneyler protokole göre 6, 8 ve 10. haftalarda gerçekleştirildi. Sıçanların anksiyete-benzeri duygudurumları için açık kolda geçirilen süre değişkeni incelendi. Bu incelemeler yapılırken dişi sıçanların siklus döneminden etkilenebileceği bilinen davranışları, siklus değişkenine göre de analiz edildi. Deney haftasından bağımsız olarak Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla açık kolda geçirdiği süre ortalaması 30,1 s; 26,7 s; 18,5 s; 25,2 s; 19,0 s ve 7,9 s olarak ölçüldü. Sıçanların anksiyete-benzeri duygudurumları zamansal olarak gruplar arasında değişiklik göstermezken $\{F(10,55)=0,3765; p=0,9517\}$ sadece grup etkisi farklı bulundu $\{F(5,55)=3,80; p<0,01\}$. MOG+CFA+LPS grubunun açık kolda geçirdiği süre Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarından daha düşük bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,05$; $<0,01$; Şekil 4.9A). Her hafta verisi kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında ise Sham grubuna göre sadece 6. haftada MOG+CFA+LPS grubunda açık kolda geçirilen süre de düşüklük belirlendi ($p<0,01$). Oluşturduğumuz model grubu (MOG+CFA+LPS) özellikle 6. haftada olmak üzere anksiyete-benzeri duygudurum geliştirdi. Sıçanların açık kolda geçirdiği süre deney haftasından bağımsız olarak siklus dönemleri östrus ve diöstrus ayrımı ile değerlendirildiğinde ise benzer şekilde MOG+CFA+LPS grubunun açık kolda geçirilen süresi Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarından daha düşüktü (sırasıyla p değerleri: $<0,001$; $<0,05$; $<0,01$). Ayrıca deney haftasından bağımsız olarak grupların kendi içinde östrus ve diöstrus

siklus dönemleri kıyaslandığında; MOG+CFA+LPS grubu haricindeki 5 grubun tamamında östrus dönemindeki sıçanların açık kolda geçirilen süresinin diöstrus dönemindekinden daha düşük olduğu bulundu ($p<0,05$; Şekil 4.9B). Sıçanlar MOG+CFA+LPS grubu haricinde östrus döneminde daha yüksek anksiyete-benzeri duygudurum gösterdi.

A.



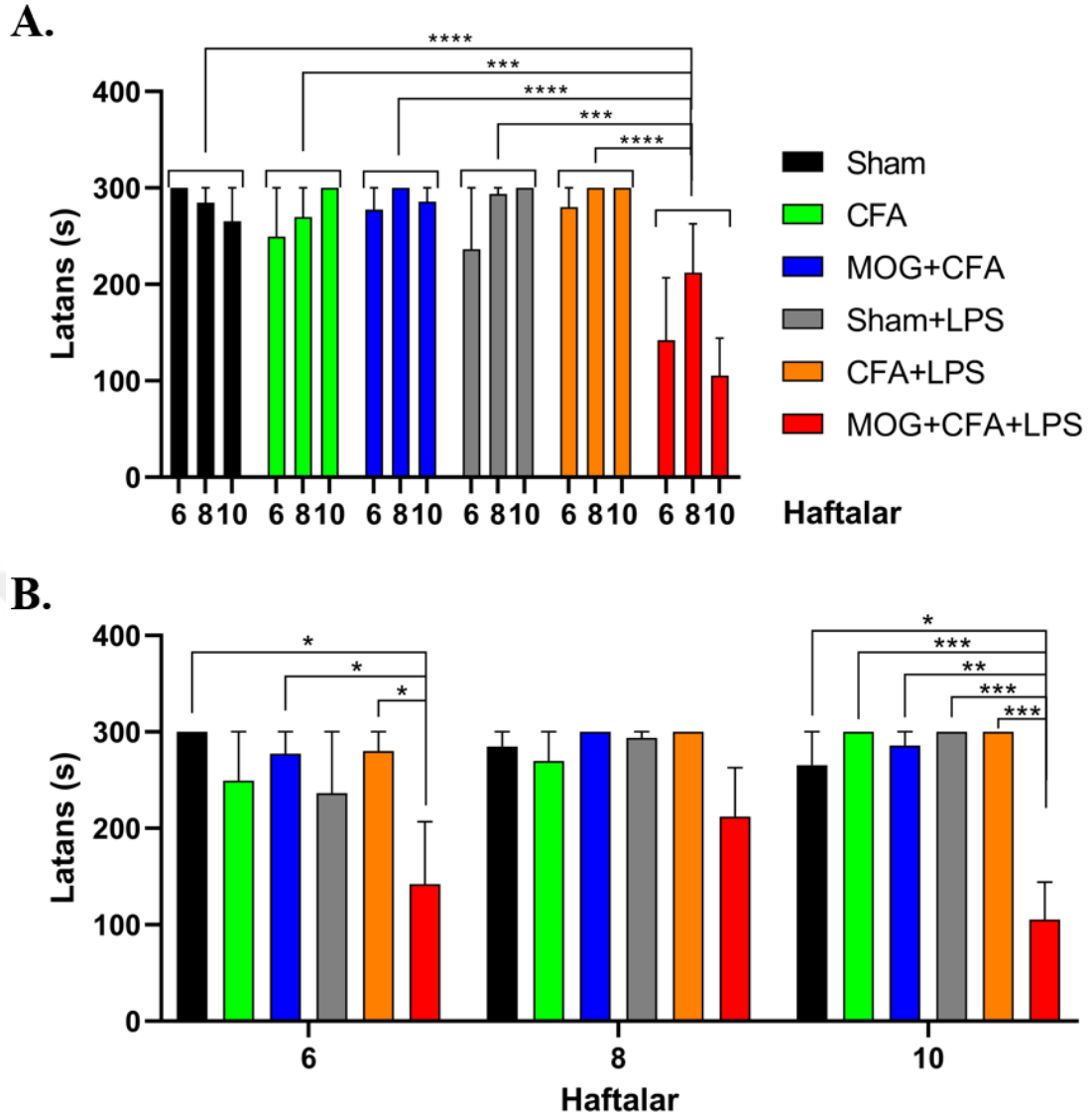
B.



Şekil 4.9. Yükseltilmiş artı testinde gruplara göre açık kolda geçirilen süre değerleri. A. Grupların 6, 8 ve 10. haftalarda açık kolda geçirdikleri süreler. MOG+CFA+LPS grubunun açık kolda geçirilen süresi Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarından düşüktü (** $p<0,01$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$). Haftalık olarak Sham grubuna göre yapılan kıyasta MOG+CFA+LPS grubunun açık kolda geçirdiği süre sadece 6.

haftada daha düşük bulundu ($##p<0,01$). **B.** Grupların siklus dönemine göre açık kolda geçirdikleri süreler. MOG+CFA+LPS grubunun açık kolda geçirilen süresi Sham, CFA ve Sham+LPS grubundan düşüktü ($***p<0,001$; $**p<0,01$; $*p<0,05$). Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının östrus döneminde açık kolda geçirdiği süreler diöstrus dönemindekinden daha düşük belirlendi ($*p<0,05$; $***p<0,001$; $**p<0,01$; $*p<0,05$; $**p<0,01$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Bar grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına n=12 hafta başına n=4’tür. Haftalık gruplar arası analizler için ise “Kruskal-Wallis testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların bar grafiğinin üstüne “#” simgesi konulmuştur. Bu simge istatistiksel anlamlılığın *p* değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; Ö: Östrus dönemi; D: Diöstrus dönemi)

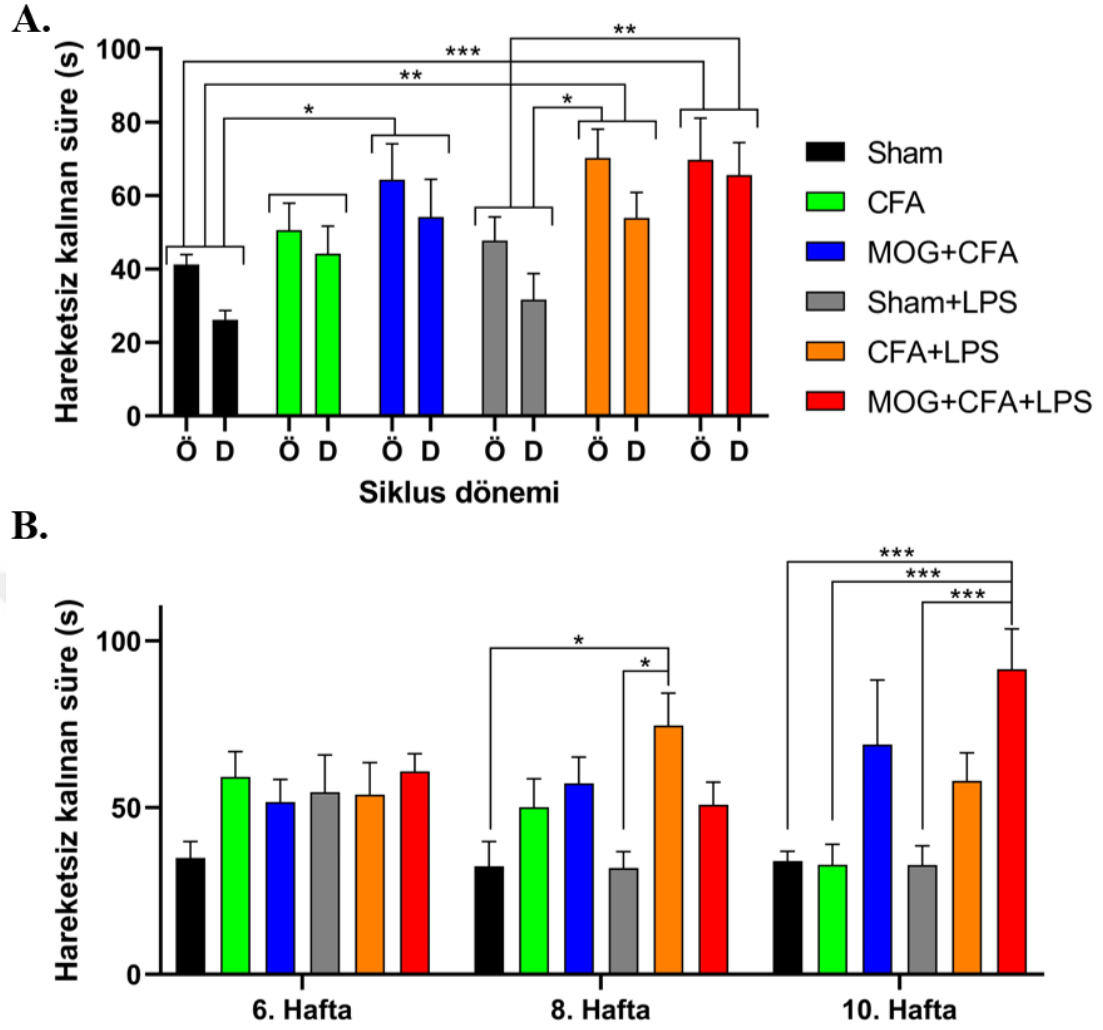
Sıçanların hafıza durumunu değerlendirmek için edilgen kaçınma testinden elde edilen latans değişkeni kullanıldı. Deney haftasından bağımsız olarak Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla latans ortalaması 283,4 s; 273,1 s; 287,8 s; 276,8 s; 293,4 s ve 153,2 s olarak hesaplandı. Sıçanların hafıza durumları zamansal olarak gruplar arasında değişiklik göstermezken $\{F(10,54)=0,7980$; $p=0,6309\}$ sadece grup etkisi farklı bulundu $\{F(5,54)=8,396$; $p<0,0001\}$. MOG+CFA+LPS grubunun latansı Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarından daha düşük bulundu (sırasıyla *p* değerleri: $<0,0001$; $<0,001$; $<0,0001$; $<0,001$; $<0,0001$; Şekil 4.10A). Her hafta verisi kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında ise MOG+CFA+LPS grubunun 6. hafta latansı Sham, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarının latansından düşük belirlendi ($p<0,05$). 10. haftada ise MOG+CFA+LPS grubu diğer tüm gruplardan daha düşük latans değerine sahipti ($p<0,05$; Şekil 4.10B). Oluşturduğumuz model grubunda (MOG+CFA+LPS) özellikle 6. ve 10. haftada olmak üzere hafıza etkilenimi/kaybı saptandı.



Şekil 4.10. Edilgen kaçınma testinde gruplara göre latans süreleri. A. Grupların 6, 8 ve 10. haftalardaki latans süreleri. MOG+CFA+LPS grubunun genel analize göre latansı diğer tüm gruplardan düşük bulundu ($***p<0,001$ ve $****p<0,0001$). **B.** Haftalara göre grupların latans sürelerinin karşılaştırılması. MOG+CFA+LPS grubunun 6. haftada latans süresi Sham, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarından daha düşük belirlendi ($*p<0,05$). Aynı grubun 10. haftadaki latans süresi ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS şeklindeki diğer tüm gruplardan daha düşüktü (sırasıyla p değerleri $*p<0,05$; $***p<0,001$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $***p<0,001$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına n=12 hafta başına n=4’tür. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA

testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

Sıçanların depresyon-benzeri duygudurumlarının değerlendirmesi için Porsolt zorunlu yüzme testinde hareketsiz kalınan süreleri belirlendi. Deney haftasından bağımsız olarak Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla hareketsiz kalınan süre ortalaması 33,7 s; 47,4 s; 59,3 s; 39,7 s; 62,1 s ve 67,7 s olarak hesaplandı. Sıçanların depresyon-benzeri duygudurumları hem zamansal olarak gruplar arasında { $F(10,54)=2,496$; $p=0,0153$ } hem de sadece grup etkisi açısından farklı bulundu { $F(5,54)=6,997$; $p<0,0001$ }. MOG+CFA; CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının hareketsiz kalma süresi Sham grubundan daha yüksek belirlendi (sırasıyla p değerleri: $<0,05$; $<0,01$; $<0,001$; Şekil 4.11A). MOG+CFA grubu hariç diğer iki grubun hareketsiz kalma süresi benzer şekilde Sham+LPS grubundan da yüksekti ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Grup içerisinde östrus ve diöstrus siklusları açısından kıyaslama yapıldığında ise herhangi bir grupta fark belirlenmedi. Haftalara göre grupların hareketsiz kalma süreleri kıyaslandığında 8. haftada CFA+LPS grubu; 10. haftada ise MOG+CFA+LPS grubu daha yüksek ortalama gösterdi ($p<0,05$; Şekil 4.10B). 6. haftada ise gruplar arasında hareketsiz kalınan süre açısından fark bulunmadı. Oluşturduğumuz model grubu (MOG+CFA+LPS) özellikle 10. haftada olmak üzere depresyon-benzeri duygudurum değişikliği gösterdi ve hafta ilerledikçe depresyon-benzeri duygudurumun arttığı belirlendi. Ek olarak CFA+LPS grubu da 8. hafta özelinde depresyon-benzeri duygudurum geliştirdi. Fakat bu durum 6 ve 10. haftalarda belirgin değildi.



Şekil 4.11. Porsolt zorunlu yüzme testinde gruplara göre hareketsiz kalınan süreler. A. Grupların siklus dönemine göre hareketsiz kalma süreleri ve grupların genel karşılaştırması. 6 grubun ikili kombinasyonları arasında yapılan analizde MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının hareketsiz kalma süreleri Sham grubuna göre yüksek bulundu (sırasıyla p değerleri: $* < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$). Ek olarak CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının hareketsiz kalma süreleri Sham+LPS grubuna göre yüksekti ($*p < 0,05$ ve $**p < 0,01$). Grupların kendi içinde siklus dönemine göre fark belirlenmedi. **B.** Haftalara göre grupların hareketsiz kalınan sürelerinin karşılaştırılması. CFA+LPS grubunun hareketsiz kalma süresi 8. haftada Sham ve Sham+LPS gruplarından yüksek hesaplandı ($*p < 0,05$). 10. haftada ise MOG+CFA+LPS grubunun hareketsiz kalma süresi Sham, CFA ve Sham+LPS gruplarından daha yüksek bulundu ($***p < 0,001$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler

ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına n=12 hafta başına n=4'tür. Siklus gruplarına göre analiz yapılırken aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Sidak testi”; haftalık gruplar arası analizler için ise *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

4.5. Modifiye DOE Skoru İçin Açık Alan Arena Testi Parametrelerinin Belirlenmesi Bulguları

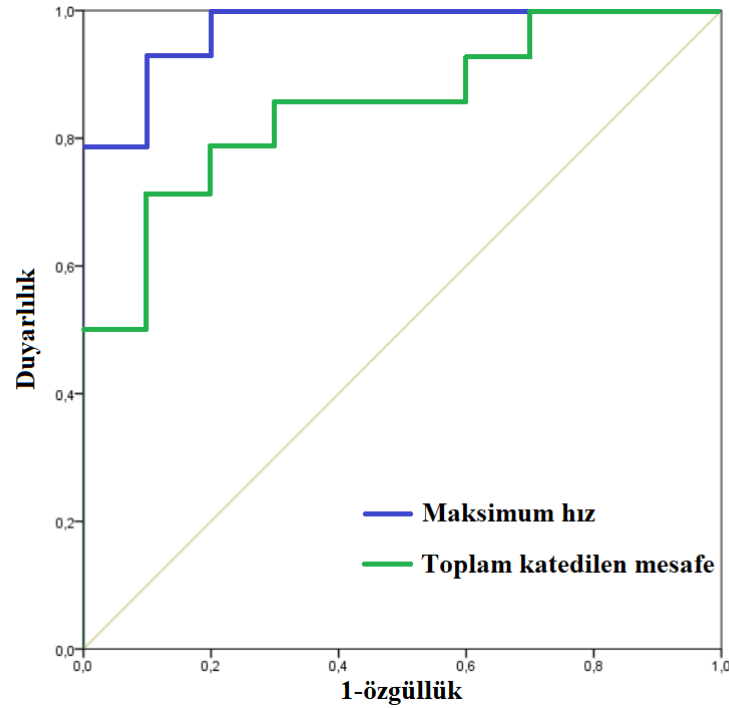
Çalışmamızda sıçanların progresif sürecini takip etmek için rutin kullanılan DOE skorunun yanında “Modifiye DOE skoru” geliştirildi. Bu skor için hafif motor bozuklukları/etkilenmeleri ortaya koyabilecek açık alan arena testi parametreleri belirlenmeye çalışıldı. Bu bağlamda açık alan arena testinde görüntü işleme programı tarafından hesaplanan toplam katedilen mesafe, ortalama hız, sınır çizgilerinin geçilme sayısı, mutlak dönüş açısı, maksimum hız, saat yönünde rotasyon sayısı, saat yönünün tersi rotasyon sayısı, toplam rotasyon sayısı ve aynı parametrelerin merkez ile kenar alanlar için hesaplanan ölçüm değerlerinin, sıçanların motor tutulumunu öngörmek ve belirlemekteki yeri araştırıldı. Modelin oluşturulması deney protokolünün ilk 3 haftasında MOG+CFA enjeksiyonu yapılan iki gruptaki (MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS grupları) sıçanlar bilinen rutin model olarak ele alındı. 1. haftada tüm sıçanların DOE skoru 0 iken açık alan arena testinde elde edilen ölçümler ile 3 haftalık süreçte ilgili sıçanın maksimum belirlenen DOE skoru arasında korelasyon analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda 1. hafta açık alan arena testinde ölçülen maksimum hız parametresi ile 3 haftalık süreçte belirlenen maksimum DOE skoru arasında yüksek düzeyli, zıt yönlü ilişki belirlendi ($r=-0,714$; $p<0,001$). Diğer parametrelerde ise ilişki bulunmadı. Bu sonuç ile açık alan arena testinde ölçülen maksimum hız parametresinin sıçanların DOE skorunu predikte edebileceği düşünüldü. Sıçanların ölçülen maksimum hız değeri düştükçe DOE skorları artmakta idi. Toplam katedilen mesafe parametresinin de lokomasyon değerlendirmek için kullanıldığı bilinmekteydi. İki parametrenin de düşüşü motor etkilenme ve/veya DOE skoru artışı ile ilişkili olarak saptandı.

Modifiye DOE skorunda açık alan arena testi parametrelerinin kategorik olarak puanlamada yer alması için eşik değer (*cut-off value*) belirlenmesi yapıldı. Eşik değer belirlenmesi için sıçanlar iki gruba ayrıldı. Birinci grup 2. haftada açık alan arena testi yapılan günde belirlenen DOE skoru 0 olanlar iken ikinci grup DOE skoru >0 olanlar olarak ayarlandı. İki grup arasında ikinci hafta açık alan arena testi ölçümlerinde belirlenen maksimum hız ve toplam katedilen mesafe parametreleri kıyas edildi. DOE skoru 0'dan büyük olan sıçanların toplam katedilen mesafesi ve maksimum hızı DOE skoru 0 olan sıçanlara göre daha düşük bulundu ($p<0,05$; Tablo 4.2). Eşik değer belirlenmesi için ise ROC analizi yapıldı. Toplam katedilen mesafe değişkeni için eğri altında kalan alan 0,85 hesaplandı ($p=0,004$). %71,4 duyarlılık ve %90 özgüllük değeri ile toplam katedilen mesafe için 29,32 m eşik değeri belirlendi. Maksimum hız için ise eğri altında kalan alan 0,97 idi ($p<0,001$). %92,9 duyarlılık ve %90 özgüllük değeri ile maksimum hız değişkeni için 0,37 m/s eşik değeri belirlendi. Duyarlılık ve özgüllük değerlerini gösteren görsel Şekil 4.12'de paylaşılmıştır.

Tablo 4.2. Açık alan arena testi parametrelerinin DOE skoruna göre kıyası

Değişken	Grup 1 (DOE=0 olanlar)	Grup 2 (DOE>0 olanlar)	İstatistiksel analiz*
Toplam katedilen mesafe (m)	37,76±8,02	26,99±7,28	t=6,191 p<0,001
Maksimum hız (m/s)	0,41±0,028	0,34±0,026	t=3,427 p=0,002

*Grupların normallik dağılım analizi “Shapiro-Wilk testi” ile yapılmıştır. İki grubun ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında parametrik “bağımsız örneklem t testi” kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak paylaşılmıştır.

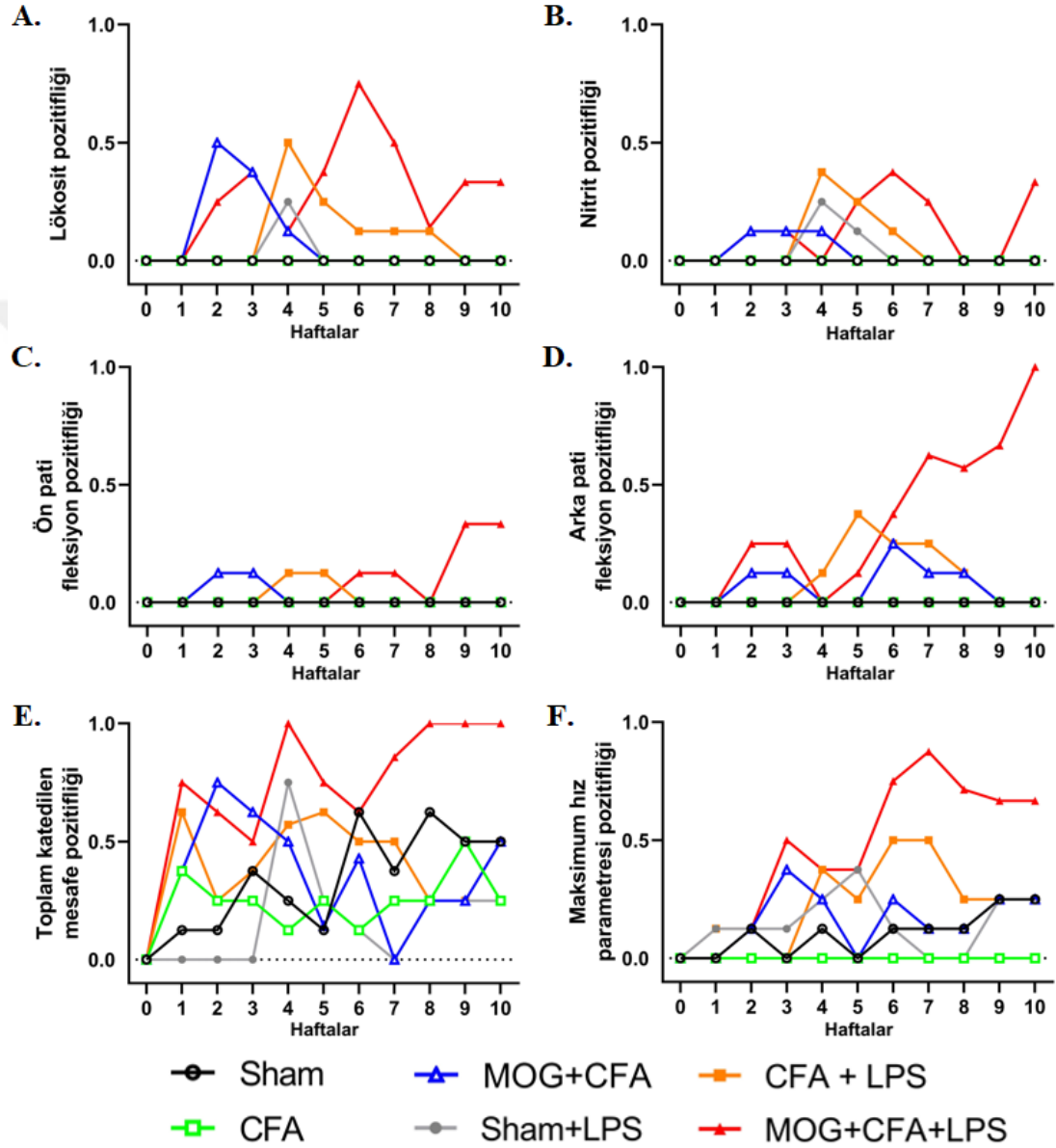


Şekil 4.12. Açık alan arena testi parametreleri için yapılan ROC analizi görseli. (Şekil görseli analiz yapılan SPSS programından alınmıştır. Mavi çizgi maksimum hız parametresini yeşil çizgi ise toplam katedilen mesafe parametresini göstermektedir.)

4.6. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Sıçanların Modifiye DOE Skoru

Sıçanlar rutin DOE skoru ile günlük olarak takip edildi. Fakat genitoüriner sistem tutulumu, kaba motor tutulum haricinde görülen ince motor tutulumlar ve progresif nörolojik bulgular DOE skoru ile takip edilemedi. Bu nedenler ile tarafımızca modifiye DOE skoru geliştirildi. Geliştirilen skorlama parametrelerinin modelin oluşturulması deney gruplarına göre haftalık değişimleri Şekil 4.13'te gösterilmiştir. MOG+CFA+LPS grubunun 6. haftada genitoüriner sistem tutulumu oldukça belirgin bulundu. Sıçanlar kuyruğundan kaldırıldığında ön patilerinin fleksiyona gelme durumu oldukça nadir görüldü. Aynı test sırasında arka patilerin fleksiyona gelme durumu ise özellikle oluşturulan model grubunda (MOG+CFA+LPS) olmak üzere yüksek oranda pozitif belirlendi. Açık alan arena testinden elde edilen parametrelerden toplam katedilen mesafe pozitifliği Sham grupları da dahil olmak üzere çoğu grupta saptanmasına rağmen MOG+CFA+LPS grubunda daha yüksek bulundu. Maksimum hız değişkeni ise modelin 6. haftası

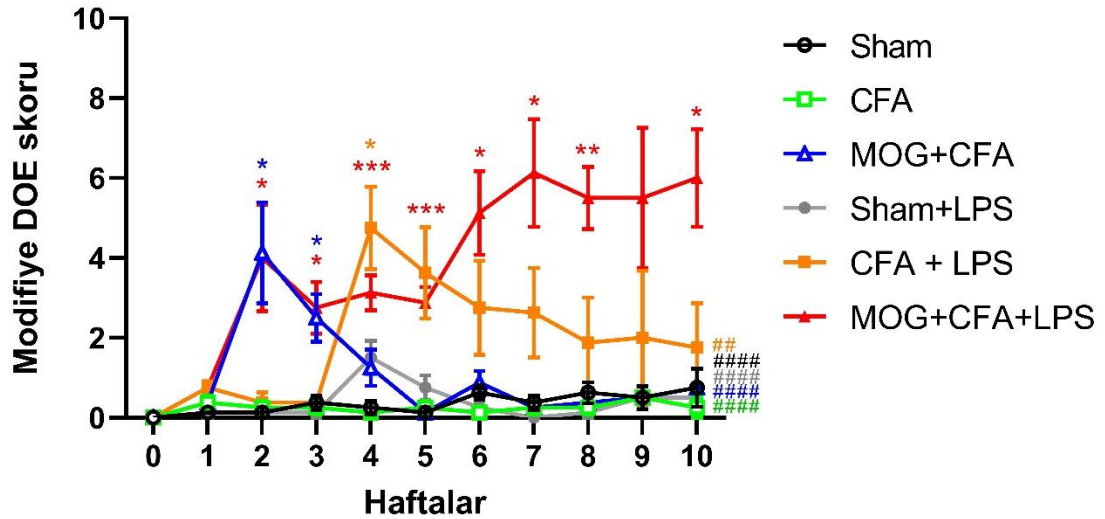
döneminde belirgin pozitif olarak belirlendi. Modifiye DOE skoruna eklenmesi planlanan parametreler oluşturulan modelin özellikle 6. haftasında olmak üzere uzun dönemde progresif kronik patolojiyi belirlemede etkili bulundu.



Şekil 4.13. Modifiye DOE skoru parametrelerinin ayrı ayrı gösterimi. A. Lökosit pozitifliğinin gruplara göre haftalık seyri. **B.** Nitrit pozitifliğinin gruplara göre haftalık seyri. **C.** Ön pati fleksiyonu pozitifliğinin gruplara göre haftalık seyri. **D.** Arka pati fleksiyon pozitifliğinin gruplara göre haftalık seyri. **E.** Toplam katedilen mesafe pozitifliğinin gruplara göre haftalık seyri. **F.** Maksimum hız parametresi pozitifliğinin

gruplara göre haftalık seyri. (Gösterilen şekiller sadece seyrin belirtilmesi amaçlı olup istatistiksel inceleme yapılmamıştır. Çizgi grafikler yalnızca ortalama değeri göstermektedir. Grup başına n=8'dir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

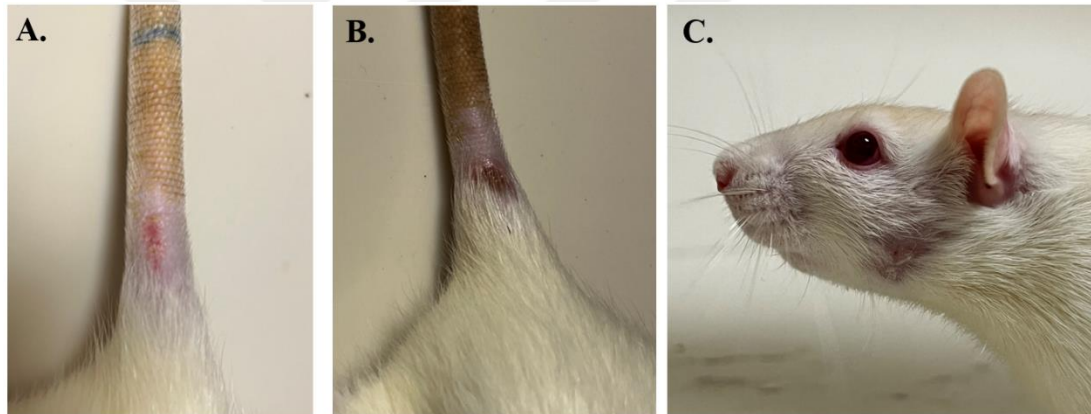
Sıçanların ayrı ayrı belirlenen parametreleri ve bilinen DOE skoru ile birlikte oluşturulan Modifiye DOE skorunun hesaplama yöntemi Tablo 3.3'te ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının tüm deney süresince modifiye DOE skoru ortalaması sırasıyla 0,33; 0,23; 1,05; 0,35; 1,90 ve 3,60 hesaplandı. Zamana bağlı olarak gruplar arasında fark belirlendi { $F(50,372)=6,467$; $p<0,0001$ }. İkili grup karşılaştırmaları sadece model grubu olan MOG+CFA+LPS grubuna karşı yapıldı ve tüm grupların Modifiye DOE skorunun daha düşük olduğu bulundu ($p<0,0001$ ve sadece CFA+LPS grubu için $p<0,01$). Haftalık olarak gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar da Sham grubuna göre yapıldı. MOG+CFA grubunun 2 ve 3. haftada Modifiye DOE skoru Sham grubuna göre yüksek belirlendi ($p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun Modifiye DOE skoru ise Sham grubuna göre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 10. haftalarda daha yüksekti (sırasıyla p değerleri: $<0,05$; $<0,05$; $<0,001$; $<0,001$; $<0,05$; $<0,05$; $<0,01$; $<0,05$; Şekil 4.14). CFA+LPS grubunun Modifiye DOE skoru da sadece 4. haftada Sham grubundan yüksek belirlendi ($p<0,05$). Modifiye DOE skoru ile kronik progresif DOE modeli için patolojinin çeşitli manifestasyonlarını içeren ve kronik süreci ortaya koyabilecek yeni bir skorlama geliştirildi. Oluşturduğumuz model grubunun Modifiye DOE skoru takibi ile kronik süreçte diğer gruplardan belirgin ayrımı sağlandı. Yapılan model ve geliştirilen skor ile 2. haftadan 10. haftaya kadar kronik progresif hastalık modeli ortaya konabildi.



Şekil 4.14. Gruplara göre haftalık Modifiye DOE skoru değişimi. MOG+CFA+LPS grubunun Modifiye DOE skoru ikili grup analizlerinde Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarına ait Modifiye DOE skorundan daha yüksek bulundu (sırasıyla p değerleri: #####<0,0001; #####<0,0001; #####<0,0001; #####<0,0001; ##<0,01). MOG+CFA+LPS grubunun Sham grubuna göre haftalık kıyasında 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 10. haftalarda Modifiye DOE skoru daha yüksek bulundu (sırasıyla p değerleri: *<0,05; *<0,05; ***<0,001; ***<0,001; *<0,05*; <0,05; **<0,01 ve *<0,05). MOG+CFA grubunun Sham grubuna göre haftalık kıyasında 2 ve 3. haftada Modifiye DOE skoru daha fazla idi (*p<0,05). CFA+LPS grubunun Sham grubu ile haftalık kıyasında ise sadece 4. haftada Modifiye DOE skoru daha yüksek bulundu (*p<0,05). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına n=8’dir. Haftalık gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Dunnett testi” kullanılmıştır. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalaması üstüne “*” simgesi konulmuştur. Zamansal olarak grupların ikili karşılaştırmaları MOG+CFA+LPS grubuna kıyasen yapılmıştır ve anlamlı bulunan gruplar için kendi çizgi grafiğinin sonlandığı kısımda kendi grup renginde “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

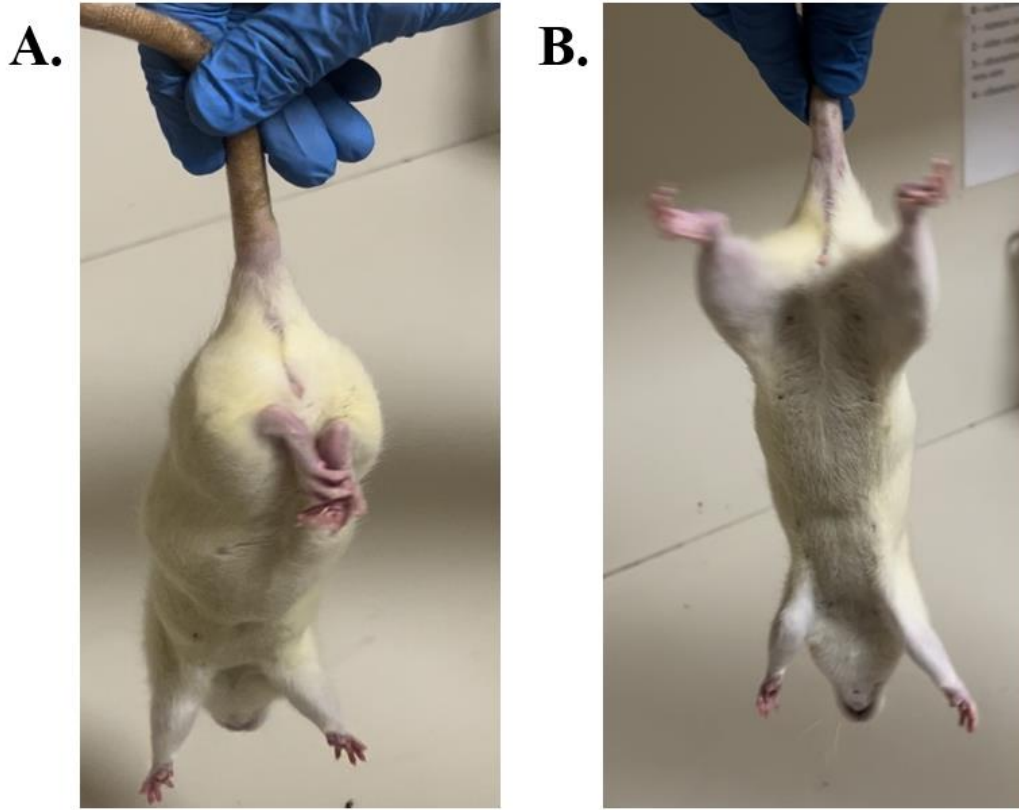
4.7. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Ek Görsel Bulgular

Sıçanların grubuna göre 6, 8 veya 10 haftalık takipleri sırasında belirlenen ek bulguları oldu. İmmünizasyon sonrası enjeksiyon bölgesinde birinci haftada bölgesel kızarıklık ile başlayıp 6-8. haftalara kadar devam edebilen yaklaşık 1 cm'lik kuyruk kökü yarası tespit edildi (Şekil 4.15). Bu yara immünizasyon için MOG+CFA veya yalnızca CFA enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda görüldü ve sıçanların yaklaşık %60'ında geliştiği belirlendi. Kuyruk yarasına ek olarak, sıçanların 2. haftada başlayıp en şiddetli anı 3. haftada belirlenen yama şeklinde bukkal bölgede tüy dökülmesi tespit edildi. Dökülme zemininde hafif kızarıklığın saptandığı sıçanlar oldu. Bu tüy dökülmesi LPS enjeksiyonu yapıldığında 5. haftada; LPS enjeksiyonu yapılmadığında 4. haftada gerilemekte idi. Sıçanların yaklaşık %40'ında tüy dökülmesine rastlandı.



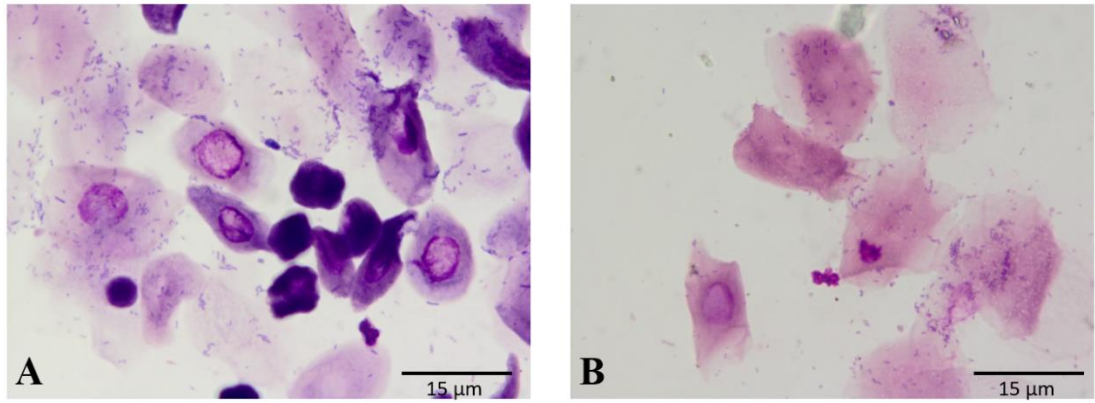
Şekil 4.15. Sıçanların kuyruk yarası ve yama şeklindeki tüy dökülmesi. A. İmmünizasyon enjeksiyonu bölgesindeki yaranın 1. haftadaki durumu. **B.** İmmünizasyon enjeksiyonu bölgesindeki kuyruk yarasının ilerlemiş hali. **C.** Sıçanların bukkal bölgesinde görülen yama şeklindeki tüy dökülmesi alanı.

Bu bulgulara ek olarak sıçanların takip sürecinde kuyruklarından kaldırıldığında özellikle arka patilerinin ekstansiyon yerine fleksiyon yaptığı belirlendi (Şekil 4.16). Bu bulgu Modifiye DOE skoruna parametre olarak da eklendi.



Şekil 4.16. Sıçanların kuyruktan kaldırıldığında arka patilerinin ekstansiyon-fleksiyon durumu. A. Fleksiyon. B. Ekstansiyon.

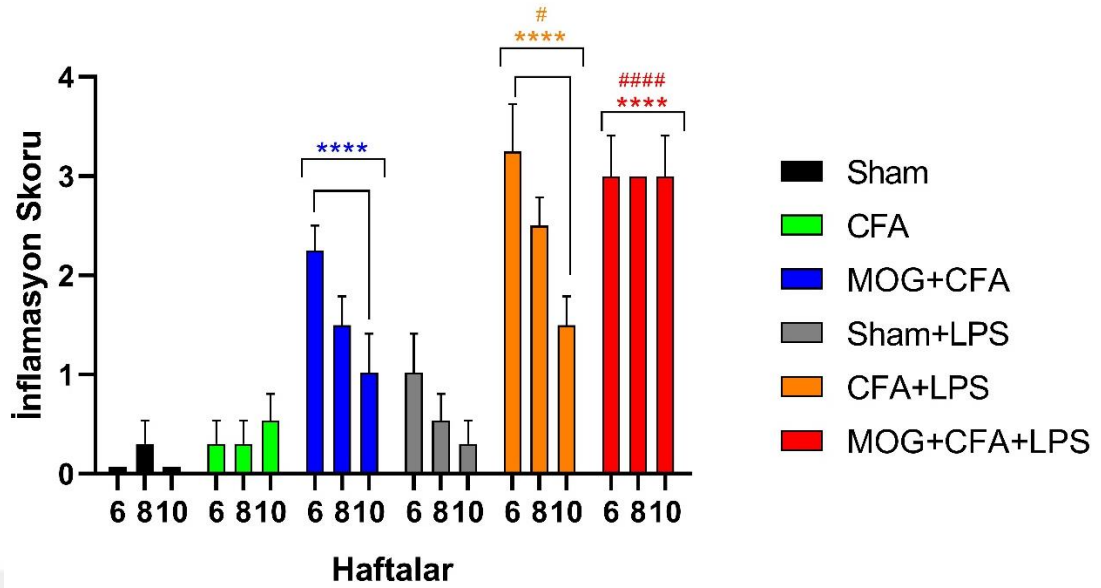
Davranış deneylerinden sonra sıçanların siklus tayini yapıldı ve bu ayırım yapılırken histolojik görüntüler değerlendirildi (Şekil 4.17). Çekirdekli olmayan kornifiye hücreler östrus döneminin karakteristik görüntüsü olarak; lökositlerin olması ise diöstrus döneminin karakteristik görüntüsü olarak değerlendirme yapıldı. Proöstrus veya metöstrus geçişlerinde kornifiye hücrelerin veya çekirdekli epitelyal hücrelerin görünümü değişkenlik gösterebildiğinden dörtlü ayırım yerine ikili ayırım kullanıldı.



Şekil 4.17. Sıçanların siklus tayini sırasında çekilen ışık mikroskobu görüntüleri. A. Diöstrus dönemine ait vajinal yayma görüntüsü. **B.** Östrus dönemine ait vajinal yayma görüntüsü.

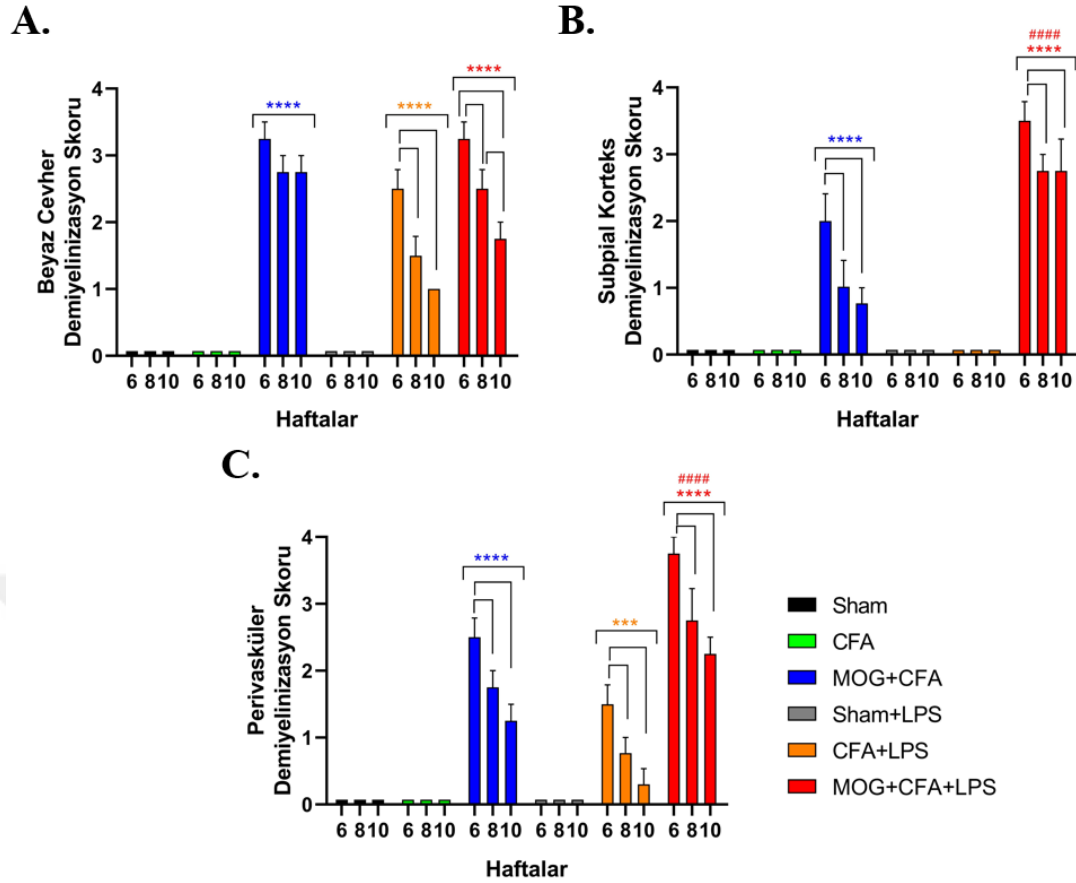
4.8. Modelin Oluşturulması Deneylerinde Histopatolojik Bulgular

Modelin oluşturulması deneyleri sonunda sıçanların dokuları ile ilk olarak histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. HE boyamasında gruplara inflamasyon skoru verildi. Bu skor en düşük 0 en yüksek 5 şeklinde idi. Gruplar arasında yapılan genel kıyaslamada Sham grubuna göre MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının inflamasyon skorunun daha yüksek olduğu belirlendi { $F(5,54)=47,45$; $p<0,0001$; Şekil 4.18}. Bu kıyaslama aynı şekilde MOG+CFA grubuna göre yapıldığında hem CFA+LPS grubunun hem de MOG+CFA+LPS grubunun inflamasyon skoru daha yüksek belirlendi ($p<0,05$ ve $p<0,0001$). MOG+CFA grubunun inflamasyon skoru kendi içerisinde 6. haftada 10. haftadan yüksek bulundu ($p<0,05$). CFA+LPS grubunun da aynı şekilde 10. haftada inflamasyon skoru 6. haftadan daha düşüktü ($p<0,001$). MOG+CFA+LPS grubunun kendi içerisindeki analizde ise haftalar arasında fark bulunmadı. MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarında belirgin inflamasyon saptandı. MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarındaki inflamasyon 10. haftaya ilerleyen süreçte azalırken MOG+CFA+LPS grubunda değişmedi. Ek olarak, MOG+CFA+LPS grubunda daha belirgin olmak üzere CFA+LPS grubuyla beraber MOG+CFA grubundan daha yüksek inflamasyon belirlendi.



Şekil 4.18. Gruplara göre inflamasyonu skoru. Sham grubuna göre MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının inflamasyon skoru daha yüksekti (**** $p<0,0001$). CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının inflamasyon skoru ise MOG+CFA grubuna karşı da daha yüksek belirlendi (# $p<$ ve ##### $p<0,0001$). Grupların 6, 8 ve 10. haftalarındaki durum kıyaslandığında ise MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarında 6. haftaya göre 10. haftada inflamasyon skoru azalırken MOG+CFA+LPS grubunda haftalar arasında herhangi bir değişim saptanmadı ($p<0,05$ ve $p<0,001$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ hafta başına $n=4$ ’tür. Sham grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup bar şekli üstüne “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup bar şekli üstüne “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. Aynı grup içerisinde haftaların kıyasındaki farklar ise sadece ilgili haftalar arasına çizgi konularak gösterilmiştir ve istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesinden bağımsızdır. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

Dokuların HE ve LFB/CV boyanmış preparatlarının birlikte değerlendirilmesi ile subpial korteks, perivasküler alanlar ve beyaz cevher alanları için demiyelinizasyon skoru oluşturuldu. Bu skor en düşük 0 en yüksek 4 şeklinde idi. Beynin beyaz cevherinde gruplar arasında yapılan analizde zamansal olarak Sham grubuna göre MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarında demiyelinizasyon skoru daha yüksek bulundu { $F(10,54)=4,511$; $p<0,0001$; Şekil 4.19A}. Subpial korteks alanlarında gruplar arasında yapılan analizde MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarında demiyelinizasyon skoru Sham grubuna göre daha yüksek belirlendi { $F(5,54)=105,8$; $p<0,0001$; Şekil 4.19B}. Perivasküler alanlarda gruplar arasında yapılan analizde zamansal olarak MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının demiyelinizasyon skoru Sham grubunun demiyelinizasyon skoruna göre daha yüksek saptandı { $F(10,54)=3,243$; $p=0,0024$; Şekil 4.19C}. MOG+CFA+LPS grubunun demiyelinizasyon skoru MOG+CFA grubundan subpial kortekste ve perivasküler alanlarda daha yüksek iken ($p<0,0001$) beyaz cevherde benzer saptandı. MOG+CFA grubunun kendi içerisinde haftalar arasındaki kıyasında subpial korteks ve perivasküler alanlarda 8 ve 10. haftalarda 6. haftadan daha düşük bulundu ($p<0,05$). CFA+LPS grubunun kendi içerisinde haftalar arasındaki kıyasında beyaz cevher ve perivasküler alanlarda 8 ve 10. haftalarda 6. haftadan daha düşük bulundu ($p<0,05$). CFA+LPS grubunun subpial korteks demiyelinizasyon skoru 0 olarak belirlendi. MOG+CFA+LPS grubunun kendi içerisinde haftalar arasında yapılan kıyas analizinde hem beyaz cevher hem subpial korteks hem de perivasküler alanlarda 10. haftada 6. haftaya göre demiyelinizasyon skoru düşük olarak saptandı ($p<0,05$). Ek olarak beyaz cevherde 6, 8 ve 10. haftalarda birbiri arasında anlamlı olacak şekilde düşüş belirlendi ($p<0,05$). Demiyelinizasyon skorunda tüm alanlarda Sham, CFA ve CFA+LPS grupları toplam olarak 0 skorunda saptandı. Bu gruplarda zamandan bağımsız olarak demiyelinizasyon belirlenmedi. CFA+LPS grubunda beyaz cevher ve perivasküler alanlarda ise özellikle 6. haftada demiyelinizasyon belirlenirken 10. haftada bu demiyelinizasyon neredeyse tamamen geriledi. Beyaz cevher demiyelinizasyonu hem rutin modelde hem de oluşturduğumuz modelde benzer bulunurken subpial korteks ve perivasküler alanlarda oluşturduğumuz model daha üstün bulundu.



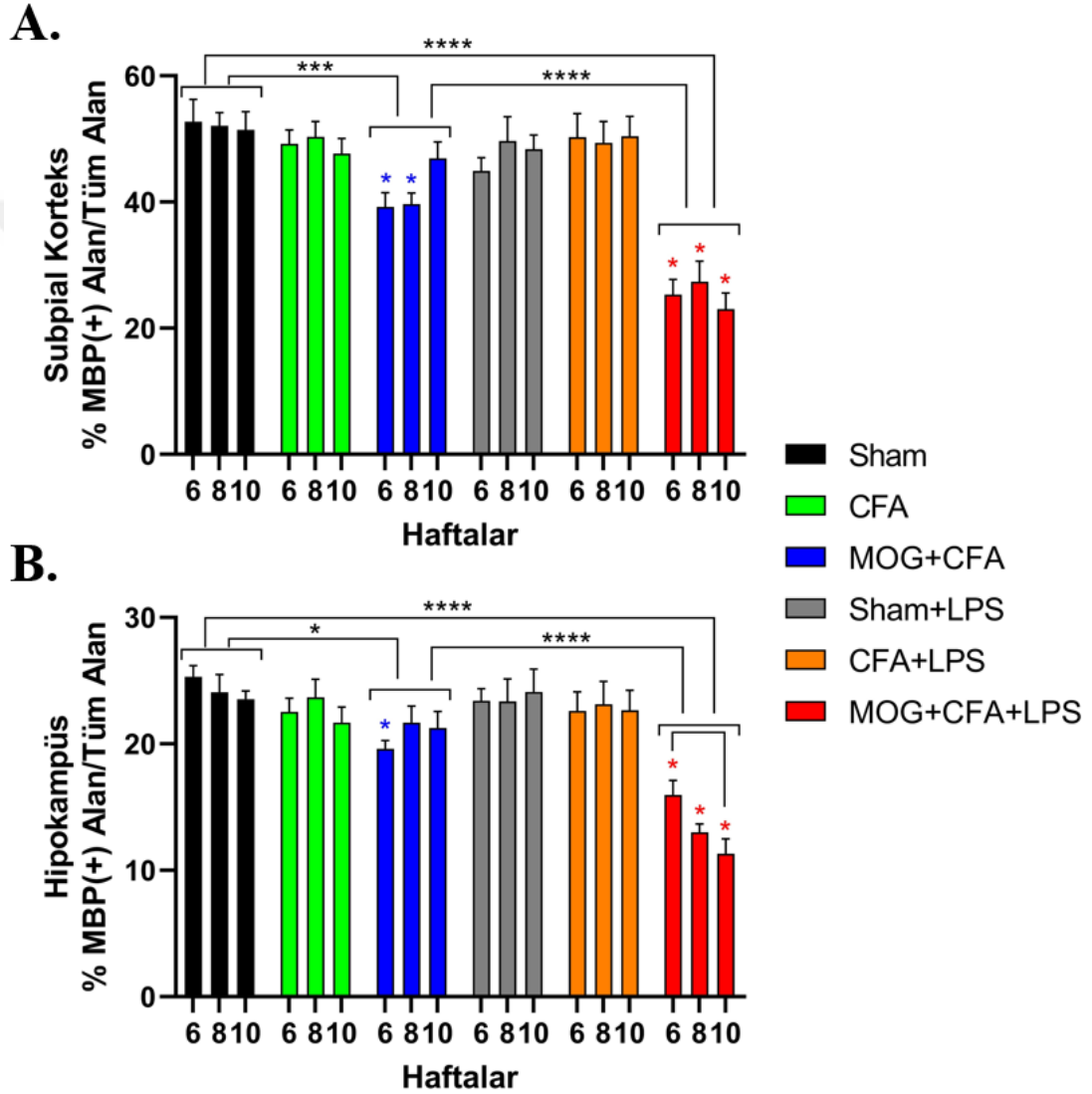
Şekil 4.19. Gruplara göre demiyelinizasyon skoru. A. Gruplara göre haftalık beyaz cevher demiyelinizasyon skoru değişimi. Sham grubunun demiyelinizasyon skoruna göre MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının demiyelinizasyon skoru beyaz cevherde daha yüksek belirlendi (**** $p<0,0001$). CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının 8 ve 10. haftada demiyelinizasyon skoru 6. haftadan daha düşüktü ($p<0,05$). MOG+CFA+LPS grubunun 10. hafta demiyelinizasyon skoru ek olarak 8. hafta skorundan da düşük bulundu ($p<0,05$). **B.** Gruplara göre haftalık subpial korteks demiyelinizasyon skoru değişimi. Sham grubunun demiyelinizasyon skoruna göre MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının subpial kortekste demiyelinizasyon skoru daha yüksek belirlendi (**** $p<0,0001$). MOG+CFA+LPS grubunun demiyelinizasyon skoru MOG+CFA grubuna göre de yüksek bulundu (#### $p<0,0001$). MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının demiyelinizasyon skoru 8 ve 10. haftalarda 6. haftadan daha düşüktü ($p<0,05$). **C.** Perivasküler alanlarda Sham grubunun demiyelinizasyon skoruna göre MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının demiyelinizasyon skoru daha yüksek belirlendi

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$). Aynı gruplarda demiyelinizasyon skoru 8 ve 10. haftalarda 6. haftadan daha düşük belirlendi ($p<0,05$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ hafta başına $n=4$ ’tür. Sham grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi rengine göre grup bar şekli üstüne “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi rengine göre grup bar şekli üstüne “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. Aynı grup içerisinde haftaların kıyasındaki farklar ise sadece ilgili haftalar arasına çizgi konularak gösterilmiştir ve istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesinden bağımsızdır. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

4.9. Modelin Oluşturulması Deneylerinde İmmünoperoksidaz İnceleme Bulguları

Histopatolojik değerlendirmelere ek olarak demiyelinizasyonun kantifiye edilmesi için miyelin temel proteini (MBP) boyaması yapıldı. Gri cevher alanlarından subpial korteks ve hipokampus değerlendirildi. Sham grubunda haftadan bağımsız olarak subpial kortekste ortalama MBP(+) boyanma yüzdesi 52,1 iken hipokampüste aynı yüzde 24,3 olarak hesaplandı. Subpial kortekste MBP(+) boyanma yüzdesi için gruplar arasında yapılan karşılaştırmada MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının Sham grubundan MOG+CFA+LPS grubunun da MOG+CFA grubundan daha düşük boyanma yüzdesine sahip olduğu olduğu bulundu ($F(5,54)=38,26$; $p<0,0001$; Şekil 4.20A}. Hipokampus için yapılan analizin sonuçları da aynı şekilde belirlendi ($F(5,54)=29,1$; $p<0,0001$; Şekil 4.20B}. Subpial korteksinde MBP(+) boyamasında düşüş gözlenen MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının Sham grubunun aynı haftasına göre kıyasında MOG+CFA grubu için 6 ve 8. haftalarda; MOG+CFA+LPS grubunun ise tüm haftalarında düşüş belirlendi ($p<0,05$). Hipokampus için yapılan aynı analizde sadece MOG+CFA grubunun 8. haftasında Sham grubunun aynı haftasından daha düşük belirlenen MBP(+) boyanma yüzdesi durumu ortadan kalktı ($p<0,05$). Ek olarak MOG+CFA+LPS grubunun hipokampus MBP(+) boyanma

yüzdesi 10. haftada 6. haftadan daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Beynin gri cevher alanlarında MOG+CFA grubunda özellikle 6. haftada demiyelinizasyon görüldü fakat MOG+CFA+LPS grubunda tüm haftalarda bu demiyelinizasyon daha belirgin halde idi. Oluşturulan modelde hipokampüste belirlenen demiyelinizasyon 10. haftada daha da derinleşmiş olarak saptandı.

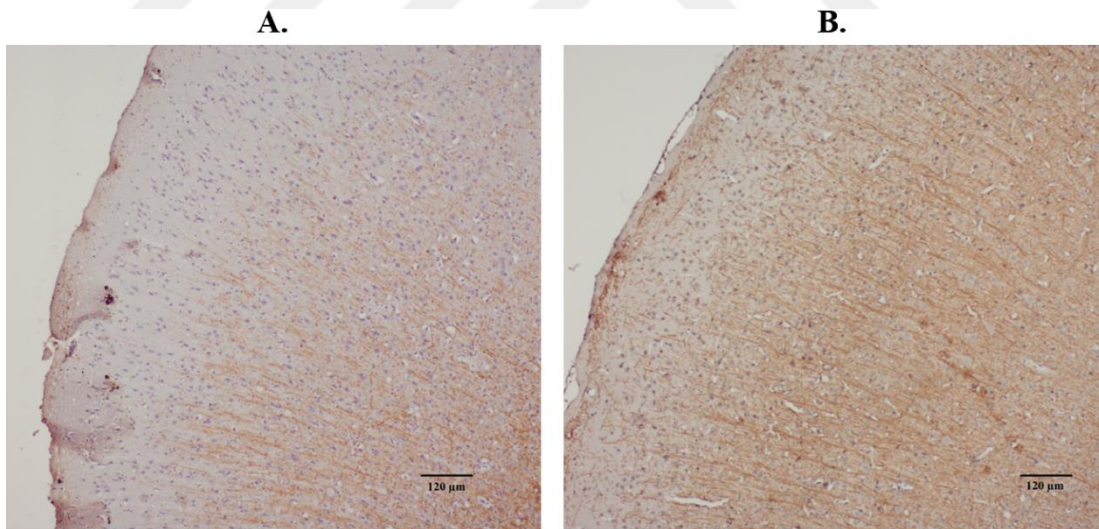


Şekil 4.20. Gri cevher alanlarının MBP(+) boyanma yüzdesi. A. Gruplara göre subpial korteksin haftalık MBP(+) boyanma yüzdesi. Gruplar arasında yapılan genel analizde MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının MBP(+) boyanma yüzdesi Sham grubunun boyanma yüzdesinden düşük bulundu ($***p<0,001$ ve $****p<0,0001$). MOG+CFA grubuna göre yapılan kıyasta ise MOG+CFA+LPS

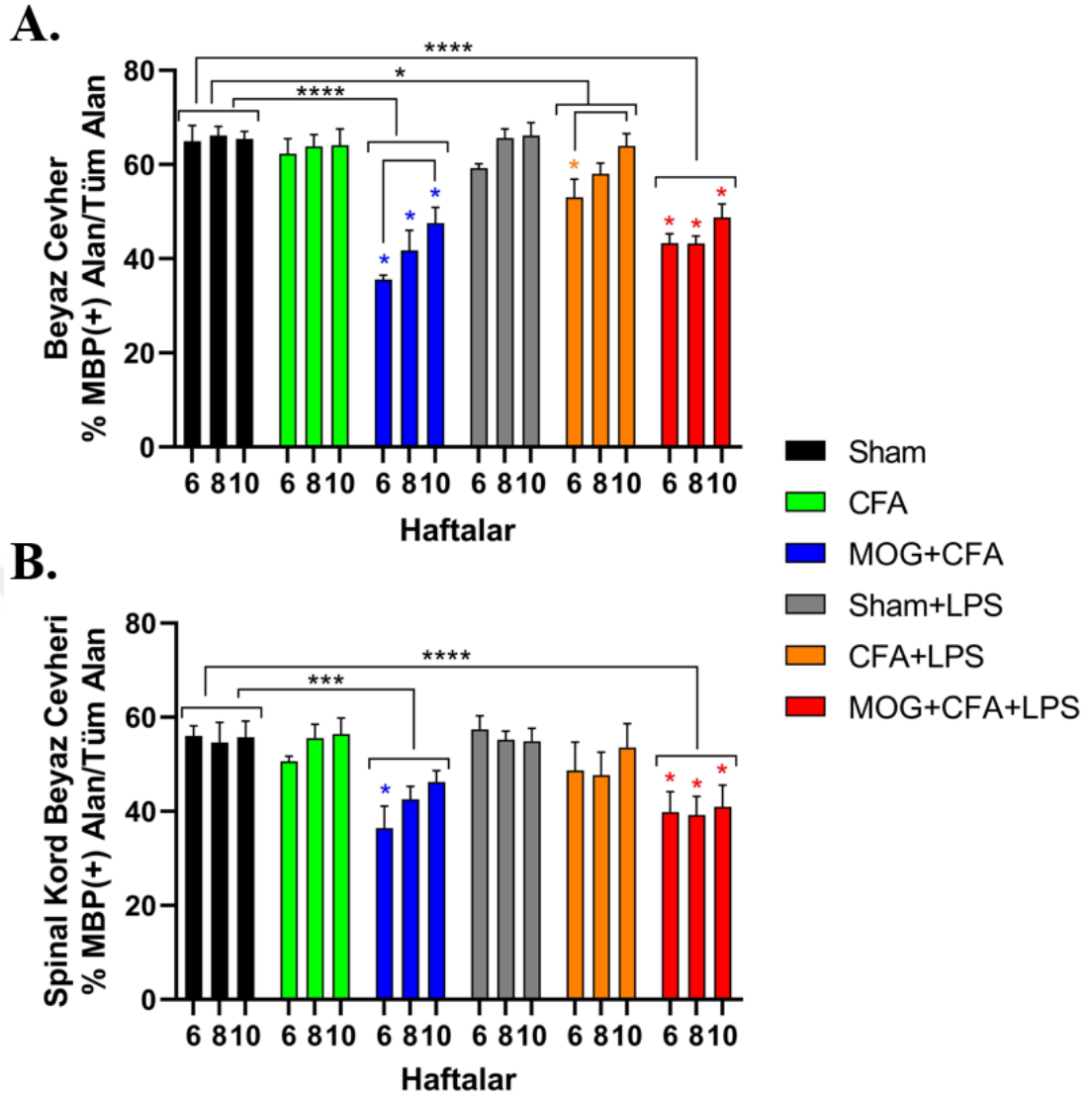
grubunun MBP(+) boyanma yüzdesi daha düşüktü (**** $p<0,0001$). 6, 8 ve 10. haftalar kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında MOG+CFA grubu 6 ve 8. haftada; MOG+CFA+LPS grubu ise tüm haftalarda Sham grubundan daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesine sahip bulundu (* $p<0,05$). **B.** Gruplara göre hipokampusün haftalık MBP(+) boyanma yüzdesi. Gruplar arasında yapılan genel analizde MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının MBP(+) boyanma yüzdesi Sham grubunun boyanma yüzdesinden daha düşük belirlendi (* $p<0,05$ ve **** $p<0,0001$). MOG+CFA grubuna göre yapılan kıyasta ise MOG+CFA+LPS grubunun MBP(+) boyanma yüzdesi daha düşüktü (**** $p<0,0001$). 6, 8 ve 10. haftalar kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında MOG+CFA grubu 6. haftada; MOG+CFA+LPS grubu ise tüm haftalarda Sham grubundan daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesine sahip bulundu (* $p<0,05$). Gruplar kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında sadece MOG+CFA+LPS grubunun 6 ve 8. haftaları arasında fark belirlendi ve 10. haftada daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesi saptandı ($p<0,05$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ hafta başına $n=4$ ’tür. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup bar şekli üstüne “*” simgesi konulmuştur. Aynı grup içerisinde haftaların kıyasındaki farklar ise sadece ilgili haftalar arasına çizgi konularak gösterilmiştir. İki gösterimde de istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine dikkat edilmemiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

Beynin ve spinal kordun beyaz cevher alanları için de demiyelinizasyon değerlendirmesi yapıldı. Şekil 4.21’de MBP boyamasına ait örnek görseller paylaşılmıştır. Sham grubunda haftadan bağımsız olarak beyin beyaz cevherinde ortalama MBP(+) boyanma yüzdesi 65,5 iken spinal kord beyaz cevherinde aynı yüzde 55,5 olarak bulundu. Beyin beyaz cevherinde MBP(+) boyanma yüzdesi için gruplar arasında yapılan karşılaştırmada MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının Sham grubundan daha düşük boyanma yüzdesine sahip olduğu belirlendi { $F(5,54)=44,56$; $p<0,0001$; Şekil 4.22A}. Spinal kord beyaz cevheri için yapılan analizin sonuçları da aynı şekilde bulundu { $F(5,54)=10,69$; $p<0,0001$; Şekil 4.22B}.

Beyin beyaz cevherinde MBP(+) boyamasında düşüş gözlenen MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının Sham grubunun aynı haftasına göre kıyasında tüm haftalarda düşüş belirlenirken, CFA+LPS grubunun sadece 6. haftasında düşüklük saptandı ($p<0,05$). Spinal kord beyaz cevheri için yapılan aynı analizde ise MOG+CFA grubunun sadece 6. haftasında ve MOG+CFA+LPS grubunun tüm haftalarında Sham grubunun aynı haftasından daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesi belirlendi ($p<0,05$). Spinal kord beyaz cevherinde grupların kendi içerisinde haftalar arasında fark bulunmadı. Beyin beyaz cevher alanlarında MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS grubunun yanında CFA+LPS grubunda da demiyelinizasyon bulundu. MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarındaki demiyelinizasyon haftadan bağımsız iken CFA+LPS grubunda sadece 6. haftada belirgindi. Spinal kord beyaz cevherinde ise beyin beyaz cevherinden farklı olarak CFA+LPS grubunda demiyelinizasyon saptanmadı. Rutin model grubunda spinal kord beyaz cevherindeki demiyelinizasyon 6. haftada belirgin iken oluşturulan model grubunda tüm haftalarda belirgin bulundu.



Şekil 4.21. MBP(+) boyanma preparatlarından örnek görseller. A. Oluşturduğumuz modelin subpial korteksine ait demiyelinize alan görüntüsü. **B.** Sham grubuna ait normal MBP(+) boyanma görüntüsü.

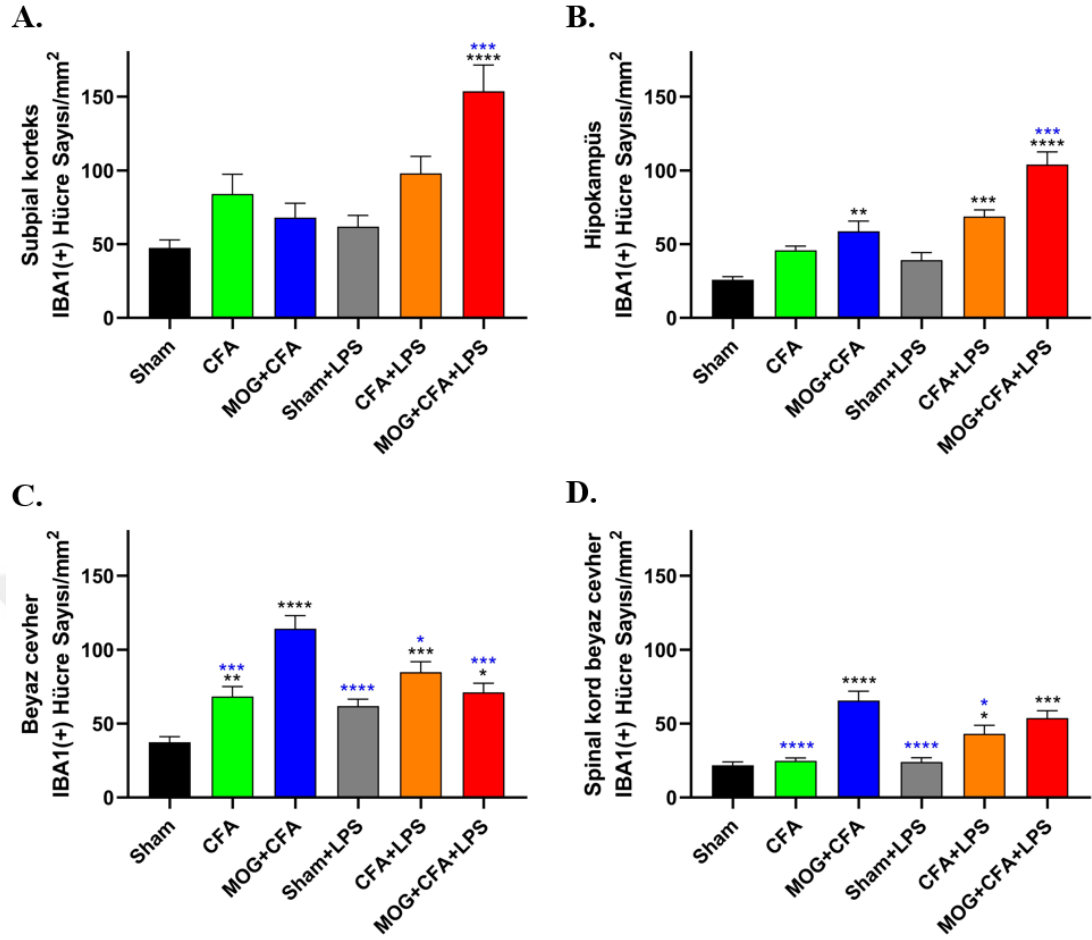


Şekil 4.22. Beyin ve spinal kord beyaz cevher alanlarının MBP(+) boyanma yüzdesi. A. Gruplara göre beyin beyaz cevherinin haftalık MBP(+) boyanma yüzdesi. Gruplar arasında yapılan genel analizde MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının MBP(+) boyanma yüzdesi Sham grubunun boyanma yüzdesinden düşük bulundu (**** $p<0,001$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$). 6, 8 ve 10. haftalar kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında hem MOG+CFA grubu hem MOG+CFA+LPS grubu tüm haftalarda Sham grubundan daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesine sahip bulundu (* $p<0,05$). MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarının MBP(+) boyanma yüzdesi 10. haftada 6. haftadan daha yüksekti ($p<0,05$). **B.** Gruplara göre spinal kord beyaz cevherinin haftalık MBP(+) boyanma yüzdesi. Gruplar arasında yapılan genel analizde MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının MBP(+) boyanma yüzdesi 10. haftada 6. haftadan daha yüksekti ($p<0,05$).

boyanma yüzdesi Sham grubunun boyanma yüzdesinden daha düşük belirlendi (** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$). 6, 8 ve 10. haftalar kendi içerisinde gruplar arasında kıyaslandığında MOG+CFA grubu 6. haftada; MOG+CFA+LPS grubu ise tüm haftalarda Sham grubundan daha düşük MBP(+) boyanma yüzdesine sahip bulundu (* $p<0,05$). (Genel grup kıyasında “iki yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama $\pm$ standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=12$ hafta başına $n=4$ ’tür. Sham grubuna göre haftalık karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların kendi renginde grup bar şekli üstüne “*” simgesi konulmuştur. Aynı grup içerisinde haftaların kıyasındaki farklar ise sadece ilgili haftalar arasına çizgi konularak gösterilmiştir. İki gösterimde de istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine dikkat edilmemiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)

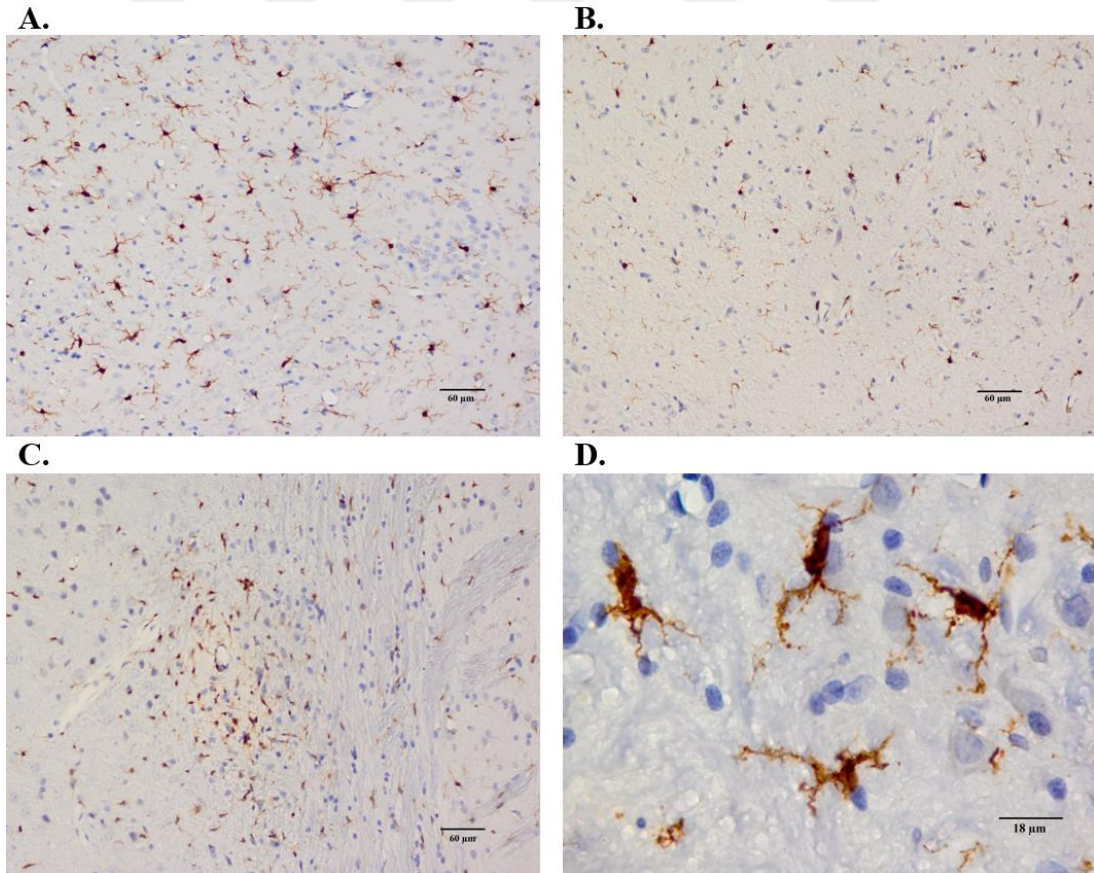
MBP boyamasına ek olarak sıçanların 8. haftada toplanan dokularında IBA1 antijeni ile mikrogliya boyaması yapıldı. Bu boyamada mm^2 ’ye düşen mikrogliya ortalama sayısı Sham grubu için subpial korteks, hipokampus, beyin beyaz cevheri ve spinal kord beyaz cevheri için sırasıyla 47,4; 25,8; 37,4 ve 21,8 olarak hesaplandı. Subpial kortekste gruplara göre yapılan genel analizde fark belirlendi { $F(5,29)=16,95$; $p<0,0001$; Şekil 4.23A}. İkili karşılaştırmalarda sadece Sham ve MOG+CFA gruplarına karşı yapılan analiz sonuçları paylaşılmıştır. MOG+CFA+LPS grubunun IBA1(+) hücre sayısı hem Sham grubundan hem de MOG+CFA grubundan belirgin daha yüksek bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,0001$). Hipokampüste gruplara göre yapılan IBA1(+) hücre sayısı karşılaştırmasında fark belirlendi { $F(5,29)=23,31$; $p<0,0001$; Şekil 4.23B}. İkili karşılaştırmalarda ise Sham grubuna göre MOG+CFA, Sham+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha yüksek saptandı (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,001$; $<0,0001$). MOG+CFA grubuna göre yapılan kıyasta ise MOG+CFA+LPS grubunun IBA1(+) hücre sayısı yüksek olarak belirlendi ($p<0,001$). Beynin beyaz cevherinde IBA1(+) hücre sayısı açısından fark saptandı { $F(5,29)=14,28$; $p<0,0001$; Şekil 4.23C}. Sham grubuna göre CFA, MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha yüksek bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,0001$; $<0,001$ ve $<0,05$). MOG+CFA grubuna karşı yapılan analizde ise CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS

gruplarının IBA1(+) hücre sayısının daha düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p değerleri: $<0,001$; $<0,0001$; $<0,05$ ve $<0,001$). Spinal kordun beyaz cevherinde de genel analizde gruplar farklı bulundu $\{F(5,29)=16,95$; $p<0,0001$; Şekil 4.23D}. Sham grubuna karşı yapılan analizde MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının daha yüksek IBA1(+) hücre sayısı olduğu saptandı (sırasıyla p değerleri: $<0,0001$; $<0,05$ ve $<0,001$). MOG+CFA grubuna karşı yapılan kıyasta ise CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha düşük olarak bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,0001$; $<0,0001$; $<0,05$). Mikroglia sayısı gri cevher alanları olan subpial korteks ve hipokampüste oluşturduğumuz model grubunda diğer gruplardan daha yüksek bulundu. Rutin model grubunun mikroglia sayısı ise beyin beyaz cevherinde oluşturduğumuz model grubu ve Sham grubundan daha yüksek saptandı. Spinal kord beyaz cevherinde ise rutin model ve oluşturduğumuz model gruplarının mikroglia sayısı benzerdi ve bu iki grupta da Sham grubundan daha yüksekti. Tek başına CFA verilen grubun da beyaz cevher alanlarında Sham grubuna göre mikroglia sayısının arttığı bulundu. Tek başına LPS yapılan grupların ise mikroglia sayısı Sham grubu ile benzer saptandı.



Şekil 4.23. Gruplara göre 8. haftada subpial korteks, hipokampüs, beyin beyaz cevheri ve spinal kord beyaz cevherinde IBA1(+) hücre sayısı. **A.** Subpial kortekste IBA1(+) hücre sayısı. Sham grubuna göre yapılan analizde sadece MOG+CFA+LPS grubunun IBA1(+) hücre sayısı daha fazla idi (**** $p < 0,0001$). MOG+CFA grubuna göre yapılan analizde de sadece MOG+CFA+LPS grubunun IBA1(+) hücre sayısı daha fazlaydı (*** $p < 0,001$). **B.** Hipokampüste IBA1(+) hücre sayısı. Sham grubuna göre yapılan analizde MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha fazla bulundu (sırasıyla p değerleri: ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ ve **** $< 0,0001$). MOG+CFA grubuna göre yapılan analizde ise sadece MOG+CFA+LPS grubunun IBA1(+) hücre sayısı daha fazla belirlendi (*** $p < 0,001$). **C.** Beyin beyaz cevherinde IBA1(+) hücre sayısı. Sham grubuna göre yapılan analizde CFA, MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha fazla saptandı (sırasıyla p değerleri: ** $< 0,01$; **** $< 0,0001$; *** $< 0,001$ ve * $< 0,05$). MOG+CFA grubuna göre yapılan analizde ise CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha düşük bulundu (sırasıyla

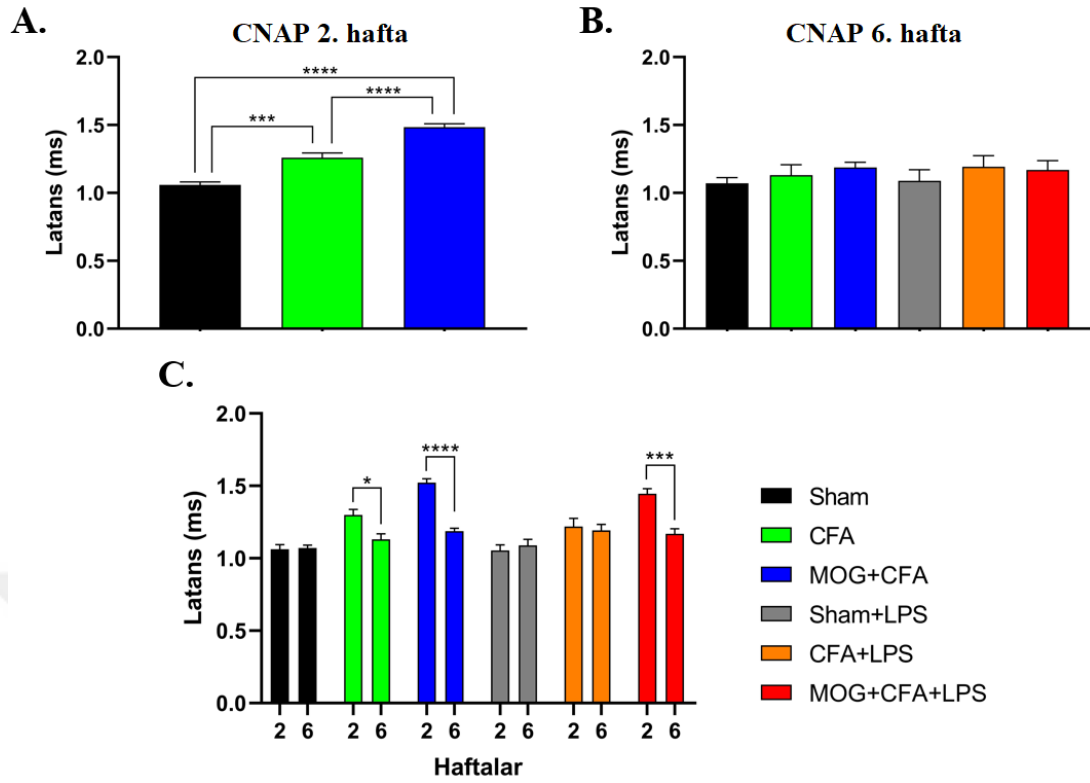
p değerleri: ***<0,001; ****<0,0001; *<0,05; ve **<0,01). **D.** Spinal kord beyaz cevherinde IBA1(+) hücre sayısı. Sham grubuna göre yapılan analizde MOG+CFA, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha fazla bulundu (sırasıyla p değerleri: ****<0,0001; *<0,05; ve ***<0,001). MOG+CFA grubuna göre yapılan analizde ise CFA, Sham+LPS ve CFA+LPS gruplarının IBA1(+) hücre sayısı daha düşük belirlendi (sırasıyla p değerleri: ****<0,0001; ****<0,0001 ve *<0,05). (Grupların kıyasında “tek yönlü ANOVA testi” yapıldıktan sonra *posthoc* “Tukey testi” uygulanmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına n=5-6’dır. Sham grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların bar grafiğinin üzerine siyah renkte “*” simgesi konulmuştur. MOG+CFA grubuna göre karşılaştırma analizinde fark bulunan grupların bar grafiğinin üzerine mavi renkte “*” simgesi konulmuştur. Gösterimlerde istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine dikkat edilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit.)



Şekil 4.24. IBA1 boyamasından örnek görseller. A. Mikroglial aktivasyonun görüldüğü bir alandan görüntü. **B.** Mikroglial aktivasyon olmayan alandan bir görüntü. **C.** Belirgin demiyelinize alana eşlik eden mikroglial aktivasyon görüntüsü. **D.** Aktive mikroglialların 100X büyütme görüntüsü.

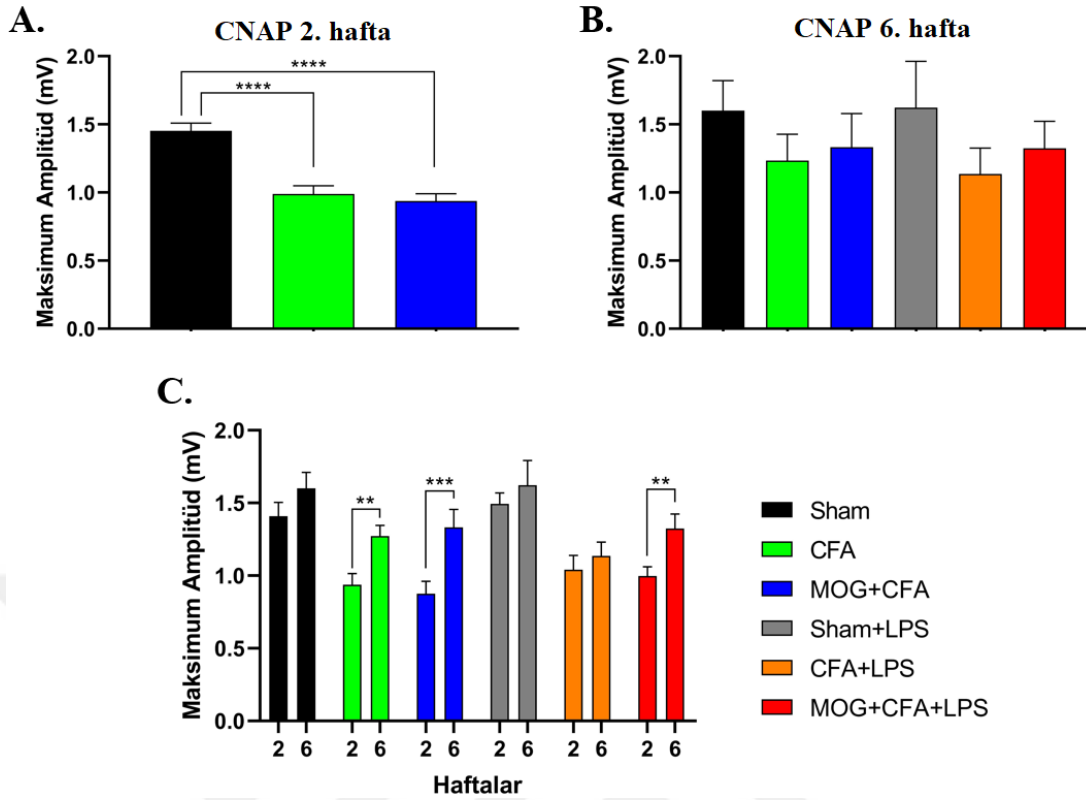
4.10. Modelin Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Modelin davranışsal ve histopatolojik karakterizasyonu yapıldıktan sonra yeni bir deney setinde periferik sinir tutulumunun ortaya konması ve belirlenen mekanik allodini de periferik sinir etkilenmesinin olası rolü belirlenmeye çalışıldı. Bileşik sinir aksiyon potansiyeli kaydı (CNAP) 2 ve 6. haftalarda alındı. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama latans süresi sırasıyla 1,06 ms; 1,26 ms ve 1,48 ms olarak hesaplandı. 6. Haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla latans süreleri 1,07 ms; 1,13 ms; 1,19 ms; 1,09 ms; 1,19 ms ve 1,17 ms olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu belirlendi { $F(2,21)=57,51$; $p<0,0001$; Şekil 4.25} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre latans süresinin arttığı bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,0001$). Ek olarak MOG+CFA grubunun latans süresi CFA grubunun latans süresine göre de artmış idi ($p<0,0001$). 6. haftada tüm grupların latans süresi benzerdi. Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının 6. haftada latans süresi 2. haftaya göre azalmıştı (sırasıyla p değerleri: $<0,05$; $<0,0001$; $<0,001$). 2. haftada sıçanların kuyruk sinirinde iletim hızı hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda azalmıştı fakat MOG+CFA grubundaki sinir iletim hızı yavaşlaması CFA grubundan da fazla olarak saptandı. MOG+CFA grubunun tüm gruplara göre miyelin açısından etkilenmesi daha fazla idi. 2. haftada belirlenen tüm bu farklar 6. haftada kayboldu ve tüm grupların periferik sinir iletim hızı benzerdi.



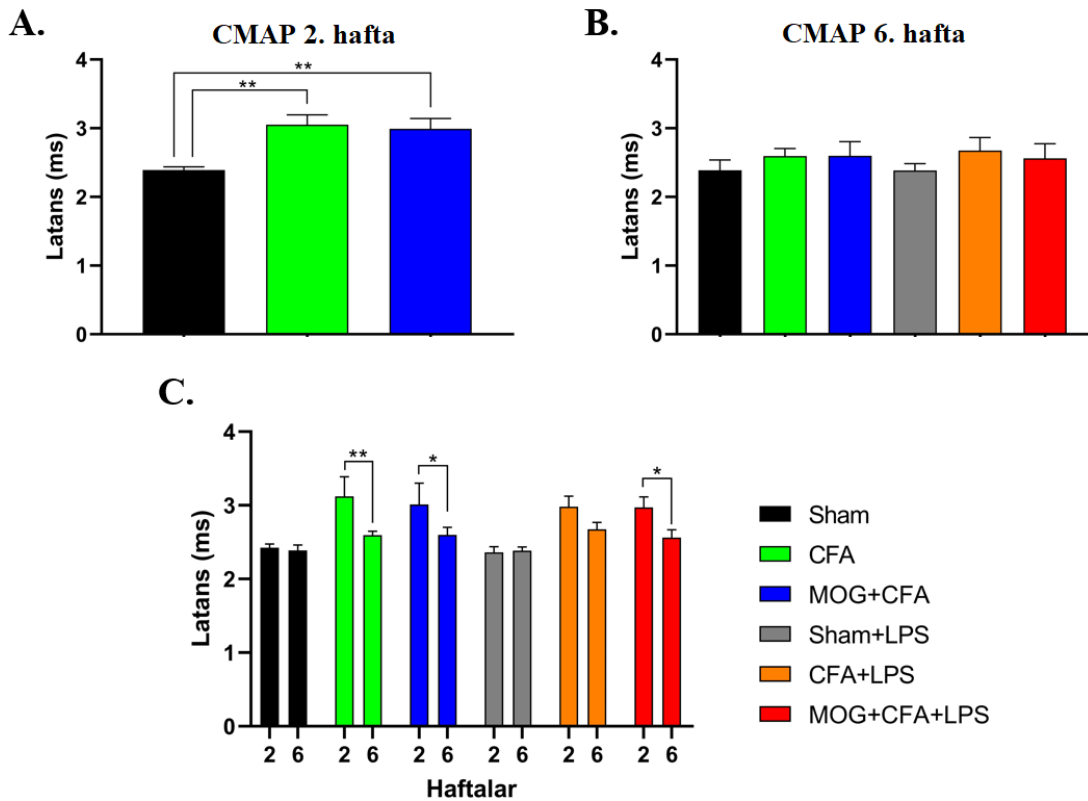
Şekil 4.25. Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında latans değerleri. **A.** Gruplara göre 2. hafta bileşik sinir aksiyon potansiyeli latans değişimi. 2. haftada CFA grubunun latans değeri Sham grubundan yüksek bulundu ($***p<0,001$). MOG+CFA grubun latans değeri ise hem Sham grubundan hem de CFA grubundan daha yüksek belirlendi ($****p<0,0001$). **B.** Gruplara göre 6. hafta bileşik sinir aksiyon potansiyeli latans değişimi. 6. haftada bileşik sinir aksiyon potansiyelinin latansı tüm gruplarda benzerdi. **C.** Grupların 2 ve 6. haftada bileşik sinir aksiyon potansiyeli latans değerinin değişimi. CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarında 6. haftada latans 2. haftaya göre düşmüştü (sırasıyla p değerleri: $*<0,05$; $****<0,0001$ ve $***p<0,001$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına n=4’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CNAP: *Compound Nerve Action Potential*)

Bileşik sinir aksiyon potansiyeli kaydında sıçanların aksiyon potansiyellerinin amplitüd değerleri de belirlendi. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama maksimum amplitüd değerleri sırasıyla 1,45 mV; 0,99 mV ve 0,94 mV olarak hesaplandı. 6. Haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama maksimum amplitüd değerleri 1,60 mV; 1,23 mV; 1,33 mV; 1,62 mV; 1,14 mV ve 1,32 mV olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu bulundu { $F(2,21)=24,05$; $p<0,0001$; Şekil 4.26} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre maksimum amplitüd değerinin azaldığı saptandı ($p<0,0001$). 6. haftada tüm grupların maksimum amplitüd değerleri benzerdi. Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının 6. haftada maksimum amplitüd değerleri 2. haftaya göre artmış bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,001$; $<0,01$). 2. haftada sıçanların kuyruk sinirinde ölçülen en yüksek amplitüd değeri hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda azaldı. Bu durum sinir liflerinde görülen genel hasarın hem CFA hem de MOG+CFA grubunda görüldüğünü ortaya koydu. 2. haftada belirlenen tüm bu farklar 6. haftada kayboldu ve tüm grupların genel sinir etkilenmesi durumu benzer olarak belirlendi.



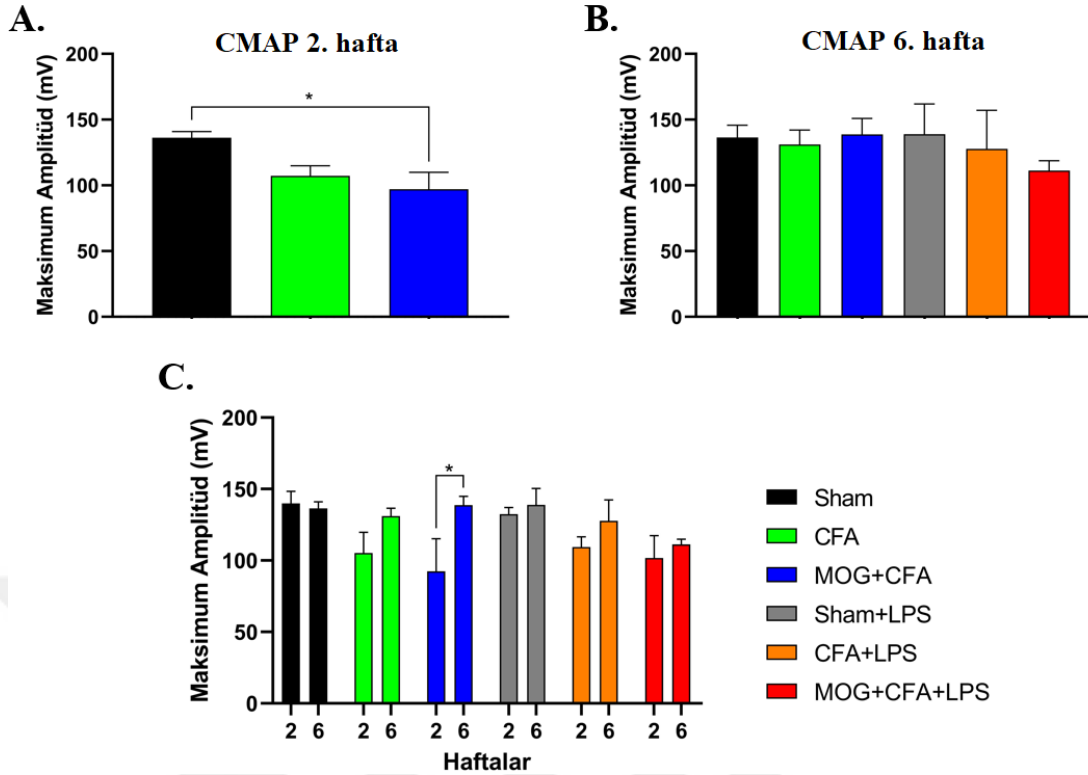
Şekil 4.26. Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında maksimum amplitüd değerleri. **A.** Gruplara göre 2. hafta bileşik sinir aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değişimi. 2. haftada hem CFA hem de MOG+CFA gruplarının maksimum amplitüd değeri Sham grubundan düşük bulundu (**** $p<0,0001$). **B.** Gruplara göre 6. hafta bileşik sinir aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değişimi. 6. haftada bileşik sinir aksiyon potansiyelinin maksimum amplitüd değeri tüm gruplarda benzerdi. **C.** Grupların 2 ve 6. haftada bileşik sinir aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değeri değişimi. CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarında 6. haftada maksimum amplitüd değeri 2. haftaya göre arttı (sırasıyla p değerleri: ** $<0,01$; *** $<0,001$ ve ** $p<0,01$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CNAP: *Compound Nerve Action Potential*)

Sıçanların kuyruklarında bileşik sinir aksiyon potansiyeli yanında bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) de değerlendirildi. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama CMAP latans değerleri sırasıyla 2,39 ms; 3,05 ms ve 2,99 ms olarak hesaplandı. 6. haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama CMAP latans değerleri 2,39 ms; 2,60 ms; 2,60 ms; 2,38 ms; 2,68 ms ve 2,56 ms olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu belirlendi { $F(2,21)=24,05$; $p<0,0001$; Şekil 4.27} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre latans değerinin arttığı bulundu ($p<0,0001$). 6. haftada tüm grupların latans değerleri benzerdi. Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının 6. haftada latans değerleri 2. haftaya göre düştü (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,05$; $<0,05$). 2. haftada sıçanların kuyruk motor sinirinde ölçülen latans değeri hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda düştü. Bu durum motor sinirde görülen iletim hasarının hem CFA hem de MOG+CFA grubunda olduğunu ortaya koydu. 2. haftada belirlenen tüm bu farklar 6. haftada kayboldu ve tüm grupların genel motor sinir etkilenmesi benzerdi.



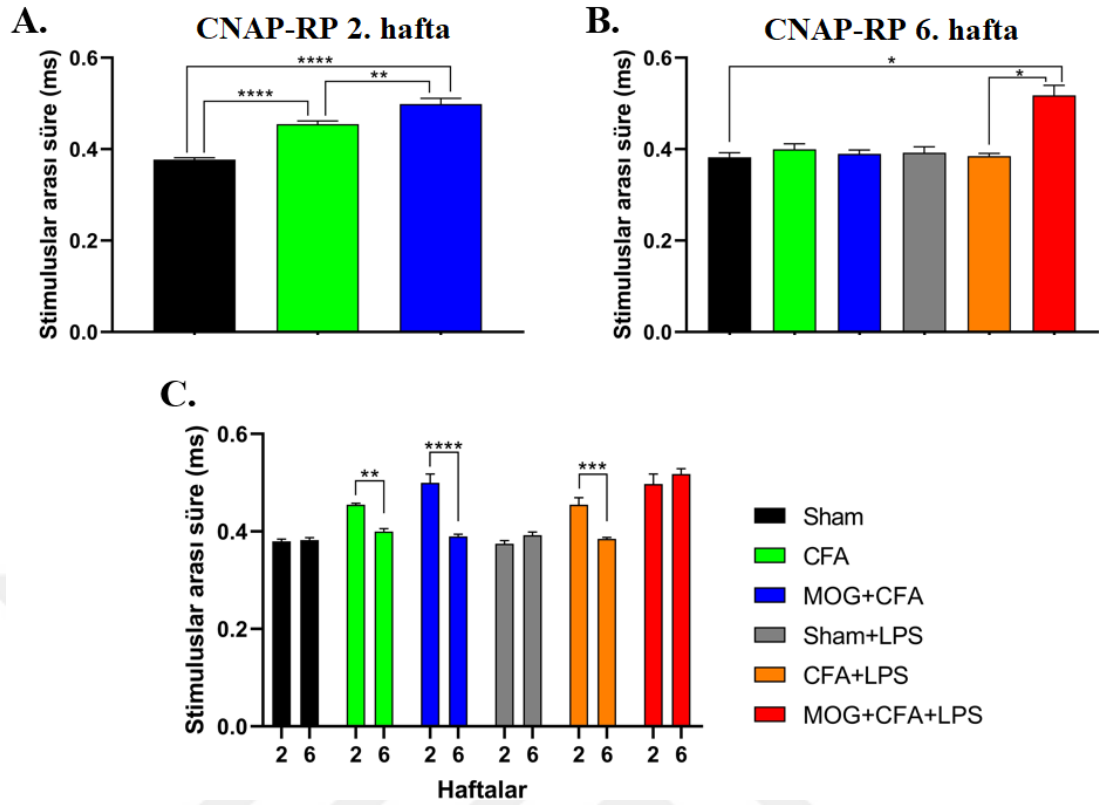
Şekil 4.27. Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) kayıtlarında latans değerleri. **A.** Gruplara göre 2. hafta bileşik kas aksiyon potansiyeli latans değişimi. 2. haftada hem CFA grubunun hem de MOG+CFA grubunun latans değeri Sham grubundan yüksek bulundu (** $p<0,01$). **B.** Gruplara göre 6. hafta bileşik kas aksiyon potansiyeli latans değişimi. 6. haftada bileşik motor aksiyon potansiyelinin latansı tüm gruplarda benzerdi. **C.** Grupların 2 ve 6. haftada bileşik kas aksiyon potansiyeli latans değerinin değişimi. CFA, MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarında 6. haftada latans değeri 2. haftaya göre düşüktü (sırasıyla p değerleri: ** $<0,01$; * $<0,05$ ve * $<0,05$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CMAP: *Compound Muscle Action Potential*)

Bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) kaydında maksimum amplitüd değerleri de incelendi. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama maksimum amplitüd değerleri sırasıyla 136,2 mV; 107,3 mV ve 97,1 mV olarak hesaplandı. 6. haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama maksimum amplitüd değerleri 136,4 mV; 131,1 mV; 138,8 mV; 138,9 mV; 127,8 mV ve 111,2 mV olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu belirlendi { $F(2,21)=5,013$; $p=0,016$; Şekil 4.28} ve sadece MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre maksimum amplitüd değerinin azaldığı bulundu ($p<0,05$). 6. haftada tüm grupların maksimum amplitüd değerleri benzerdi. Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında sadece MOG+CFA grubunun 6. haftada maksimum amplitüd değerleri 2. haftaya göre artmıştı ($p<0,05$). 2. haftada sıçanların kuyruk motor sinirinde ölçülen en yüksek amplitüd değeri sadece rutin model grubunda azaldı. 2. haftada belirlenen maksimum amplitüd farkı ise 6. haftada kayboldu ve tüm grupların genel etkilenmesi benzer olarak belirlendi.



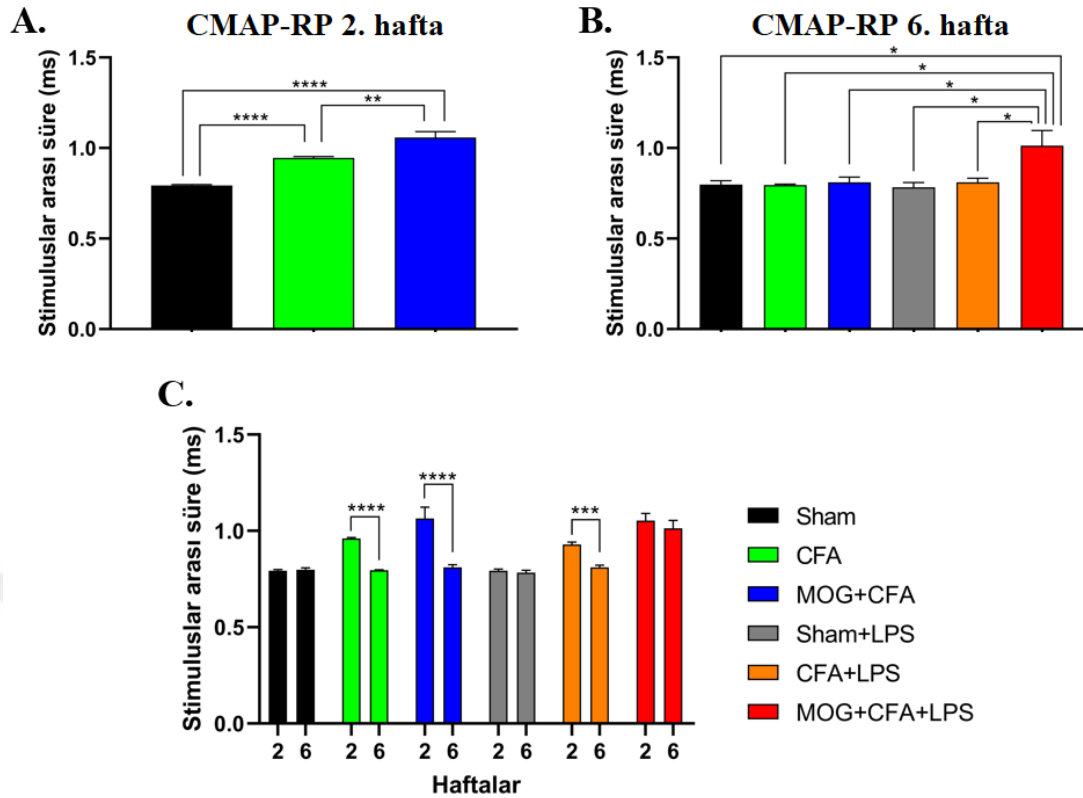
Şekil 4.28. Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP) kayıtlarında maksimum amplitüd değerleri. **A.** Gruplara göre 2. hafta bileşik kas aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değişimi. 2. haftada sadece MOG+CFA grubunun maksimum amplitüd değeri Sham grubundan düşük bulundu (* $p<0,05$). **B.** Gruplara göre 6. hafta bileşik kas aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değişimi. 6. haftada bileşik kas aksiyon potansiyelinin maksimum amplitüd değeri tüm gruplarda benzerdi. **C.** Grupların 2 ve 6. haftada bileşik kas aksiyon potansiyeli maksimum amplitüd değeri değişimi. Sadece MOG+CFA grubunda 6. haftada maksimum amplitüd değeri 2. haftaya göre artmıştı ($p<0,05$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CMAP: *Compound Muscle Action Potential*)

Sıçanların kuyruk sinirlerinde yapılan CNAP ve CMAP kayıtlarında iki çeşit refrakter periyot (RP) değerlendirmesi yapıldı: 1) aksiyon potansiyelinin tam olarak tek bir dalga olduğu maksimum stimuluslar arası süre ve 2) aksiyon potansiyelinin tam anlamıyla 2 dalga olduğu minimum stimuluslar arası süre. İlk olarak anlatılan RP değerleri hem CNAP hem de CMAP kayıtlarında incelendi. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama CNAP-RP stimuluslar arası süre değerleri sırasıyla 0,38 ms; 0,46 ms ve 0,50 ms olarak hesaplandı. 6. haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama CNAP-RP stimuluslar arası süre değerleri 0,38 ms; 0,40 ms; 0,39 ms; 0,39 ms; 0,38 ms ve 0,52 ms olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu bulundu { $F(2,21)=52,62$; $p<0,0001$; Şekil 4.29} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre stimuluslar arası süre değerinin yükseldiği bulundu ($p<0,0001$). Ek olarak MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri CFA grubundan da yüksekti ($p<0,01$). 6. haftada ise gruplar arasında fark olduğu belirlendi { $F(5,18)=67,62$; $p<0,0001$ } ve MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri Sham grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında CFA, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarının 6. haftada stimuluslar arası süre değerleri 2. haftaya göre düştü (sırasıyla p değerleri: $<0,01$; $<0,0001$; ve $<0,001$). 2. haftada sıçanların bileşik sinir aksiyon potansiyeli kaydında refrakter periyot belirlemesi için ölçülen stimuluslar arası süre değeri, hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda arttı. Bu durum duyu sinirinde uyarılma gecikmesi açısından hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre yükselme olduğunu belirledi. 2. haftada belirlenen bu farklar 6. haftada kayboldu fakat sadece oluşturduğumuz model grubunda bu fark devam etti.



Şekil 4.29. Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli (CNAP) kayıtlarında refrakter periyot (RP) olarak belirlenen stimuluslar arası süre değerleri. A. Gruplara göre 2. haftada CNAP-RP stimuluslar arası süre değerlerinin değişimi. 2. haftada hem CFA hem de MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri Sham grubundan yüksek olarak bulundu (**** $p < 0,0001$). **B.** Gruplara göre 6. hafta CNAP-RP stimuluslar arası süre değişimi. 6. haftada MOG+CFA+LPS grubunun CNAP-RP stimuluslar arası süre değeri Sham ve CFA+LPS gruplarından daha yüksek belirlendi (* $p < 0,05$). **C.** Grupların 2 ve 6. haftada CNAP-RP stimuluslar arası süre değişimi. CFA, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarında 2. haftada artmış olan stimuluslar arası süre değeri azalarak normale döndü (sırasıyla p değerleri **** $< 0,0001$; **** $< 0,0001$ ve *** $< 0,001$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CNAP: *Compound Muscle Action Potential*; RP: Refrakter Periyot).

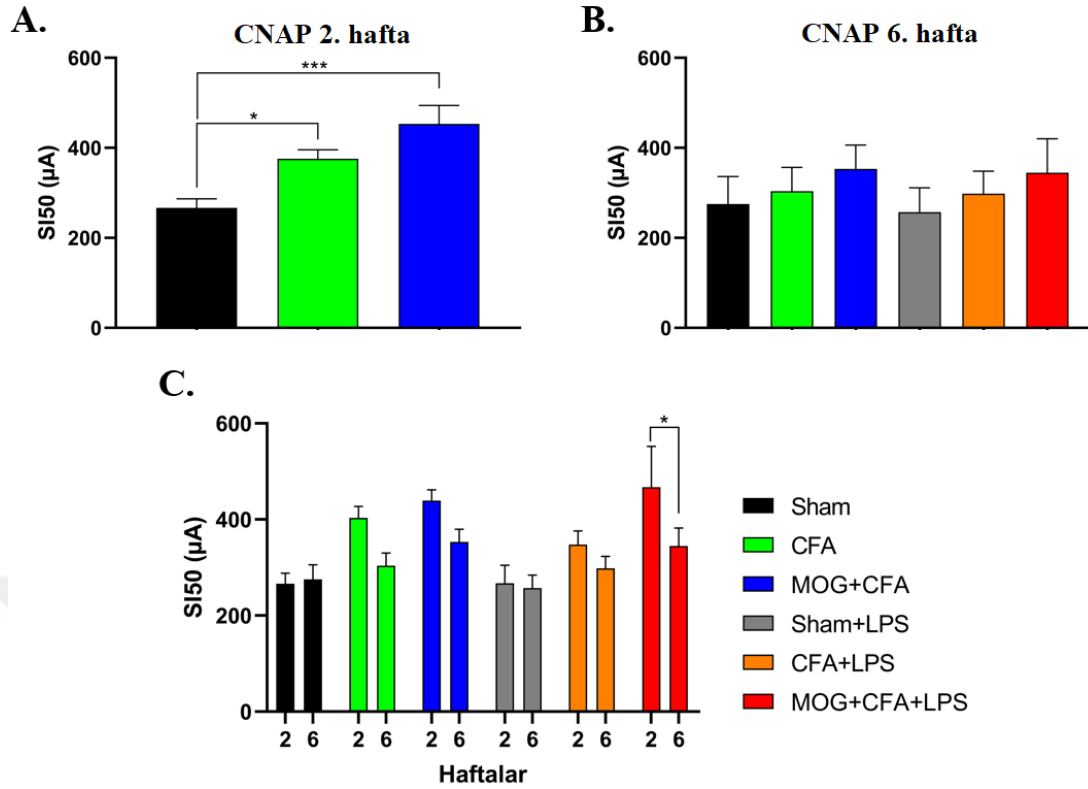
Refrakter periyot kayıtları bileşik kas aksiyon potansiyelinde de ölçüldü. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama CMAP-RP stimuluslar arası süre değerleri sırasıyla 0,79 ms; 0,95 ms ve 1,06 ms olarak hesaplandı. 6. haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama CMAP-RP stimuluslar arası süre değerleri 0,80 ms; 0,80 ms; 0,81 ms; 0,78 ms; 0,81 ms ve 1,01 ms olarak belirlendi. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu belirlendi { $F(2,21)=46,53$; $p<0,0001$; Şekil 4.30} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre stimuluslar arası süre değerinin yükseldiği bulundu ($p<0,0001$). Ek olarak MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri CFA grubundan da yüksekti ($p<0,01$). 6. haftada ise gruplar arasında fark olduğu bulundu { $F(5,18)=18,91$; $p<0,0001$ } ve MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri tüm gruplardan yüksek olarak saptandı ($p<0,05$). Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında CFA, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarının 6. haftada stimuluslar arası süre değerleri 2. haftaya göre düşük bulundu (sırasıyla p değerleri: $<0,0001$; $<0,0001$; ve $<0,001$). 2. haftada sıçanların bileşik kas aksiyon potansiyeli kaydında refrakter periyot belirlemesi için ölçülen stimuluslar arası süre değeri, hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda artmıştı. Bu durum motor sinirde uyarılma gecikmesi açısından hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre yükselme olduğunu gösterdi. 2. haftada belirlenen bu farklar 6. haftada kayboldu fakat sadece oluşturduğumuz model grubunda bu fark devam etti.



Şekil 4.30. Gruplara göre bileşik motor aksiyon potansiyeli kayıtlarında refrakter periyot olarak belirlenen stimuluslar arası süre değerleri. A. Gruplara göre 2. haftada CMAP-RP stimuluslar arası süre değerlerinin değişimi. 2. haftada hem CFA hem de MOG+CFA grubunun stimuluslar arası süre değeri Sham grubundan yüksek olarak bulundu (**** $p<0,0001$). **B.** Gruplara göre 6. hafta CMAP-RP stimuluslar arası süre değişimi. 6. haftada MOG+CFA+LPS grubunun CMAP-RP stimuluslar arası süre değeri diğer tüm gruplardan daha yüksek belirlendi (* $p<0,05$). **C.** Grupların 2 ve 6. haftada CMAP-RP stimuluslar arası süre değişimi. CFA, MOG+CFA ve CFA+LPS gruplarında 2. haftada artmış olan stimuluslar arası süre değeri azalarak normale döndü (sırasıyla p değerleri **** $<0,0001$; **** $<0,0001$ ve *** $<0,001$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CNAP: *Compound Muscle Action Potential*; RP: Refrakter Periyot).

Aksiyon potansiyelinin tam 2 dalga haline geldiği minimum stimuluslar arası süre şeklinde ikinci olarak bahsedilen refrakter periyot değerlendirmeleri de aynı şekilde CNAP-RP ve CMAP-RP olarak yapıldı. Bu incelemelerde hem CNAP hem de CMAP için 2 ve 6. haftalarda alınan tüm kayıtlarda gruplar arasında ve zamansal olarak herhangi bir fark belirlenmedi. Bu ölçümlerde grupların 2 ve 6. haftadaki CNAP-RP için belirlenen yaklaşık stimuluslar arası süre değeri 1,17 ms ile 1,31 ms arasında değişti. Benzer şekilde CMAP-RP stimuluslar arası yaklaşık süre ise 2,95 ms ile 3,03 ms arasında belirlendi.

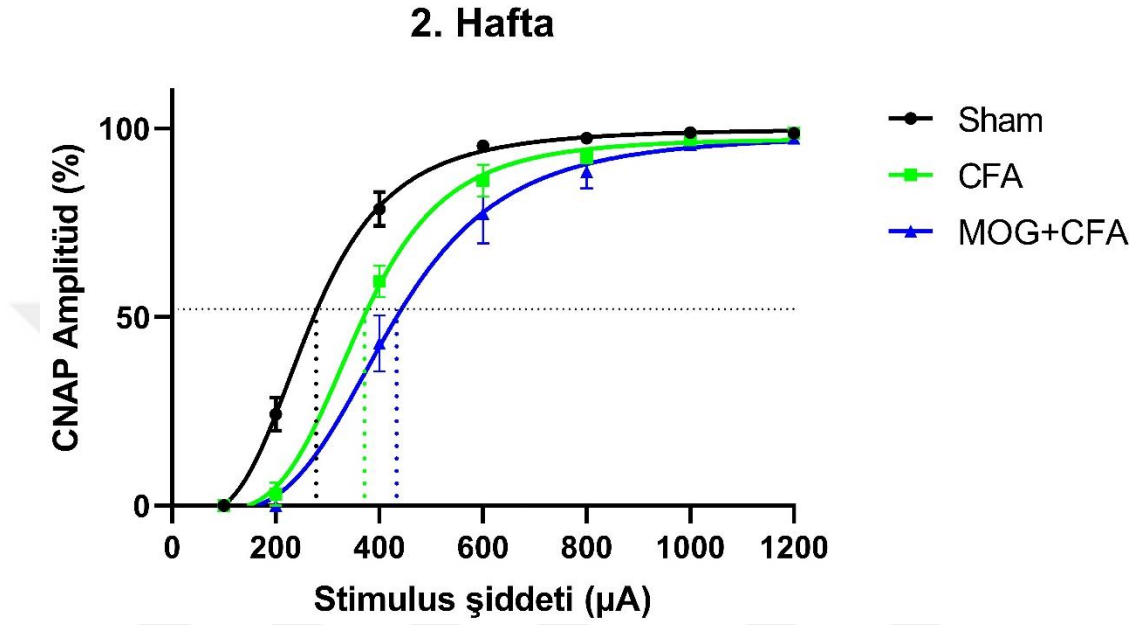
Elektrofizyolojik kayıtlar alınırken yukarıdaki değerlendirmelere ek olarak eksitabilite incelemesi için stimulus şiddeti – yanıt eğrilerini çizmek üzere artan şiddetlerde uyarı verilerek yanıtlar belirlendi. Bu yanıtlar ile çizilen eğrilerden maksimum amplitüd yanıtının yarısı (%50'si) amplitüddeki yanıtı oluşturan stimulus şiddeti (SI50) değerleri hesaplandı. 2. haftada Sham, CFA ve MOG+CFA gruplarının ortalama SI50 değerleri sırasıyla 266,7 μ A; 375,6 μ A ve 453,4 μ A olarak bulundu. 6. haftada ise Sham, CFA, MOG+CFA, Sham+LPS, CFA+LPS ve MOG+CFA+LPS gruplarının sırasıyla ortalama SI50 değerleri 275,4 μ A; 303,5 μ A; 353,3 μ A; 257,2 μ A; 298,3 μ A ve 344,5 μ A olarak saptandı. 2. haftada 3 grup arasında yapılan analizde grupların farklı olduğu belirlendi { $F(2,21)=10,57$; $p=0,0007$; Şekil 4.31} ve hem CFA hem de MOG+CFA grubunda Sham grubuna göre SI50 değerinin yükseldiği bulundu ($p<0,05$ ve $p<0,001$). 6. haftada ise MOG+CFA ve MOG+CFA+LPS gruplarının sayısal olarak daha yüksek SI50 değeri belirlense de anlamlı fark saptanmadı. Grupların kendi içerisinde haftalar arasında kıyas yapıldığında sadece oluşturduğumuz model grubunda 6. haftada SI50 değerleri 2. haftaya göre düşük belirlendi ($p<0,05$). 2. haftada sıçanların bileşik sinir aksiyon potansiyeli kaydında eksitabilite değerlendirmesi için belirlenen SI50 değeri, hem CFA grubunda hem de MOG+CFA grubunda yüksekti. Bu bulgular, 2. haftada hem CFA hem de MOG+CFA uygulanan sıçanların kuyruk sinirinin daha hipoeksitabl olduğunu gösterdi. 2. haftada belirlenen bu farklar 6. haftada ise kayboldu ve tüm grupların kuyruk sinirinin benzer eksitabl durumda olduğu bulundu.



Şekil 4.31. Gruplara göre bileşik sinir aksiyon potansiyeli kayıtlarında belirlenen SI50 değerleri. **A.** Gruplara göre 2. haftada SI50 değerlerinin değişimi. 2. haftada hem CFA hem de MOG+CFA grubunun SI50 değeri Sham grubundan yüksek olarak bulundu (* $p < 0,05$ ve *** $p < 0,001$). **B.** Gruplara göre 6. hafta SI50 değerleri değişimi. 6. haftada tüm grupların SI50 değeri benzerdi. **C.** Grupların 2 ve 6. haftada SI50 değerleri değişimi. Sadece MOG+CFA+LPS grubunda 2. haftada artmış olan stimuluslar arası süre değeri azalarak normalde döndü (* $p < 0,05$). (2. haftada LPS enjeksiyonu henüz yapılmadığı için LPS enjeksiyonu yapılacak gruplar da ilgili grubunun içinde değerlendirilmiştir. 2. ve 6. hafta analizleri için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Tüm grupların zamansal değişimi için “tekrarlı ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit; CNAP: *Compound Nerve Action Potential*; SI50; maksimum yanıtın %50’sini oluşturan stimulus şiddeti)

CNAP kayıtlarında çizilen stimulus şiddeti – yanıt eğrilerinin 2. hafta görseli Şekil 4.32’de paylaşılmıştır. Bu şekle göre hem CFA hem de MOG+CFA gruplarının

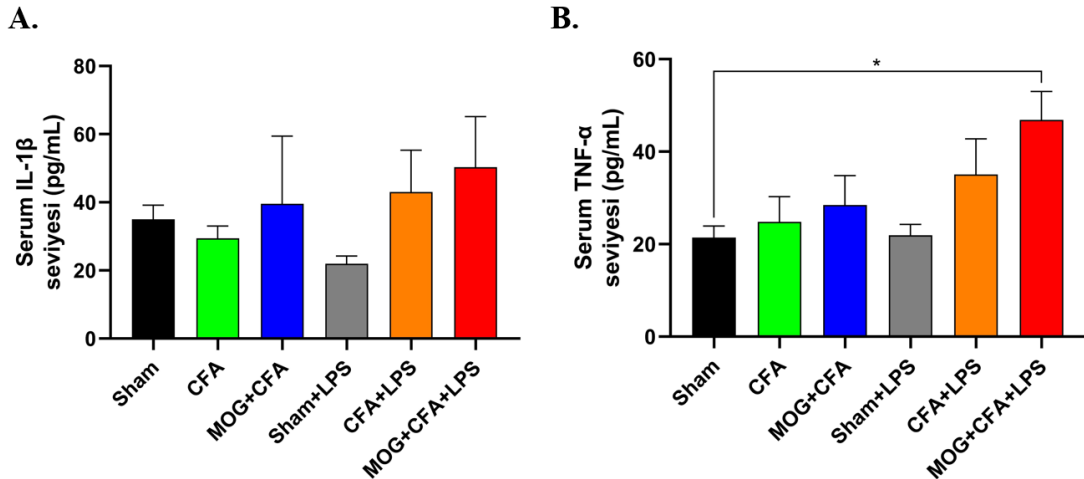
eğrisi Sham grubuna göre sağa kaymış olarak belirlendi. Sağa kayma, kuyruk sinirinin hipoeksitabl hale geldiğini ortaya koydu. CFA ve MOG+CFA arasındaki sağa kaymanın ise anlamlı olmadığı yukarıda belirtildi.



Şekil 4.32. Grupların 2. haftadaki stimulus şiddeti – yanıt eğrisi ve SI50 değerleri. CFA ve MOG+CFA gruplarının eğrisi sağa kaydı. (Grup başına n=8'dir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund'un tam adjuvanı; CNAP: Bileşik sinir aksiyon potansiyeli - *Compound Nerve Action Potential*)

4.11. Modelin Serumda Sitokin Tayini Bulguları

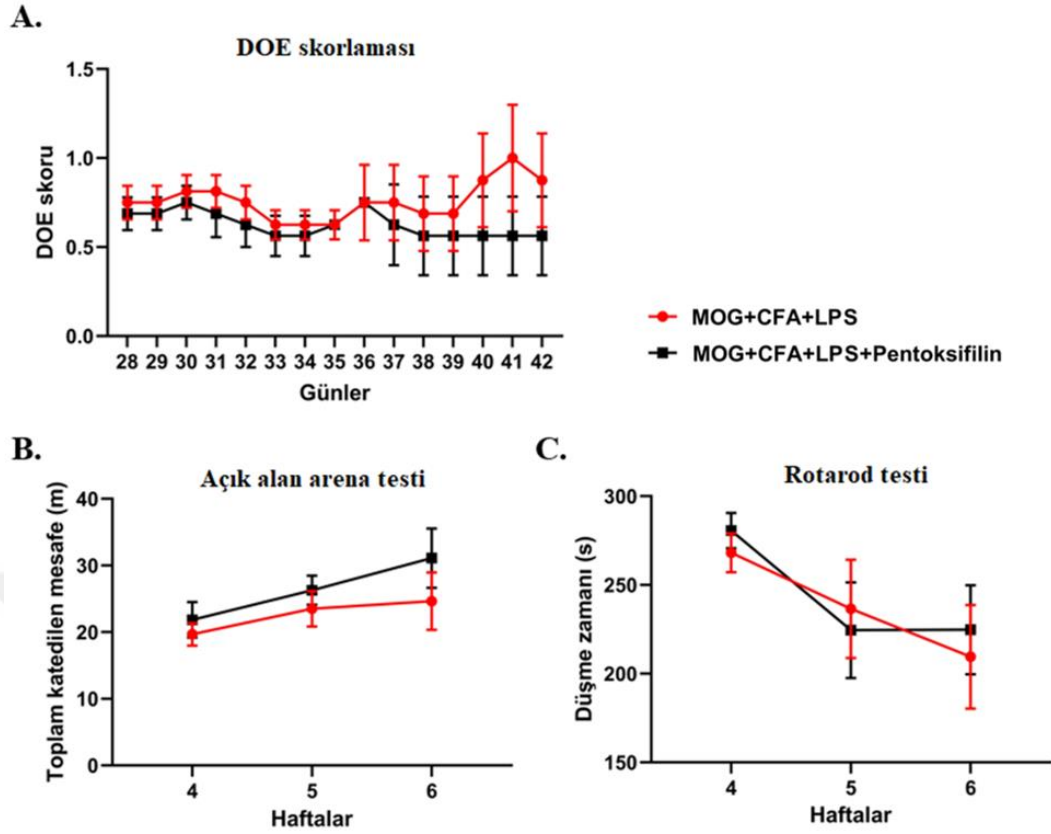
Modelin oluşturulması deney protokolünün sonunda 10. haftada sıçanların serum örnekleri ile sitokin tayini yapıldı. Sham grubunun serum IL-1 β ortalama değeri 35,02 pg/mL iken serum TNF- α ortalama değeri 21,44 pg/mL olarak hesaplandı. Serum IL-1 β seviyesi tüm gruplarda benzer bulundu. Serum TNF- α seviyesi için gruplar arasında fark olduğu belirlendi {F(5,13)=3,413; p=0,0345} ve MOG+CFA+LPS grubunun TNF- α seviyesinin Sham grubundan daha yüksek olduğu saptandı.



Şekil 4.33. 10. haftada gruplara göre serum sitokin seviyeleri. **A.** Gruplara göre serum IL-1 β seviyesi. Grupların serum IL-1 β seviyesi benzerdi. **B.** Gruplara göre serum TNF- α seviyesi. MOG+CFA+LPS grubunun TNF- α seviyesi Sham grubundan yüksek olarak bulundu (* $p < 0.05$). (Grupların karşılaştırılması analizi için “tek yönlü ANOVA testi” sonrası *posthoc* “Tukey testi” yapılmıştır. Grup başına $n=3-4$ ’tür. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

4.12. Oluşturduğumuz Modelde Pentoksifilin Etkisi Bulguları

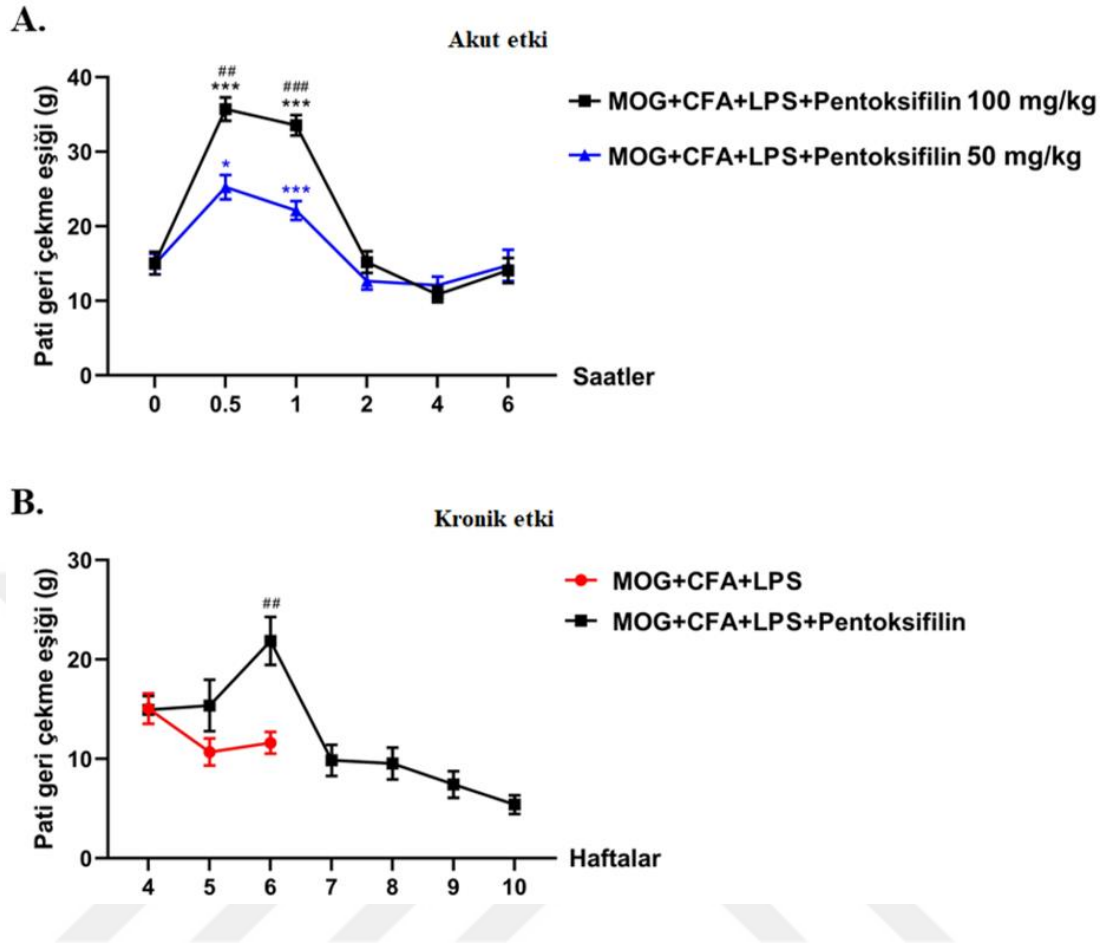
Oluşturduğumuz DOE modelinin tüm karakterizasyonları sağlandıktan sonra tedavi denemesi protokolüne geçildi. Sıçanlara 4. haftada 100 mg/kg dozda intraperitoneal pentoksifilin uygulaması yapıldı. Sıçanların sakirifikasyon gününe kadar DOE skorları günlük takip edildi. Pentoksifilin tedavisi altında bu skorda herhangi bir günde değişim saptanmadı (Şekil 4.34A). Benzer şekilde haftalık olarak değerlendirilen açık alan arena testi ve rotarod testinde oluşturduğumuz model grubu ve pentoksifilin grubu arasında fark belirlenmedi (Şekil 4.34B ve Şekil 4.34C). Pentoksifilin oluşturduğumuz modelde görülen motor disfonksiyonlara ve klinik seyre bir etkisi saptanmadı.



Şekil 4.34. Pentoksifilin oluşturduğumuz modelde DOE skoru, lokomasyon ve motor durum üzerine etkileri. A. DOE skorunun gruplara göre 4 ile 6. hafta arasında günlük değişimi. Gruplar arasında herhangi bir günde ve genel kıyasta fark bulunmadı. **B.** Lokomasyon durumunun gruplara göre 4, 5 ve 6. haftadaki değişimi. Gruplar arasında herhangi bir haftada ve genel kıyasta fark bulunmadı. **C.** Motor durumunun gruplara göre 4, 5 ve 6. haftadaki değişimi. Gruplar arasında herhangi bir haftada ve genel kıyasta fark bulunmadı. (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama $\pm$ standart hata değerlerini göstermektedir. Grup başına $n=8$ ’dir. Günlük veya haftalık olarak gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası *posthoc* “Sidak testi” kullanılmıştır. DOE: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit; MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

Oluşturduğumuz modelde pentoksifilin akut ve kronik olarak mekanik allodini bulgusuna etkisi araştırıldı. Akut etki için 50 ve 100 mg/kg dozları uygulandı. Akut etki denemeleri başlarken oluşturduğumuz modelin ortalama pati geri çekme eşik

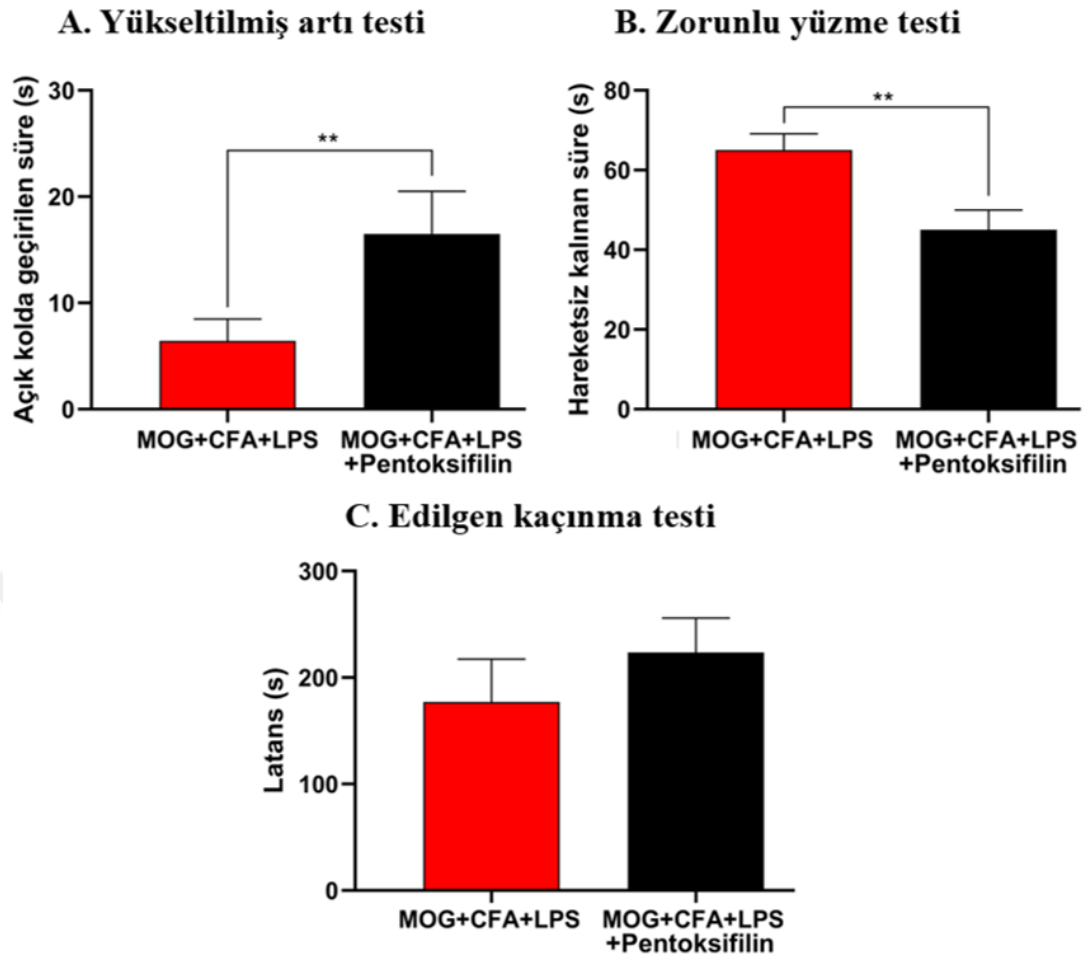
değeri 14,99 g olarak hesaplandı. Grupların genel kıyasında fark belirlendi { $F(14,70)=1,893$; $p=0,0419$ }. Pentoksifilin 50 ve 100 mg/kg dozlarının her ikisinde de kendi bazal ölçüm değerlerine göre yarım saatte ve 1. saatte pati geri çekme eşik değerinin arttığı görüldü (sırasıyla p değerleri: $<0,001$; $<0,001$; $<0,05$ ve $<0,001$; Şekil 4.35A). İki dozun etkisi arasındaki kıyas analizinde ise 100 mg/kg pentoksifilin 50 mg/kg pentoksifiline göre yarım saatte ve 1. saatte pati geri çekme eşik değerleri daha yüksek saptandı ($p<0,01$ ve $p<0,001$). 2, 4 ve 6. saatlerde ise her iki doz grubunun pati geri çekme eşik değerleri bazal seviyesine döndü. 100 mg/kg pentoksifilin kronik etki değerlendirmesinde grup etkisi açısından fark bulundu { $F(1,14)=8,650$; $p=0,0107$ }. Grupların haftalara göre yapılan kıyasında pentoksifilin grubunun pati geri çekme eşik değeri 6. haftada MOG+CFA+LPS grubundan daha yüksek saptandı ($p<0,01$; Şekil 4.35B). Grafiğin devamında ise pentoksifilin tedavi protokolü kesildi ve sıçanların pati geri çekme eşik değerlerinin bazal ölçümlerine ilk haftadan itibaren döndüğü belirlendi. Pentoksifilin uygulaması, hem 50 mg/kg dozda hem 100 mg/kg dozda ortalama bir saatlik süre ile modelimizde oluşan mekanik allodininin akut tedavisinde başarılı oldu. Bu tedavi edici akut etki 2. saatte sonlandı. Pentoksifilin kronik uygulamada ise 2 haftalık süre sonunda 6. haftada oluşturduğumuz modeldeki mekanik allodinin tedavisinde etkili olduğu belirlendi.



Şekil 4.35. Pentoksifilinin oluşturduğumuz modeldeki mekanik allodini üzerine akut ve kronik etkileri. A. Pentoksifilinin 50 ve 100 mg/kg dozlarının mekanik allodini üzerine akut etkisi. Pentoksifilinin iki dozunda da bazal ölçüm değerlerine göre pati geri çekme eşiğinde 30. dakikada artış saptandı ($***p<0,001$ ve $*p<0,05$). Bu artış 1. saatte de belirlendi ($***p<0,001$). Gruplar arasında zamansal yapılan kıyasta ise 100 mg/kg pentoksifilin grubunun pati geri çekme eşik değerleri 50 mg/kg pentoksifilin grubundan 30. dakika ve 1. saatte daha yüksek bulundu ($##p<0,01$ ve $###p<0,001$). **B.** 100 mg/kg pentoksifilinin mekanik allodini üzerine kronik etkisi ve pentoksifilin tedavisi sonrası mekanik allodininin haftalık takibi. Gruplar arasında zamansal olarak yapılan analizde 6. haftada pentoksifilin grubunun pati geri çekme eşik değeri MOG+CFA+LPS grubundan daha yüksek bulundu ($##p<0,01$). (Genel grup kıyasında “Tekrarlayan ölçümler için iki yönlü ANOVA testi” yapılmıştır. Çizgi grafikler ortalama $\pm$ standart hata değerlerini göstermektedir. Grup başına $n=8$ ’dir. Saatlik veya haftalık olarak gruplar arası analizler için ise aynı ANOVA testi sonrası

posthoc “Sidak testi” kullanılmıştır. Grupların kendi içerisinde bazal ölçümlerine göre yapılan kıyasta fark bulunanların ortalama verisi üzerine kendi grubunun renginde “*” simgesi konulmuştur. Grupların birbirine göre zamansal karşılaştırmasında fark bulunan grupların kendi renginde grup ortalama verisi üstüne “#” simgesi konulmuştur. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

Oluşturduğumuz modelde pentoksifilin anksiyete-benzeri duygudurum, depresyon-benzeri duygudurum ve kognitif disfonksiyona etkileri araştırıldı. Modelimizin yükseltilmiş artı testindeki açık kolda geçirilen süre ortalaması 6,45 s iken pentoksifilin grubunda bu süre 16,48 s’ye yükseldi ($t=2,214$; $p=0,0439$; Şekil 4.36A). Pentoksifilin 100 mg/kg dozunun günlük uygulaması, modelimizde görülen anksiyete-benzeri duygudurum için tedavi edici özellik gösterdi. Modelimizin zorunlu yüzme testinde hareketsiz kalınan süre ortalaması 65,05 s iken pentoksifilin grubunda bu süre 45,03 s’ye düştü ($t=3,145$; $p=0,0072$; Şekil 4.36B). Pentoksifilin modelimizde görülen depresyon-benzeri duygudurum için tedavi edici özelliği olduğu saptandı. Modelimizin edilgen kaçınma testinde latans süresi ortalaması 177 s iken pentoksifilin tedavisi alan grubun latans süresi ortalaması 223,6 s olarak hesaplandı. Pentoksifilin grubunun latansı daha düşük olarak belirlenmiş olsa da gruplar arasında fark belirlenmedi (Şekil 4.36C). 100 mg/kg günlük pentoksifilin uygulaması 2 hafta sonunda, oluşturduğumuz modelde gelişen kognitif disfonksiyonu düzeltemedi. Genel olarak pentoksifilin anksiyete- ve depresyon-benzeri duygudurum için tedavi edici özellik gösterirken kognitif disfonksiyona etki göstermedi.



Şekil 4.36. Pentoksifilinin oluşturduğumuz modeldeki anksiyete-benzeri duygudurum, depresyon-benzeri duygudurum ve kognitif disfonksiyon üzerine etkileri. A. Pentoksifilinin anksiyete-benzeri duyguduruma etkisi. Pentoksifilin grubunun açık kolda geçirdiği süre, oluşturduğumuz modelin açık kolda geçirdiği süreden daha yüksekti (** $p < 0,01$). **B.** Pentoksifilinin depresyon-benzeri duyguduruma etkisi. Pentoksifilin hareketsiz kalınan süre ortalaması, oluşturduğumuz modelin hareketsiz kalınan süre ortalamasından daha düşük bulundu (** $p < 0,01$). **C.** Pentoksifilinin kognitif disfonksiyona etkisi. Pentoksifilin grubunun latans süresi, oluşturduğumuz modelin latans süresi ile benzer bulundu. (Grupların karşılaştırılmasında “bağımsız örneklem t testi” kullanılmıştır. Bar grafikler ortalama±standart hata değeri göstermektedir. Grup başına $n=8$ ’dir. Bu simgeler istatistiksel anlamlılığın p değeri derecesine göre yerleştirilmiştir. MOG: miyelin oligodendrosit glikoprotein; CFA: Freund’un tam adjuvanı; LPS: Lipopolisakkarit)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 1) LPS'nin O55:B5 4 mg/kg intraperitoneal uygulama dozunun Wistar albino dişi sıçanlarda KBB geçirgenliğini artırdığı bulundu. 2) Oluşturduğumuz (MOG+CFA+LPS) model ile rutin (MOG+CFA) modele göre, 23. günden itibaren başlayıp 70. güne kadar devam eden ve daha yüksek DOE skorunun sergilendiği kronik progresif DOE modeli elde edildi. 3) Oluşturduğumuz modelde, allodininin 10 hafta sürdüğü; motor tutulumun 6. haftada maksimuma ulaştığı ve sonraki haftalarda gerilediği; anksiyete-benzeri bulguların 6. haftada maksimuma ulaştığı ve 10. haftada hala devam ettiği; 10. haftada depresyon-benzeri duygudurum olduğu ve 6-10. haftalarda kognitif bozukluk geliştiği saptandı. 4) Oluşturduğumuz modelin histopatolojik değerlendirmesinde rutin modele kıyasla, 10. haftada belirgin santral inflamasyon belirlendi; beyaz cevherde görülen demiyelinizasyon rutin modele benzerken, modelimizde gri cevherde daha yüksek demiyelinizasyon skoru saptandı; subpial korteks ve hipokampüste daha belirgin miyelin kaybı olduğu; beyin ve spinal kord beyaz cevherlerinde ise rutin modele benzer miktarda miyelin kaybı olduğu bulundu. 5) Morfolojik mikrogliya aktivasyonu ve mikrogliyal sayı artışı, rutin modelde ağırlıklı olarak beyin ve spinal kord beyaz cevherinde, oluşturduğumuz modelde ise subpial korteks ve hipokampüste görüldü. 6) Oluşturduğumuz modelde, hem Sham grubuna hem de rutin modele göre serumda TNF- α seviyesinin yükseldiği, IL-1 β düzeyinin ise değişmediği belirlendi. 7) Elektrofizyolojik incelemelerde, rutin model ve tek başına CFA enjeksiyonu sonrası 2. haftada periferik sinir tutulumu belirlendi ve bu tutulum 6. haftada normale döndü. 8) Periferik sinir bulgularında 2. haftada sinirlerin hipoeksitabl olduğu ve 6. haftada tüm gruplardaki hipoeksitabilitenin gerilediği belirlendi. 9) Oluşturduğumuz modeldeki periferik sinir tutulumu bulgularının rutin model ile benzer olduğu, ancak modelimizde 6. haftada halen refrakter periyot süresi artışının devam ettiği saptandı. 10) Oluşturduğumuz kronik progresif MS modelinde intraperitoneal 100 mg/kg dozunda günlük pentoksifilin uygulaması, depresyon-benzeri duygudurumun; anksiyete-benzeri duygudurumun ve akut ile kronik mekanik allodininin tedavisinde etkin bulundu. 11) Pentoksifilin DOE skoruna, motor bulgulara ve kognitif bozulmaya etkisi ise saptanmadı. Oluşturduğumuz (MOG+CFA+LPS) model ile ilk defa olarak Wistar albino sıçanlarda, beyine direkt bir müdahale yapılmadan, davranışsal ve histolojik açıdan

progresif MS kliniğine kapsamlı benzerliğin sağlandığı, kronik progresif DOE modeli geliştirildi.

5.1. LPS'nin KBB Permeabilitesi Üzerine Etkisi

Patolojik durumlarda kan beyin bariyeri (KBB), bütünlüğünü kaybetmekte ve endotelial permeabilite artmaktadır. Böylece SSS, immün sisteme daha açık ve görünür hale gelmektedir (15). Çalışmamızda da DOE modeli oluşturulabilmesi için, KBB disfonksiyonu (geçirgenlik artışı) yaparak SSS'nin sistemik dolaşıma maruz kalması planlandı. Sıçanlarda KBB permeabilitesinde artış yapabilecek çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Ozmotik ve ultrasonik yöntemler bu konuda oldukça başarılıdır (128, 129). Fakat bu yöntemler ile KBB yalnızca mekanik olarak açılabilmekte, inflamasyon kaskadı tüm bileşenleri ile indüklenememektedir. LPS'nin kemirgenlerde KBB disfonksiyonu yaptığı ve sepsis-ilişkili ensefalopati modelinde kullanıldığı bilinmektedir (130). LPS'nin bu özellikleri dolayısıyla KBB hasarının yanında santral inflamasyonu da sağlayabileceği düşünüldü.

LPS'nin çeşitli suşlarının klinik etkilerinin ve bulgularının kullanılan hayvan çeşidi ve türüne bağlı olabileceği bildirilmiştir (131). Wistar albino dişi sıçanlarda da O55:B5 suşu ile hangi dozda ve hangi zamanda KBB hasarı görüleceği bilinmemektedir. Yaptığımız deneylerde 1 mg/kg LPS ile Wistar albino dişi sıçanlarda KBB permeabilitesinde değişiklik saptanmadı. LPS'nin 4 mg/kg dozunda da 4. saatte permeabilite değişikliği saptanmaz iken 18. saatte ise belirgin permeabilite artışı belirlendi. Bu dozda sıçanların hiçbirinde deney protokolü süresince mortalite olmadı. Farklı bir LPS türü ve farelerde yapılan Banks ve diğ. (132)'ne ait çalışmada da çalışmamızla benzer şekilde tek doz LPS enjeksiyonu sonrası 24. saatte sadece 3 mg/kg dozda KBB hasarı belirlenmiştir ve daha düşük dozlarda bu etkinin olmadığı raporlanmıştır. Kikuchi ve diğ. (15)'nin çalışmasında ise ensefalopati modelinde 18 mg/kg LPS ile farede 18. saatte KBB hasarı olduğu belirtilmiştir. LPS'nin 4 mg/kg dozu, KBB hasarı yaptığının belirlenmesi; literatürdeki dozlarla uyum içinde olması dolayısıyla DOE modeli oluşturulmasında kullanılacak doz olarak kararlaştırıldı.

KBB deneylerinde, korteks, orta beyin, hipokampus ve serebellum alanları bölgesel olarak değerlendirildi. KBB permeabilitesindeki artış korteks, orta beyin ve hipokampüste belirlenirken serebellumda ise saptanmadı. Phares ve diğ. (133), viral

olarak indüklemiş oldukları otoimmünite ve inflamasyon modelinde SSS'nin bölgesel etkilenme farklılığı olduğunu belirtmiş fakat çalışmamızla tam tersi şekilde serebellumda KBB permeabilitesinin serebral kortekse göre daha yüksek olduğunu raporlamıştır. Fakat bu çalışmada KBB permeabilitesi değerlendirmesi en az 6 gün sonra yapılmış ve LPS yerine viral ajan kullanılmıştır. Çalışmamızda incelenmiş olan 18. saatten sonraki bir zaman diliminde, serebellumun bu bulgusunun değişmiş olabileceği veya bahsedilen çalışmada 18. saatte bölgesel etkilenmenin belirtilenden farklı olabileceği düşünüldü.

5.2. Kronik Progresif Multipl Skleroz Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda MOG ile immünizasyon için 20 µg'lık doz seçildi. Bu doz literatürdeki dozlar ile karşılaştırıldığında oldukça düşük bir doz olarak gözükmektedir. DOE modeline yatkın olarak bilinen sıçan türleri için dahi, kullandığımız MOG türü (MOG₁₋₁₂₅)'nün 50 µg, 65 µg ve daha yüksek dozları uygulanmaktadır (134, 135). Antijenin ticari sağlayıcısının kullanım föyünde de yatkın sıçan türleri için 75 µg doz önerisi bulunmaktadır. Bu yüksek dozların yanında bu modellerde pertussis toksini enjeksiyonu da en az bir defa yapılmaktadır. Çalışmamızda diğer çalışmalara göre düşük bir doz seçilmesinin sebebi olarak, MOG'dan 3 hafta sonra verdiğimiz LPS ile hem bağışıklık yanıtının güçlendirilmesi hem KBB geçirgenliğinin programlı artırılması hem de santral inflamasyonun indüklenmesi düşünüldü. Ek olarak çalışmamızın pilot deneylerinde 40 µg'lık doz ile deneme yapılmış fakat çok şiddetli bir kinik tablo olduğu belirlenmiştir. Nöropsikiyatrik semptomların ve nörodejeneratif özelliklerin çalışılabileceği ve klinik progresyon ile daha uyumlu bir model elde edilebilmesi amacıyla kullandığımız doz seçilmiştir.

Çalışmamızda, Wistar albino sıçanlara immünizasyon sonrası 3. haftasında LPS enjeksiyonu yapıldı ve 10 haftalık takip sağlandı. Sıçanların belirli dönemlerde enjeksiyona bağlı kuyruk yaraları, bukkal bölgesinde yama şeklinde tüy dökülmeleri saptandı. Motawi ve diğ. (136), çalışmamıza benzer şekilde Wistar albino sıçanlarda DOE modeli çalışırken immünizasyon enjeksiyonu bölgesinde çalışmamızdakine kıyasla daha şiddetli lokal enfektif alanların oluştuğunu raporlamıştır. Diğer yandan otoimmün patolojiler dolayısıyla kemirgenlerde alopesi areata kliniğinin olduğu da

bildirilmiştir ve çalışmamızdaki bukkal tüy dökülmesi bu patolojiyi düşündürmüştür (137).

İmmünizasyon oluşturulurken kullanılan adjuvanın ve LPS'nin direkt etkilerinin dışlanması için oluşturulan CFA+LPS grubunda; LPS enjeksiyonu hemen sonrasında motor bulguların ortaya çıktığı saptandı. Bu bulgu tarafımızca, CFA gibi kuvvetli bir adjuvanın kullanmış olduğumuz dozunda yol açtığı non-spesifik immün sistem aktivasyonuna ek olarak, diğer ciddi bir immün aktivatör olan LPS'nin eklenmesiyle gelişen şiddetli inflamasyon kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlandı. İmmünohistopatolojik incelemelerde 6. haftada bu grupta belirgin santral inflamasyon belirlendi. Bu inflamasyonun da 10. haftaya doğru gerilediği görüldü. Daha önceki çalışmalara göre CFA'nın periferde inflamasyon yaptığı, LPS'nin hem periferde hem santralde inflamasyon yaptığı düşünülmektedir (138-140). Bu da LPS ile KBB geçirgenliği artışı aşamasıyla santralde güçlü bir inflamasyon indüklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulguların, klinik şiddeti düşük ensefalit veya menenjit gibi bir tablo kaynaklı olabileceği ve zamanla da gerilediği düşünüldü.

Klinik olarak MS hastalarının progresyonunda takip için EDSS skoru yaygın olarak kullanılmaktadır ve progresyon tanımı bu skorun belli süreler içerisinde belli artışlarını veya belli bir seviyede oluşunu içermektedir (141). MS'teki EDSS skorunun DOE için karşılığı DOE skoru olarak düşünülmektedir. Bu bağlamda kronik progresif DOE modeli sınıflaması bu skorun seyri sebebiyle belirtildi. Oluşturduğumuz modelin DOE skoru, LPS enjeksiyonu sonrasında 10. haftaya kadar her ölçümde rutin modele kıyasla daha yüksek bulundu. Modelimizin DOE skoru ortalaması kronik süreçte 1 civarında seyretti. Modelimizin; 10 haftalık DOE skoru seyri, belirlenen nöropsikiyatrik semptomları ve immünohistopatolojik sonuçları beraber düşünüldüğünde kronik progresif bir MS modeli elde edildiği sonucuna varıldı. Diğer yandan tanımlasını yaptığımız Modifiye DOE skoru ile de bu kronik progresif seyir daha belirgin ve hasas olarak dökümanite edildi.

5.3. Modelin Davranışsal Karakterizasyonu

Modelin oluşturulması sırasındaki deneylerde kaba ve zor farkedilen (*subtle*) ince motor disfonksiyon değerlendirmesi yapıldı. Bidgood ve diğ. (142), Parkinson Hastalığı fare modelinde rotarod gibi kaba motor değerlendirmesi yapan testlere göre

zor farkedilen ince motor etkilenmelerin belirlenmesi için “denge tahtası yürüme testinin” başarılı olabileceğini göstermiştir. Hem rutin DOE modelinde hem de oluşturduğumuz modelde 1. haftada toplam katedilen mesafenin Sham grubuna göre düşük olduğu bulundu. Fakat rotarod testinde oluşturduğumuz model ve rutin DOE modeli gruplarının motor disfonksiyonu 1. haftada saptanmadı. Ek olarak, 7. günde iki grubun da DOE skoru ortalaması sıfır olarak bulundu. Çalışmamızın bulguları ile DOE modelinde, DOE skoru ve rotarod ile belirlenemeyen motor bozuklukların belirlenmesinde açık alan arena testinin önemli katkısı olabileceği ortaya kondu. Diğer yandan açık alan arena testinin DOE modelinde yeni bir skora sistemi oluşturulmasında önemli parametreler sağlayabileceği düşünüldü.

Oluşturduğumuz model grubunun Sham grubuna göre allodini tüm haftalarda karşılaştırıldı. Bu test ile belirlenen allodini bulgusu, santral veya periferik nöropatik ağrıya olabileceği gibi inflamatuvar ağrıya da gösterge olarak kabul edilebilmektedir (143). Diğer yandan bu ağrının nöropatik ağrı olması durumunda, santral nöropatik ağrı mı yoksa periferik nöropatik ağrı mı olduğu ise bilinmemektedir. Çalışmamız periferik sinir elektrofizyolojik bulgularına göre oluşturduğumuz modelde, 2. haftada periferik sinir tutulumu belirlenirken 6. haftada böyle bir tutulum olmadığı saptandı. Sonuç olarak elde ettiğimiz elektrofizyoloji deneyi bulguları, oluşturduğumuz modelde 10. haftaya kadar devam eden mekanik allodininin periferik sinir kaynaklı bir ağrıdan ziyade santral kaynaklı bir ağrı olabileceğini işaret etmektedir.

MS hastalarının kliniğinde yaklaşık 3 hastadan birinin nöropatik ağrısının olduğu, DOE modellerinin de nöropatik ağrı mekanizmalarını çalışmak açısından son dönemlerde kullanıldığı bilinmektedir (144, 145). Çalışmamızda da rutin DOE modelinde 3. haftaya kadar süren allodini belirlenmiş olup farelerde yapılan DOE modelinde de 4. haftaya kadar sürebildiği raporlanmıştır (146). Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu, CFA’nın tek başına enjeksiyonu ile de 3 haftaya kadar süren allodini yapılabildiği oldu. CFA’nın sıçan ve farelerde ayak plantar yüzüne subkütan enjeksiyonu ile inflamatuvar ağrı modelinin yapılabildiği bilinmektedir (147). Fakat bu modellerde allodini testleri enjeksiyon uygulanan bölgede lokal olarak değerlendirildiğinden bu çalışmalarda çalışmamızda olduğu gibi sistemik etki bakılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızdaki şekliyle CFA ile indüklenen sistemik bir allodini olabileceği saptanamamıştır. Dahası ayak plantar yüzüne olan uygulama ile

kuyruk köküne olan uygulama arasında da etki farkı olabileceği de tarafımızca düşünüldü. Sonuç olarak 100 µl CFA içeren emülsiyon ile yapılan kuyruk kökü enjeksiyonu ile sistemik bir mekanik allodini geliştirilebileceği gösterildi.

MS hastalarının agresyonu konusunda çok belirgin bulgular olmasa da kontrol popülasyonuna göre daha yüksek agresyon göstermediği belirtilmiştir (148). Çalışmamız bulgularına göre de oluşturduğumuz modelde agresyon saptanmamış olup klinik veri ile uyumlu olarak düşünüldü.

MS hastalarının %36'sında anksiyete olduğu raporlanmıştır (149). Bu hastaların MS gibi bir hastalık tanısı dolayısıyla anksiyete tanısı almasının yanısıra amigdala, bazal ganglia ve serebral korteks bozukluklarının da anksiyetede rolü olabileceği düşünülmektedir (150). RRMS/DOE modeli ile yapılan bir çalışmada ise erkek Dark Agouti sıçanların sosyal interaksyon testinde anksiyeteleri belirlenmiştir (151). Modelimizde de özellikle 6. haftada görülen anksiyete-benzeri duygudurum geliştiği saptandı. Olası menstürel siklus etkilerinin ayırt edilmesi amacıyla yapılan analizlerde de anksiyete-benzeri duygudurum artışının sikludan bağımsız olarak artmış olduğu görüldü. Oluşturduğumuz model grubunda östrus ve diöstrus dönemlerine ait anksiyete-benzeri duygudurum seviyesinde farklılık bulunmadı. Diğer tüm gruplarda ise östrus dönemindeki sıçanların anksiyete-benzeri duygudurumunun diöstrus dönemine göre belirgin olarak yüksek olduğu saptandı. Oluşturduğumuz model grubunun siklus dönemleri arasında fark belirlenmemiş olması; modelimizde görülen şiddetli anksiyete-benzeri duygudurum dolayısıyla, testin alt sınırında satüre olunmasıyla açıklandı. Dişi sıçanların östrus döneminde daha anksiyetik olduğu daha önceki çalışmalarda bulunmuş olup çalışmamız bulgusu ile de uyumlu idi (152). Çalışmamızın immünohistopatolojik bulguları, modelimizde görülen anksiyete-benzeri duygudurum da önemli olabilecek hipokampus ve diğer limbik sistemin önemli alanlarından olan amigdalanın da demiyelinizasyona uğradığını gösterdi. Ek olarak, subpial bölge olarak incelenen alanlarda, medial prefrontal korteks ve daha özel olarak singulat girusta da demiyelinizasyon ve eşlik eden inflamasyon saptanması davranış deneyi bulgularını destekledi. Oluşturduğumuz modelde, belirlenen serum TNF- α yüksekliğinin de anksiyete-benzeri duygudurum veya ağrı ile ilişkisi olabileceği düşünüldü. Dib ve diğ. (153)'nin çalışmasında serumdaki TNF- α seviyesi yüksekliğinin stres davranışı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

MS hastalarının yaşam boyu majör depresyon tanısı alma prevalansı %50 civarında belirtilmektedir (154). Çeşitli DOE modellerinde depresyon-benzeri duygudurum olduğu da raporlanmıştır (155). Çalışmamızda da, rutin DOE modeli, oluşturduğumuz model ve CFA+LPS gruplarının Sham grubuna göre daha depresif olduğu görüldü. Modelimizde depresyon-benzeri duygudurumun 10. haftada en belirgin olarak ortaya çıktığı tayin edildi. Fakat depresyon-benzeri duygudurum 8. haftada CFA+LPS grubunda daha belirgin olarak belirlendi. Bu bulgular ile immunohistopatolojik bulgular beraber değerlendirildiğinde, 8. haftada CFA+LPS grubunda, 10. haftada ise MOG+CFA+LPS grubunda demiyelinizasyonun görüldüğü tek ortak alan beyin beyaz cevher bölgesi olarak belirlendi. Gao ve diğ. (156)'nin çalışmasında da, beyin beyaz cevherinin atrofisi ve demiyelinizasyonu durumunda sıçanlarda depresyon geliştiği bulunmuştur.

Kognitif disfonksiyon, MS'in tüm tiplerinde görülmekle beraber SPMS ve PPMS'te daha yüksek sıklıkta olduğu bildirilmiştir (157). MS kliniği ile uyumlu olarak çoğu DOE modelinde de kognitif disfonksiyon olduğu raporlanmıştır (158). Çalışmamızda oluşturulan model, tüm haftalarda belirgin kognitif bozulma gösterdi. Sıçanların kognitif değerlendirmeleri, motor semptomlardan en az etkilenmesi nedeniyle edilgen kaçınma testi ile yapıldı. Morris su labirenti testinde bu tür yanlış değerlendirmelerin olabileceği düşünüldü. Aharoni ve diğ. (159) de DOE modelinde kognitif disfonksiyon değerlendirirken aynı kaygı ile T labirenti testi tercih etmiştir. Fakat tarafımızca T labirenti testi ile; depresyonu da bulunan bir modelde anhedoni sebebiyle seçim yaptırılmasında zorlanılacağı ve yanlış değerlendirmelere yol açılacağı düşünüldü. Rutin model grubunda ise 6. hafta da dahil olmak üzere herhangi bir haftada kognitif bozulma saptanmadı. Rutin modelde kognitif bozulmanın saptandığı çalışmalar ile örtüşmeyen bu bulgumuzun sebebi ise çalışmamızdaki rutin modelin dirençli bir türde oluşturulmasıdır. Aynı şekilde CFA+LPS grubunda da Sham grubuna göre herhangi bir fark olmadı. Modelimizde görülen kognitif disfonksiyon hipokampusün belirgin demiyelinizasyonu ile açıklanabilmektedir. Diğer grupların hipokampal demiyelinizasyonu oluşturduğumuz modele göre oldukça düşük saptandı. Mikroglial aktivasyonun da oluşturduğumuz model grubunun hipokampusünde diğer gruplardan belirgin daha yüksek olması, hipokampüsteki yüksek inflamasyonun kognitif disfonksiyona katkı sağlayabileceğini düşündürdü.

Tüm bu davranış deneyi bataryasının, MS hastalığının progresyonu ile örtüşen bulgularının görüldüğü ve dirençli bir tür olan Wistar sıçanlarda, kronik progresif bir DOE modeli ilk defa bu çalışma ile oluşturuldu. Tarafımızca, hem DOE skorları hem de oluşturulan modelin davranış deneylerinde elde edilen grup içi bulgu benzerliği; MOG immünizasyonuna LPS enjeksiyonunun eklenmesi ile Wistar albino sıçan türündeki DOE modeli oluşturulma heterojenitesinin ortadan kaldırılmış olabileceğine işaret olarak yorumlandı.

5.4. Modifiye DOE Skorunun Geliştirilmesi ve Oluşturulan Modelde Kullanımı

Sıçanların çalışma süresince yapılan takiblerinde DOE skoru kullanıldı. Fakat bu skor, sadece paralizi ve belirgin motor disfonksiyonları belirlemek amaçlı bir değerlendirmedir. DOE skorunun relapslar ile giden hastalık tipinde ve relaps döneminde klinik durumu belirlemekte çok önemli rolü olsa da progresif sürecin çoklu sistemik tutulumu bu skor ile ortaya konmaya çalışılırken yetersizlikler farkedildi. Bu sebeple tarafımızca “Modifiye DOE skoru” geliştirildi. Bu yeni skora ile sıçanların ince motor bozulukluklarını, genitoüriner sistem tutulumlarının ve progresif nörolojik bulgularının değerlendirmeye katılması hedeflendi.

Çalışmamızda rotarod test sonuçlarının DOE skoru sonuçlarına yansırken lokomasyon sonuçlarının DOE skoruna yansımada farkedildi. Ek olarak MS hastalarında ve DOE modelinde yorgunluk semptomu da görülebilmektedir (160, 161). Bu sebeplerle 1 saat süren açık alan arena testinin yorgunluk ve ince motor etkileneceklerinin ortaya konmasında kullanılabileceği tarafımızca düşünüldü. Maksimum hız ve toplam katedilen mesafe değişkenleri için eşik değerler belirlenerek kategorik olarak skora yapılabilmesi sağlandı. Daha sonra belirlenen eşik değerler ile; oluşturduğumuz modelimize uygulama yapıldığında elde edilen sonuçlarda toplam katedilen mesafe pozitifliği parametresi için kronik süreçte %100 pozitifliğe ulaşıldığı ve progresif kronik sürecin oldukça başarılı olarak olarak gösterilebildiği belirlendi. Diğer yandan aynı parametrede Sham grubunda da kronik süreçte %50 civarında pozitiflik belirlendi. Açık alan arena testinde toplam katedilen mesafe değişkeni sıçanların eksploratif davranışları (162) ile ilintili olduğundan, testin çalışmamızda her hafta tekrarlanması sebebiyle Sham grubunda da bu düşüşün görülebileceği

düşünüldü. Bu duruma çözüm olarak, toplam katedilen mesafe parametresinin eşik değerinin her defasında sıçanların bir önceki haftasında ölçülen değerlerine göre güncellenmesinin bu tür durumların önüne geçebilmesi için uygun olabileceği düşünüldü.

MS hastalarının genitoüriner sistem enfeksiyonu sıklığının %30 civarında olduğu, bazı raporlara göre ise yaşam boyu yakalanma riskinin de %80 olduğu tahmin edilmektedir (163). Klinik olarak yapılan bir çalışmada, genitoüriner sistem enfeksiyonu geçiren hastaların ileri yaş, erkek ve progresif tip MS hastaları olma sıklığı daha yüksek belirlenmiştir (164). MS hastalığında özellikle spinal bölgelerde görülen plaklar dolayısıyla innervasyon bozukluğuna bağlı mesane disfonksiyonu gibi çeşitli alt üriner sistem ilintili problemler görülebilmektedir (165). MS hastalarındaki bu tutulumun benzeri olarak farelerde oluşturulan DOE modelinde de mesane disfonksiyonu görüldüğü gösterilmiştir (166). Ek olarak, oluşturduğumuz modelin immünohistopatolojik bulgularında üriner sistem regülasyonu yaptığı bilinen spinal kord, medyal prefrontal korteks ve insula gibi alanların da demiyelinizasyon tutulumu belirlendiğinden bu tür bir değerlendirme daha da elzem hale gelmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda, sıçanlardan non-invaziv olarak toplanan idrar örneklerinde mesane disfonksiyonunu indirekt gösterebilecek lökosit ve nitrit parametreleri pozitifliğinin modelimizde belirgin olarak arttığı bulundu.

Sıçanların kronik takibinde, nörolojik skorlamalarda kullanılan kuyruktan kaldırılma sırasında ön ve arka patilerin fleksiyon-ekstansiyon durumu da belirlendi. Bu parametrenin DOE skorunda da progresyon açısından bulunması gerekliliği düşünüldü. Ön pati pozitifliği, tüm deney gruplarında süreç boyunca oldukça az sıklıkta belirlenmesine rağmen, arka pati pozitifliği özellikle modelimizin kronik sürecinde ciddi bir pozitiflik gösterdi.

Deney gruplarının belirlenen tüm parametreler ile saptanan “modifiye DOE skoru” sonuçları, oluşturduğumuz modelin zor farkedilen motor değişiklerini belirlemede, üriner sistem tutulumunu ortaya koymada ve ek nörolojik incelemel yapmakta oldukça başarılı bulundu. Modifiye DOE skoru ile, DOE modelinin çoklu sistemik tutulumunu kapsayan ve kronik progresif sürecini dökümante edebilecek yeni

bir değerlendirme aracı geliştirildi. Diğer yandan MS hastalarının klinik takibinde kullanılan EDSS skoruna da bu tür modifikasyonlar yapılabileceği düşünüldü.

5.5. Modelin Histopatolojik Karakterizasyonu

Çalışmamızda HE boyamasında rutin model, CFA+LPS ve oluşturduğumuz model gruplarının Sham grubuna göre inflamasyon skorunun arttığı belirlendi. Rutin model ve CFA+LPS gruplarında inflamasyon 6. haftada zirve yaparken ilerleyen haftalarda geriledi. Oluşturduğumuz modelde ise tüm haftalarda inflamasyon belirgin olarak devam etti. MS'in kronik sürecinde, demiyelinizasyon ve nörodejeneratif bileşenler yanında inflamatuvar bileşen de oldukça önemlidir (167). LPS ile santral inflamasyon indüklendiği daha önceki bölümlerde belirtildi fakat bu indüklemeye, tek seferlik LPS enjeksiyonu ile akut sayılabilecek dönemlerde gerçekleşmektedir (168, 169). Çalışmamızda bakıldığı gibi LPS enjeksiyonundan en az 3 ve en fazla 7 haftalık süreç sonunda santral inflamasyon olduğunu belirten çalışmaların hepsinde, LPS enjeksiyonu kronik ve tekrarlı olarak hatta çoğu zamanda direkt santrale (icv) uygulanarak yapılmıştır (170, 171). Bizim çalışmamızda en uzun süre skalasında tek LPS'nin periferik enjeksiyonundan 7 hafta sonra sıçanların santral inflamasyonu değerlendirildi. Sham grubumuz ile bu kadar süre sonra inflamasyon olmadığı saptandı. CFA veya MOG ile immünizasyon üzerine LPS uygulanması durumlarında ise belirgin santral inflamasyon saptandı. Böylece, LPS öncesi yapılmış ek bir immünmodülasyonun, bağışıklık yanıtının uzun süre sürdürülmesinde ve santral etkilerin devamında önemli olduğu belirlendi.

Beyinde demiyelinizasyon açısından değerlendirme yapıldığında, beyaz cevher ve perivasküler alanlarda DOE modeli olmayan CFA+LPS grubunda DOE gruplarına göre daha az düzeyde de olsa demiyelinize alanlar görüldü. Bu grupta subpial alanlarda ise demiyelinizasyon görülmedi. Çalışmamızda, LPS sonrası endotelial hasara sekonder vasküler alanda demiyelinize alanlar görülmesi, non-spesifik immün aktivasyonun ve bu alanlarda görülen dejeneratif sürecin sonucu olarak düşünüldü. Zamanla periferde immün regülasyonun tekrar sağlanmasına bağlı olarak 10. haftaya doğru demiyelinizasyonun belirgin azalması da bu hipotezi desteklemektedir. Oluşturduğumuz modelin demiyelinizasyon skoru subpial korteks ve perivasküler alanda, rutin modele kıyasla daha yüksek iken, beyaz cevherde böyle

bir fark görülmedi. Bu bulgu da, LPS ile KBB hasarı aşamasının eklenmesinin gri cevherdeki demiyelinizasyonu artırdığını gösterdi. Felts ve diğ. (172) de bizim çalışmamızdaki etki mekanizmasından çok farklı bir yol ile direkt SSS enjeksiyonu şeklinde intraspinal LPS uygulamasıyla inflamasyon ve primer demiyelinizasyon geliştirilebileceğini göstermiştir.

5.6. Modelin İmmünoperoksidaz İncelemeler ile Demiyelinizasyon ve Mikroglia Aktivasyonu Açısından Karakterizasyonu

MBP ile yapılan boyamalarda değerlendirdiğimiz gri cevher alanlarından subpial korteks ve hipokampüste hem rutin modelde hem de oluşturduğumuz modelde demiyelinizasyon saptandı. Gelişen demiyelinizasyonun, modelimizde rutin modele kıyasla belirgin olarak daha yüksek olduğu görüldü. Oluşturduğumuz modelde tüm haftalarda demiyelinizasyon saptandı. Bu sonuçlar modelimizde ortaya çıkan gri cevher demiyelinizasyonun kronikleştiğini gösterdi. Diğer yandan CFA+LPS grubunda histopatolojik yöntemle belirlenen düşük düzeyli demiyelinizasyon immünoperoksidaz inceleme sonuçlarında gri cevher alanlarında saptanmadı.

Subpial korteks olarak değerlendirdiğimiz bölgede yer alan retrosplenial kortekste belirgin demiyelinizasyon saptandı. Hipokampus ile benzer şekilde bu bölgenin de kognitif fonksiyonlarla belirgin bağlantısı olduğu bilinmektedir (173, 174). MS hastalarında ise talamusun; hipokampus, amigdala, singulat korteks, orbitofrontal korteks, retrosplenial korteks gibi kognisyon ilişkili alanların bağlantı projeksiyonlarında demiyelinizasyon görülmüştür (175).

Beyaz cevher, beyinde ve spinal kordta MBP ile de değerlendirildi. Rutin DOE modeli ve oluşturduğumuz modelde hem beyin beyaz cevherinde hem spinal kord beyaz cevherinde belirgin demiyelinizasyon saptandı. Progresif tip MS'te, kortikal demiyelinizasyon önemli bir bileşen olsa da, DOE modelinin MS kliniğine benzerliğinin en önemli durumlarından biri de beyaz cevher demiyelinizasyonunun bulunmasıdır. Üçal ve diğ. (12)'nin oluşturduğu, kortikal demiyelinizasyon ile giden DOE modelinde olduğu gibi, sadece kortikal demiyelinizasyon modeli, MS kliniğinin ve MS'in birbiri ile iç içe geçmiş patofizyolojik temelini kapsamlı değerlendirmesini sağlayamamaktadır. Bu durum modelimizde, eşlik eden belirgin beyaz cevher

demiyelinizasyonunun da bulunması ile önemli bir validasyonu daha sağlandığını ortaya koydu.

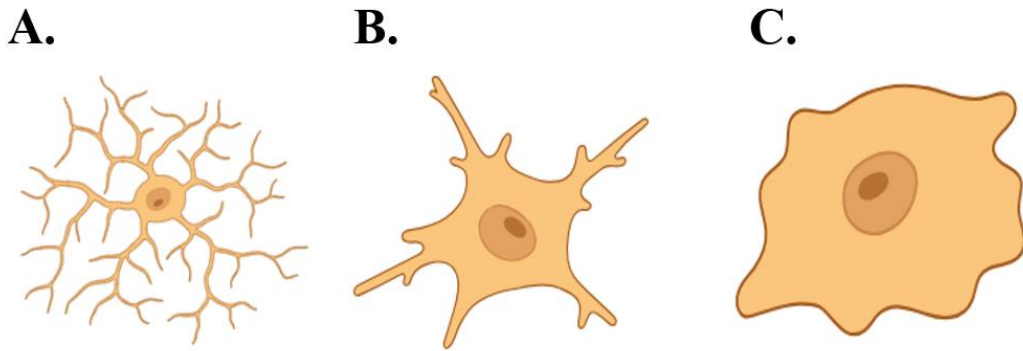
Beck ve diğ. (176) tarafından 2022 yılında yayınlanan ve MS hastalarının MRG bulgularının incelendiği çalışmada, kortikal lezyonların progresif tip MS'te daha yaygın olduğu ve subpial bölgede bu hastaların ciddi bir lezyon yükü olduğu belirlenmiştir. Subpial lezyonların en belirgin olarak görüldüğü beyin anatomik bölgeleri ise yardımcı motor korteks, singulat korteks veya supramarjinal girus gibi bizim çalışmamızda da benzer olarak etkilenen bölgeler olmuştur.

Tüm bulgularımıza ek olarak CFA+LPS grubunda MBP boyamasında demiyelinizasyon saptanan tek yer beyin beyaz cevheri olarak bulundu. Bu anlamda spesifik bir antijen içermeden yapılan adjuvan immünizasyonuna LPS'nin eklenmesi ile primer demiyelinizasyonun yapıldığı yeni bir modelleme ortaya konmuş oldu. Beyaz cevherde primer demiyelinizasyon çalışmaları için kuprizon ve lizolesitin modelleri kullanılmaktadır (177). Fakat bu modellerde, demiyelinizasyonun immün patofizyolojisi dışlanmaktadır. CFA+LPS grubu ile belirlediğimiz beyaz cevher demiyelinizasyonunun, immün patofizyolojik bileşeni de içermesi önemli bir avantaj olarak düşünüldü. İzole demiyelinizasyon çalışmaları için bu bulgumuz oldukça önemli yeni bir modelin ortaya konabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda mikrogliyal değerlendirmeler için kullanılan IBA1 boyamasında; oluşturduğumuz modelde mikrogliya sayısının, subpial kortekste diğer tüm gruplara göre belirgin olarak arttığı bulundu. Hipokampüste ise mikrogliya sayısı Sham grubuna göre tüm gruplarda artmıştı. Beyin beyaz cevherinde, mikrogliya sayısı rutin model ve oluşturduğumuz modelde artmış; fakat rutin modeldeki artış, oluşturduğumuz modelden belirgin olarak daha yüksek idi. Spinal kord beyaz cevherinde ise aynı şekilde en yüksek artış rutin DOE modelinde saptanmış olup oluşturduğumuz modelde rutin modele göre düşük olsa da hala anlamlı artış mevcuttu. Oluşturduğumuz modelde, LPS'nin KBB geçirgenliğini artırması aşamasının eklenmesi ile mikrogliyal proliferasyonun rutin modele kıyasen beyaz cevherden gri cevhere migrasyonu sağlandı. Rutin DOE modellerinde mikrogliyal ana aktivite spinal kord bölgesinde gerçekleşmektedir. Pertusis toksininin intraserebroventriküler olarak direkt beyne enjeksiyonu ile spinal kordta beklenen mikrogliya proliferasyonunun beyne

migrasyonu sağlandığı belirtilmiştir (126). Çalışmamız bulguları, DOE modelinin immün aktivasyonunda yaptığımız LPS modülasyonu ile; mikroglia migrasyonunu beyaz cevherden gri cevhere kaydırığımızı ortaya koydu.

Mikroglialar patolojik olmayan durumlarda sessizdir ve bu dinlenme halleri ramifiye mikroglia olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızda tek başına CFA verilen grup da dahil olmak üzere Sham grubu haricindeki tüm gruplarda mikroglial aktivasyon belirlendi. Aktive mikroglia'yı ameboid mikroglia olarak belirten çalışmalar olduğu gibi aktive mikrogliaların ramifiye ile ameboid arasında bir form olabileceğini belirten yayınlar da mevcuttur (178). Aktive mikrogliaların en belirgin özellikleri ise morfolojik olarak yuvarlak, geniş gövdeli ve kalın çıkıntılardan oluşmasıdır (179). Dinlenmedeki ve aktive mikroglia, aktivasyonun gücüne ve inflamasyon sürecinin zaman çizelgesine bağlı olarak geniş bir ara fenotip yelpazesini sınırlayan iki zıt morfolojik tip olarak düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda belirlenen mikroglialar da bu fenotipin iki ucu arasında saptanmış ve aktivasyon açısından şematizasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Mikroglia morfolojik özellikleri. A. Ramifiye mikroglia. B. Aktive mikroglia. C. Ameboid mikroglia. (Bu şekil Biorender.com ile oluşturulmuştur.)

5.7. Modelin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu

Çalışmamızda oluşturduğumuz modelin davranış deneylerinde mekanik allodini saptandı. Bu mekanik allodini, MOG ile indüklenen nöropatik ağrının bir

yansıması olarak düşünüldü. Bu ağrının periferik sinir hasarından mı yoksa santral bir hasardan mı kaynaklı olduğunun aydınlatılması amacı ile, sıçanların *in vivo* periferik sinir elektrofizyolojisi değerlendirildi. Bulgularımızda modelin 2. haftasında henüz LPS uygulaması yapılmamış iken, hem CFA hem de MOG+CFA grubunda kuyruk sinirinin iletim hızının göstergesi olan latans parametresinde anlamlı uzama belirlendi. Bu bulgu, rutin kullanılan modelde 2. haftada belirlenen nöropatik ağrının periferik sinir hasarı ilişkili bir bileşeni de olabileceğini düşündürdü. Teixeira ve diğ. (127)'ne ait 2020 yılı çalışmasında da çalışmamızla uyumlu olarak, MOG ile indüklenen DOE modelinde farelerin 2 ve 4. haftalarında periferik sinir tutulumu olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular rutin DOE modelinin MS hastalığına benzerliği konusunda ise yeni bir soru işareti oluşturmaktadır. Çünkü klinik olarak MS hastalarının nöropatik ağrısı olduğunda bunun santral kaynaklı olduğu düşünülmektedir, periferik elektromiyografi (EMG) değerlendirmesinde bulgusu olmadığı görülmekte ve MS hastalarının rutin takibinde periferik EMG incelemesi önerisi yapılmamaktadır (145, 180). Fakat MS'in periferik sinir bulgusunun hiç olmadığı varsayımı da doğru gözükmemektedir ve ilerleyen süreçte MS hastalarının periferik sinirlerinin hem histolojik hem elektrofizyolojik bulguları olabileceği de gösterilmiştir (181). Diğer yandan çalışmamızda, CFA grubunda da 2. haftada hem latans hem maksimum amplitüd açısından tutulum belirlendi. Teixeira ve diğ. (127)'nin yaptığı çalışmada model grubu, CFA olarak belirlenen kontrol grubuna göre latans açısından daha yüksek tutulum göstermiştir. Fakat o çalışmada CFA enjeksiyonunun olmadığı bir kontrol grubuna karşı kıyas yapılmamıştır. Bu sebeple çalışmamız, CFA grubunun Sham grubuna göre belirlenen bu farkını literatürde ilk kez gösterdi. CFA grubunun periferik sinirinde görülen bu iletim yavaşlaması ve maksimum amplitüd azalmasının sebebi tarafımızca, CFA'nın kuyruk bölgesine yapılan enjeksiyon ve direkt periferik hasar yollarıyla olabileceği şekliyle yorumlandı. Çünkü daha önce artrit modeli olması amacıyla subkütan CFA enjeksiyonu yapılan sıçanların çalışmalarında nöropatinin histolojik olarak gelişebileceği gösterilmiştir (182). Bileşik kas aksiyon potansiyeli kayıtlarımız da bileşik sinir potansiyeli kayıtlarımızla uyumlu bulundu.

Sıçanların protokolümüze göre 6. haftada değerlendirilen periferik sinir elektrofizyoloji sonuçlarında hiçbir grupta latans ve maksimum amplitüd parametrelerinin farklı olmadığı belirlendi. 2. haftada değişim belirlenen grupların

tümünde 6. haftada bazale dönüş görüldü. Oluşturduğumuz modelde 6. haftada ve ilerleyen haftalarda mekanik allodini belirlendiği ve 6. haftada periferik sinir elektrofizyolojik bulgusu olmadığı bulguları beraber değerlendirildiğinde; oluşturduğumuz kronik progresif DOE modelimizde santral nöropatik ağrının da oturduğu düşünüldü. 6. hafta bileşik motor aksiyon potansiyeli bulguları da sinir aksiyon potansiyeli açısından yapılan değerlendirmeleri destekledi.

Periferik sinir elektrofizyolojisi deneylerinde ek olarak refrakter periyot değerlendirmesi yapıldı. Bu bulgumuza göre 2. haftadaki ve 6. haftadaki refrakter periyot ölçümleri bileşik sinir aksiyon potansiyeli verilerine benzer bulundu. Fakat, sadece 6. haftada oluşturduğumuz model grubunun refrakter periyot süresindeki artış belirgin olarak devam etti. Periferik duysal sinir kaydında refrakter periyot için değişme olduğunu belirten ve RRMS hastalarını içeren nadir olarak sadece 1978 yılına ait bir yayın bulundu (183). Tarafımızca, belirlenen bu bulgu da santralden gelen aktarım ağında ara bir noktada demiyelinizasyon kaynaklı, aksiyon potansiyellerinin oluşum veya repolarizasyon fazının uzamasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlandı. Klinik olarak ise özellikle progresif süreci belirgin MS hastalarında periferik EMG değerlendirmesinde rutinde olmayan refrakter periyot değerlendirmesi ile ek bulgulara ulaşılabilceği önerisi düşünüldü.

5.8. Oluşturduğumuz Modelde Pentoksifilin Etkisi

Davranışsal, immünohistopatolojik ve elektrofizyolojik olarak karakterize edilen kortikal demiyelinizasyon ile giden kronik progresif DOE modelimizde 100 mg/kg dozunda günlük TLR4 antagonisti olan pentoksifilin uygulamasının tedavi edici etkisi araştırıldı. Correa ve diğ. (98) tarafından kobay spinal kord homojenatının enjeksiyonu ile Lewis sıçanlarda elde edilen rutin DOE modelinde pentoksifilin etkisi araştırılmış ve bu çalışmada sıçanların DOE skorunun 15 günlük seyirde azaldığı belirlenmiştir. 1993 yılına ait başka bir çalışmada da rutin DOE modelinde pentoksifilin klinik düzelme sağladığı belirtilmiştir (99). Çalışmamızda pentoksifilin DOE skoru üzerine herhangi bir etkisinin saptanamama sebebi olarak progresif kronik DOE modeli kullanılması olduğu düşünüldü. Diğer bir yandan pentoksifilin uygulandığı gün ve süre dolayısıyla progresif patolojinin oturduğu ve TLR4 antagonizması için geç kalındığı ihtimali akla gelmektedir. Bu bağlamda

pentoksifilin; TLR4 agonisti olan LPS enjeksiyonu ile aktive edilmesinden önceki 2. haftada uygulama yapıldığı ek protokoller ile pentoksifilin progresif sürece etkisi araştırılabilir olarak düşünüldü. Ek olarak pentoksifilin ile sıçanların haftalık motor testlerinde de herhangi bir etki görülmedi. Pentoksifilin DOE modelimizde motor tutulumu barındıran özellikler açısından etkisi saptanmadı.

Pentoksifilin uygulanan grupta oluşturduğumuz model grubuna göre 4 ve 5. haftada fark belirlenmezken 6. haftada iyileşme görüldü. Pentoksifilin ilk verilme anında saatlik yapılan yakın izlemde de yarım ve 1. saat izleminde akut etki olarak mekanik allodinide tamamen iyileşme yaptığı belirlendi. Yapılan doz analizine göre aynı saatlerde 50 mg/kg pentoksifilin ile de bazale göre fark belirlendi ve akut iyileşme etkisi bortaya kondu. Daha önce yapılan bir klinik çalışmaya göre diyabetik distal polinöropatide pentoksifilin 2 aylık kullanımı ile belirgin iyileşme sağlandığı belirtilmiştir (184). Daha önce yapılan çalışmalarda santral nöropatik ağrı için kullanımına rastlanmasa da pentoksifilin sıçanlarda paklitaksel ile oluşturulan “kemoterapi ile indüklenmiş nöropatik ağrı” modelinde hem akut hem de kronik kullanımda etkili olduğu belirlenmiştir (18). Çalışmamız bulguları da düşünüldüğünde en önemli örneklerinden birinin MS olduğu santral nöropatik ağrı için pentoksifilin hem akut hem de kronik dönemde önerilebilir bir tedavi adayı olarak düşünüldü.

Oluşturduğumuz model 6. haftada belirgin olarak kognitif disfonksiyon geliştirdi ve 2 haftalık pentoksifilin tedavisi ile bu bulguda düzelme sağlanamadı. Daha önce yapılan bir çalışmada pentoksifilin 50 mg/kg dozunda kognitif iyileşme sağlanacağı bildirilmiş olup ilgili çalışmadaki iyileşmenin rutin kognitif duruma göre olduğu ve bizim modelimizdeki gibi çok yönlü bir patoloji dolayısıyla gelişmiş bir kognitif disfonksiyon olmadığı akılda tutulmalıdır (185).

2 hafta boyunca pentoksifilin tedavisi alan sıçanların nöropsikiyatrik semptomları değerlendirildiğinde depresif-benzeri ve anksiyete-benzeri duygudurumlarında düzelme olduğu bulundu. Bu etkinin daha önce belirtilen ağrı parametrelerindeki düzelme dolayısıyla mı yoksa direkt bir etki mi olduğu ise bilinmemektedir. Oluşturduğumuz modelin çok yönlü özellik profiline benzemese de daha önceki bir çalışmada pentoksifilin 2 haftalık tedavisiyle izole depresyon-benzeri duygudurumun azaltılmasında etkili olduğu belirlenmiştir (186). Dahası klinik

çalışmalar ile de pentoksifilin majör depresyonda kullanımı önerilmiştir (187). Sıçanlarda lityum-pilokarpin ile indüklenen epilepsi modelinde pentoksifilin anksiyete-benzeri duygudurumu belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (188). Çalışmamız bulguları değerlendirildiğinde kronik progresif MS kliniğinde pentoksifilin kronik kullanımda depresyon ve anksiyete ilişkili duygudurum bozukluklarında olumlu etkisi olabileceği düşünüldü.

5.9. Çalışmamızın Kısıtlılıkları

Çalışmamızda LPS ile KBB permeabilitesinin artışı ayrı bir protokolda gösterildi. Fakat MOG ile indüksiyon yapılmış sıçanlarda LPS uygulamasıyla KBB permeabilitesinin durumu belirlenmedi. Beklenen durum, bu sıçanlarda da KBB permeabilitesinin artmasıdır. Fakat önemli bir kısıtlılık olarak yine de göze çarpmaktadır.

Oluşturduğumuz modelin ve mekanik allodini belirlenen diğer grupların 2. hafta gibi ara zaman döneminde periferik sinirlerinin histopatolojik olarak değerlendirilmemesi, bu haftalardaki allodinin ağrı çeşidi anlamındaki yorumlanmasında zorluklar oluşturmaktadır.

Yapmış olduğumuz immünohistopatolojik incelemelerde subpial korteksin belirgin demiyelinizasyonu saptandı. Subpial korteks alanlarından biri de vizüel kortektir. Ek olarak immünojik indüksiyonlarda ve MS hastalığının doğal seyrinde optik nörit atakları veya hafif optik sinir tutulumları olabilmektedir. Çalışmamızda değerlendirilen çoğu davranış deneyi, görme komponentinin intakt olmasını gerektirmektedir. Sıçanların takibinde klinik olarak bir bulgu belirlenmese de bu ihtimal akılda tutulmalıdır.

Oluşturduğumuz progresif DOE modeli motor semptomlara nazaran motor olmayan semptomların daha belirgin olduğu bir model olsa da kronik süreçte DOE skoru ortalaması 1'e yakın seyretmektedir. Kuyruk paralizi veya zayıflığının yüzme ilişkili bir testte değerlendirme sorunları oluşturabileceği akılda tutulmalıdır (189). Pentoksifilin tedavisinin DOE skoruna etki etmediği halde oluşturduğumuz modelde görülen depresyon-benzeri duygudurumun tedavisinde etkin olduğu belirlendi. Bu bulgumuz bahsedilen endişeyi azaltsa da tam anlamıyla bertaraf etmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) LPS'nin O55:B5 suşunun 4 mg/kg dozu ile Wistar albino dişi sıçanlarda 18. saatte KBB geçirgenliğinde artış sağlanabildiği bulundu. Beyin bölgesel olarak incelendiğinde; korteks, orta beyin ve hipokampüste permeabilite artışı varken serebellumda olmadığı saptandı. Çalışmamızda LPS'nin bu dozu ve özelliği ile; periferde oluşturulan antikorların ve immün sistem aktivasyonunun santral sinir sistemini de görür hale getirmesi ve santral inflamasyon tetiklemesi amaçlandı. Ek olarak, LPS'nin bu özelliklerinin bölgesel ve temporal olarak aydınlatılması ile ilaçların santrale geçişinin sağlanmasında; hem bölgesel hem de zamansal programlama yapılabileceği düşünüldü.

2) Wistar albino sıçanlarda, belirlenen 4 mg/kg LPS dozunun 3. haftada KBB geçirgenliği artırmak ve santral inflamasyon tetiklemek için kullanıldığı, MOG ile indüklenmiş DOE modeli oluşturuldu. Oluşturduğumuz modelin DOE skoru ile takibinde rutin modele kıyasla 7 hafta daha uzun süren ve progresyon gösteren bir model elde edildi. MS'in progresif tipleri ve süreci için oldukça az sayıda tedavi seçeneği mevcuttur. Mevcut olanların tedavi başarısı da tartışmalıdır. Progresif sürecin kliniğine mümkün olan en fazla açıdan benzeyen yeni bir hayvan modeli ile olası yeni ilaçların denenmesine ve klinik çalışmaya geçen ilaçların da başarı yüzdesinin artırılabilmesine olanak sağlanmıştır.

3) Oluşturduğumuz modelin, kronik progresif MS kliniğinde olduğu gibi; ilerleyici motor disfonksiyonları, depresyon-benzeri duygudurumu, anksiyete-benzeri duygudurumu ve kognitif disfonksiyonu olduğu belirlendi. Modelimiz ile, MS hastalarının hayat kalitesini azaltmakta çok belirgin rolü olan nöropsikiyatrik semptomların çözümlenmesine olanak sağlanmıştır.

4) Oluşturduğumuz modelin, tüm haftalarda hem Sham grubuna hem de sıçanların kendi bazal ölçüm değerine göre mekanik allodinisi olduğu belirlendi. Bu allodininin, kronik süreçte santral nöropatik ağrının davranışsal bulgusu olduğu düşünüldü. MS hastalarında nöropatik ağrı, oldukça sık görülen ve rutin tedavi ilaçlarının haricinde tedavi seçeneği olmayan bir ek semptomdur. Bu model ile santral nöropatik ağrı, daha izole ve daha spesifik olarak araştırılabilecektir. Oluşturduğumuz model ile yapılacak ileri çalışmalarda periferik sinirlerin ve optik sinirin

immünohistopatoloji veya ek metodolojiler ile araştırılması da önemli bulgular sağlayacaktır.

5) Çalışmamızda oluşturulan kronik progresif DOE modelinin takibinde, DOE skorunun belirgin motor bulguları ortaya koymak haricinde yetersiz kaldığı görüldü. Bu bağlamda, üriner sistem tutulumunun endirekt göstergeleri, zor farkedilen ince motor bulguların göstergeleri ve kronik progresyonda görülebilecek nörolojik göstergeleri içeren yeni bir skora olan “Modifiye DOE skoru” tarafımızca geliştirildi. Bu skoru puanlaması 0 ile 18 arasında değişmektedir ve bilinen DOE skorunu da bileşen olarak içermektedir. Modifiye DOE skoru geliştirilirken araştırılan parametrelerde, açık alan arena testinin parametreleri başarılı bulundu. Non-invaziv olan bu testin uygun karşılığı ile MS kliniğinde de kullanılabilmesi tarafımızca önerilmektedir. MS hastalarının üzerinde halihazırda bulunan telefon gibi bir cihaz uygulamasıyla, rutin hareket durumu incelenebilir ve bu veriler ile MS’in seyri öngörülebilir olarak düşünülmüştür.

6) Oluşturduğumuz modelde dişi sıçan kullandığımız ve davranış komponentleri incelediğimiz için siklus dönemi tayini yapıldı. Modelimizdeki anksiyete-benzeri duygudurum ve depresyon-benzeri duygudurum problemlerinin siklus döneminden etkilendiği saptandı. Diöstrus döneminin ise östrus dönemine göre duygudurum değişikliklerini saptamak adına daha yüksek test alanı sağladığı bulundu. Dişi modellerde davranış deneyinin yapılmasının planlandığı deney protokollerinde özellikle diöstrus döneminde test yapılmasına dikkat edilmesi tarafımızca önerilmektedir.

7) Oluşturduğumuz modelde, progresif MS’te daha belirgin olduğu bilinen kortikal demiyelinizasyon saptandı. Subpial bölge başta olmak üzere hipokampusun da dahil olduğu yaygın gri cevher tutulumu belirlendi. Santral inflamasyonun da güçlü olduğu görüldü. Bu özellikleri ile modelimiz; kronik progresif MS kliniğini, patofizyolojisini ve tedavi olasılıklarını araştırmak için başarılı bir yöntem olarak değerlendirildi. Ek olarak mikrogial aktivasyonun da belirgin olması, MS’in nörodejeneratif bileşenlerinin kapsamlı olarak çalışılmasına olanak sağlamaktadır.

8) MS’in tedavisinde, monoklonal antikorlar gibi çeşitli uzun dönem etkinlik araştırması gerektiren ilaçlar incelenmektedir. Oluşturduğumuz model, 10. haftasına

kadar karakterize edilmiş ve bu anlamda uzun vadeli ilaç etkinliği araştırmalarına olanak sağlayabileceği düşünülmüştür. Daha uzun sürelerde veya daha şiddetli kliniklerde model gereksinimi olur ise de; bunların LPS'nin doz artırımı ve tekrarlı enjeksiyonları ile modüle edilebileceği düşünülmüştür.

9) MOG ile indüklenen modelde 2. haftada periferik sinir hasarı olduğu çalışmamızda elektrofizyolojik olarak gösterildi. MS kliniğinin erken evreleri için klinikle uyuşmayan bu bulgusu DOE modellerinde eksik bir yan olarak göze çarpmaktadır. Oluşturduğumuz modelin 6. haftasında tüm MS kliniği devam ederken elektrofizyolojik olarak periferik sinir tutulumu olmadığı belirlendi.

10) Periferik sinir elektrofizyolojisi deneylerinde 6. haftada, oluşturduğumuz modelin tek bulgusu refrakter periyodun artışıdır. MS kliniğinde rutin EMG takibi önerisi olmasa da bu tanıdan şüphelenilen hastaların periferik EMG testlerinde refrakter periyot tayini yapılması tarafımızca önerilmektedir. Bu inceleme ile hem ayırıcı tanı hem de santral sinir sistemi tutulumuna gösterge ek bir veri sağlanabilecektir.

11) Oluşturduğumuz modelin serum incelemesinde TNF- α seviyesinin diğer gruplardan yüksek olduğu, IL-1 β seviyesinin ise diğer gruplar ile benzer olduğu bulundu. TNF- α 'nın MS'in progresif patolojisi ve nöropatik ağrı semptomunda önemli rolü olduğu bilindiğinden, modelimizin TNF- α ilişkili olası terapötik moleküllerin araştırılmasına oldukça uygun bir model olduğu düşünülmüştür.

12) Günlük 100 mg/kg intraperitoneal pentoksifilin uygulamasının, oluşturduğumuz modelde DOE skoru seyrine, motor disfonksiyonlara ve kognitif disfonksiyona etkisi saptanmadı. Fakat çalışmamızda pentoksifilin 4. haftada kronik progresif DOE modeli oluştuktan sonra başlanmıştır. Pentoksifilin TLR4 antagonizması ile ilişkili tedavi edici bir molekül olabilme durumu yeni bir protokol ile LPS enjeksiyonu öncesindeki bir dönemde başlanılarak da araştırılmalıdır.

13) Oluşturduğumuz modelde görülen mekanik allodini, akut olarak hem 50 mg/kg hem de 100 mg/kg pentoksifilin dozlarında geriledi. 100 mg/kg dozun tedavi edici etkisi daha yüksek bulundu. Kronik olarak ise 100 mg/kg pentoksifilin 2. haftada mekanik allodini de iyileşme sağladığı belirlendi. Santral nöropatik ağrı da hem

akut olarak hem de kronik süreçte pentoksifilin başarılı bir tedavi seçeneği olarak tarafımızca önerilmektedir.

14) 2 hafta boyunca 100 mg/kg günlük pentoksifilin uygulaması, oluşturduğumuz modelde saptanan anksiyete-benzeri ve depresyon-benzeri duygudurumların tedavisinde etkin bulundu. Bu bağlamda MS ilişkili nöropsikiyatrik semptomların tedavisinde pentoksifilin yeri oldukça umut vadeci gözükmetedir.



7. KAYNAKLAR

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):115-27.
2. Apostolopoulos V, Matsoukas J. Advances in Multiple Sclerosis Research-Series I. *Brain Sci.* 2020;10(11).
3. Debouverie M, Pittion-Vouyovitch S, Louis S, Guillemin F. Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. *Eur J Neurol.* 2008;15(9):916-21.
4. Di Filippo M, Portaccio E, Mancini A, Calabresi P. Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):599-609.
5. Kawachi I. Neuropathological features of “non-motor” symptoms in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* 2019;10(3):161-8.
6. Weerasinghe-Mudiyanselage PDE, Kim JS, Shin T, Moon C. Understanding the spectrum of non-motor symptoms in multiple sclerosis: insights from animal models. *Neural Regen Res.* 2024;19(1):84-91.
7. Junker A, Wozniak J, Voigt D, Scheidt U, Antel J, Wegner C, et al. Extensive subpial cortical demyelination is specific to multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2020;30(3):641-52.
8. Schwarz K, Schmitz F. Synapse Dysfunctions in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2).
9. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1079-106.
10. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):223-44.
11. Storch MK, Bauer J, Linington C, Olsson T, Weissert R, Lassmann H. Cortical Demyelination Can Be Modeled in Specific Rat Models of Autoimmune Encephalomyelitis and Is Major Histocompatibility Complex (MHC) Haplotype-Related. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2006;65(12):1137-42.
12. Üçal M, Haindl MT, Adzemovic MZ, Strasser J, Theisl L, Zeitelhofer M, et al. Widespread cortical demyelination of both hemispheres can be induced by injection of pro-inflammatory cytokines via an implanted catheter in the cortex of MOG-immunized rats. *Exp Neurol.* 2017;294:32-44.
13. Cavaillon J-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon.* 2018;149:45-53.
14. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports.* 2019;9(1):5790.

15. Kikuchi DS, Campos ACP, Qu H, Forrester SJ, Pagano RL, Lassègue B, et al. Poldip2 mediates blood-brain barrier disruption in a model of sepsis-associated encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1):241.
16. Badawi GA, Shokr MM, Zaki HF, Mohamed AF. Pentoxifylline prevents epileptic seizure via modulating HMGB1/RAGE/TLR4 signalling pathway and improves memory in pentylenetetrazol kindling rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021;48(8):1111-24.
17. Rieckmann P, Weber F, Günther A, Martin S, Bitsch A, Broocks A, et al. Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1996;64(2):193-200.
18. Kim HK, Hwang SH, Lee SO, Kim SH, Abdi S. Pentoxifylline Ameliorates Mechanical Hyperalgesia in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Pain Physician*. 2016;19(4):E589-600.
19. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
20. Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. [Updated 2022 Sep 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>.
21. Zeydan B, Kantarci OH. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol Clin*. 2018;36(1):163-71.
22. Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013: mapping multiple sclerosis around the world. MSIF.org <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf> (2013).
23. Yeshokumar AK, Narula S, Banwell B. Pediatric multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2017;30(3):216-21.
24. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012;11(2):157-69.
25. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2017;389(10076):1336-46.
26. Toosy AT, Mason DF, Miller DH. Optic neuritis. *Lancet Neurol*. 2014;13(1):83-99.
27. Galetta SL, Villoslada P, Levin N, Shindler K, Ishikawa H, Parr E, et al. Acute optic neuritis: Unmet clinical needs and model for new therapies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(4):e135.
28. Petzold A, Wattjes MP, Costello F, Flores-Rivera J, Fraser CL, Fujihara K, et al. The investigation of acute optic neuritis: a review and proposed protocol. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(8):447-58.

29. Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF. Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Mult Scler.* 1999;5(3):179-83.
30. Kanchandani R, Howe JG. Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982;45(4):308-12.
31. McAlpine, D. in *Multiple Sclerosis: A Reappraisal* 2nd edn (eds McAlpine, D., Lumsden, C. E. & Acheson, E. D.) 132–196 (Churchill Livingstone, 1972).
32. Dillon BE, Lemack GE. Urodynamics in the evaluation of the patient with multiple sclerosis: when are they helpful and how do we use them? *Urol Clin North Am.* 2014;41(3):439-44, ix.
33. Rocca MA, Amato MP, De Stefano N, Enzinger C, Geurts JJ, Penner IK, et al. Clinical and imaging assessment of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015;14(3):302-17.
34. Zipoli V, Goretti B, Hakiki B, Siracusa G, Sorbi S, Portaccio E, et al. Cognitive impairment predicts conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *Mult Scler.* 2010;16(1):62-7.
35. Lerdal A, Celius EG, Krupp L, Dahl AA. A prospective study of patterns of fatigue in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2007;14(12):1338-43.
36. Feinstein A. Multiple sclerosis and depression. *Mult Scler.* 2011;17(11):1276-81.
37. Solaro C, Brichetto G, Amato MP, Cocco E, Colombo B, D'Aleo G, et al. The prevalence of pain in multiple sclerosis: a multicenter cross-sectional study. *Neurology.* 2004;63(5):919-21.
38. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33(11):1444-52.
39. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.
40. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. PROBLEMS OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS: REPORT BY THE PANEL ON THE EVALUATION OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *Ann N Y Acad Sci.* 1965;122:552-68.
41. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9(6):540-9.
42. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas M, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014;45(8):687-97.

43. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47(6):707-17.
44. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):942-55.
45. Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(2):182-7.
46. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol*. 2015;78(5):710-21.
47. Machado-Santos J, Saji E, Tröschner AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018;141(7):2066-82.
48. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):183-93.
49. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2007;17(1):38-44.
50. Klaver R, De Vries HE, Schenk GJ, Geurts JJ. Grey matter damage in multiple sclerosis: a pathology perspective. *Prion*. 2013;7(1):66-75.
51. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2018;19(7):696-707.
52. Yamout B, Sahraian M, Bohlega S, Al-Jumah M, Goueider R, Dahdaleh M, et al. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: 2019 revisions to the MENACTRIMS guidelines. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;37:101459.
53. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):209-20.
54. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*. 1933;58(1):39-53.
55. Freund J, McDermott K. Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1942;49(4):548-53.
56. Munoz JJ, Bernard CC, Mackay IR. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell Immunol*. 1984;83(1):92-100.

57. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. THE RAPID PRODUCTION OF ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN RHESUS MONKEYS BY INJECTION OF HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS BRAIN TISSUE WITH ADJUVANTS. *J Exp Med.* 1947;85(1):117-30.
58. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *Apmis.* 2011;119(12):819-30.
59. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:182-91.
60. Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M, et al. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(20):8302-7.
61. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med.* 2007;204(10):2363-72.
62. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173-89.
63. Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, Howard OM. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(3):671-80.
64. Hou W, Wu Y, Sun S, Shi M, Sun Y, Yang C, et al. Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170(4):1728-36.
65. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp.* 2014(86).
66. McFarlin DE, McFarland HF. Multiple sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1982;307(19):1183-8.
67. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nature Reviews Microbiology.* 2023;21(1):51-64.
68. Tsunoda I, Fujinami RS. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5(3):355-69.
69. Tsunoda I, Tanaka T, Saijoh Y, Fujinami RS. Targeting inflammatory demyelinating lesions to sites of Wallerian degeneration. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1563-75.
70. Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2011;24(3):291-9.

71. Blakemore WF, Franklin RJ. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;318:193-212.
72. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*. 2001;11(1):107-16.
73. Jeffery ND, Blakemore WF. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol*. 1995;24(10):775-81.
74. Hall SM. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci*. 1972;10(2):535-46.
75. Charcot JM: Lecture VI. Disseminated Sclerosis. *Pathological Anatomy. Lectures on the Diseases of the Nervous System* London: The New Sydenham Society; 1887, 157-181.
76. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
77. Popescu BF, Lucchinetti CF. Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2012;12:11.
78. Sameer AS, Nissar S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int*. 2021;2021:1157023.
79. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
80. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020;180(6):1044-66.
81. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14.
82. Li H, Liu S, Han J, Li S, Gao X, Wang M, et al. Role of Toll-Like Receptors in Neuroimmune Diseases: Therapeutic Targets and Problems. *Front Immunol*. 2021;12:777606.
83. Gooshe M, Abdolghaffari AH, Gambuzza ME, Rezaei N. The role of Toll-like receptors in multiple sclerosis and possible targeting for therapeutic purposes. *Rev Neurosci*. 2014;25(5):713-39.
84. Asadzadeh Manjili F, Yousefi-Ahmadipour A, Kazemi Arababadi M. The roles played by TLR4 in the pathogenesis of multiple sclerosis; A systematic review article. *Immunology Letters*. 2020;220:63-70.
85. Kwilas AJ, Green Fulgham SM, Duran-Malle JC, Schrama AEW, Mitten EH, Todd LS, et al. Toll-like receptor 2 and 4 antagonism for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-related pain. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2021;93:80-95.

86. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
87. Zhou H, Wang Y, Lian Q, Yang B, Ma Y, Wu X, et al. Differential IL-10 production by DCs determines the distinct adjuvant effects of LPS and PTX in EAE induction. *Eur J Immunol*. 2014;44(5):1352-62.
88. Buenafe AC, Bourdette DN. Lipopolysaccharide pretreatment modulates the disease course in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2007;182(1-2):32-40.
89. Serres S, Anthony DC, Jiang Y, Broom KA, Campbell SJ, Tyler DJ, et al. Systemic inflammatory response reactivates immune-mediated lesions in rat brain. *J Neurosci*. 2009;29(15):4820-8.
90. Hassan I, Dorjay K, Anwar P. Pentoxifylline and its applications in dermatology. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):510-6.
91. Rai R. Standard guidelines for management of venous leg ulcer. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(3):408-11.
92. El-Haggar SM, Hegazy SK, Abd-Elsalam SM, Bahaa MM. Pentoxifylline, a nonselective phosphodiesterase inhibitor, in adjunctive therapy in patients with irritable bowel syndrome treated with mebeverine. *Biomed Pharmacother*. 2022;145:112399.
93. Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(3):321-8.
94. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*. 2005;174(2):589-94.
95. Myers LW, Ellison GW, Merrill JE, El Hajjar A, St Pierre B, Hijazin M, et al. Pentoxifylline is not a promising treatment for multiple sclerosis in progression phase. *Neurology*. 1998;51(5):1483-6.
96. Prieto JM, Dapena D, Lema M, Ares B, Cacabelos P, Noya M. [Pentoxifylline: is it useful in multiple sclerosis?]. *Rev Neurol*. 2001;32(6):529-31.
97. Moghaddam A, Seiffaddini R, Najafzadeh A, Ghaffaripour H, Arasteh P, Movahhedi Z, et al. Effect of Pentoxifylline on Recurrence in Patients With Multiple Sclerosis: A Non-Randomized Double-Blinded Placebo Controlled Clinical Trial. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2015;17.
98. Corrêa JOdA, Aarestrup BJV, Aarestrup FM. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Experimental Neurology*. 2010;226(1):15-23.
99. Nataf S, Louboutin JP, Chabannes D, Fève JR, Muller JY. Pentoxifylline inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurol Scand*. 1993;88(2):97-9.

100. Zahid M, Busmail A, Penumetcha SS, Ahluwalia S, Irfan R, Khan SA, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade and Multiple Sclerosis: Exploring New Avenues. *Cureus*. 2021;13(10):e18847.
101. Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr Protoc Immunol*. 2019;126(1):e83.
102. Ozcelebi E, Iskit AB. Experimental Animal Models of Sepsis and Septic Shock. *J Crit Intensive Care* 2023;14:96–100.
103. Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Vis Exp*. 2007(5):224.
104. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, et al. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol*. 2008;65(6):753-61.
105. Valvassori SS, Varela RB, Quevedo J. Chapter 38 - Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression. In: Conn PM, editor. *Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition)*: Academic Press; 2017. p. 991-1001.
106. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284.
107. Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, Olesen J, Hansen TF, Ossipov M, et al. Von Frey testing revisited: Provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *Eur J Pain*. 2020;24(4):783-90.
108. Yesiltepe M, Cimen B, Sara Y. Effects of chronic vagal nerve stimulation in the treatment of β -amyloid-induced neuropsychiatric symptoms. *Eur J Pharmacol*. 2022;931:175179.
109. Ilchibaeva TV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Popova NK, Naumenko VS. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav Brain Res*. 2015;290:45-50.
110. Bera I, Sabatini R, Auteri P, Flace P, Sisto G, Montagnani M, et al. Neurofunctional effects of developmental sodium fluoride exposure in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2007;11(4):211-24.
111. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8.
112. Venable N, Kelly PH. Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats and mice. *Psychopharmacology*. 1990;100(2):215-21.
113. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 2015(97).

114. Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I. Ovarian cycle-linked changes in GABAA receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nature Neuroscience*. 2005;8(6):797-804.
115. Shaw S, Kumar U, Bhaumik G, Reddy MPK, Kumar B, Ghosh D. Alterations of estrous cycle, 3β hydroxysteroid dehydrogenase activity and progesterone synthesis in female rats after exposure to hypobaric hypoxia. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3458.
116. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*. 2001;56(12):1666-72.
117. Barthel L, Engler H, Hadamitzky M, Lückemann L, Sure U, Schedlowski M, et al. A step-by-step guide for microsurgical collection of uncontaminated cerebrospinal fluid from rat cisterna magna. *Journal of Neuroscience Methods*. 2021;352:109085.
118. Defazio R, Criado A, Zantedeschi V, Scanziani E. Neuroanatomy-based matrix-guided trimming protocol for the rat brain. *Toxicol Pathol*. 2015;43(2):249-56.
119. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Elsevier Science; 2013.
120. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*. 1998;8(4):681-94.
121. Shih C-H, Chen J-K, Kuo L-W, Cho K-H, Hsiao T-C, Lin Z-W, et al. Chronic pulmonary exposure to traffic-related fine particulate matter causes brain impairment in adult rats. *Particle and Fibre Toxicology*. 2018;15.
122. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, et al. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2):31-40.
123. Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, et al. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*. 2008;172(4):1053-61.
124. Wensheng L, Yifeng L, Jin L, Ali GF, Sharon WW, Benjamin C, et al. Oligodendrocyte-Specific Activation of PERK Signaling Protects Mice against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*. 2013;33(14):5980.
125. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:198.
126. Yin JX, Tu JL, Lin HJ, Shi FD, Liu RL, Zhao CB, et al. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. *PLoS One*. 2010;5(8):e12400.
127. Teixeira NB, Picolo G, Giardini AC, Boumezbeur F, Pottier G, Kuhnast B, et al. Alterations of peripheral nerve excitability in an experimental autoimmune

encephalomyelitis mouse model for multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2020;17(1):266.

128. Rapoport SI. Osmotic Opening of the Blood–Brain Barrier: Principles, Mechanism, and Therapeutic Applications. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2000;20(2):217-30.

129. Gasca-Salas C, Fernández-Rodríguez B, Pineda-Pardo JA, Rodríguez-Rojas R, Obeso I, Hernández-Fernández F, et al. Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in Parkinson's disease dementia. *Nature Communications*. 2021;12(1):779.

130. Peng X, Luo Z, He S, Zhang L, Li Y. Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11.

131. Akarsu ES, Mamuk S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(5):R1846-50.

132. Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation*. 2015;12:223.

133. Phares TW, Kean RB, Mikheeva T, Hooper DC. Regional Differences in Blood-Brain Barrier Permeability Changes and Inflammation in the Apathogenic Clearance of Virus from the Central Nervous System¹. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12):7666-75.

134. Mueller AM, Pedré X, Stempfl T, Kleiter I, Couillard-Despres S, Aigner L, et al. Novel role for SLPI in MOG-induced EAE revealed by spinal cord expression analysis. *J Neuroinflammation*. 2008;5:20.

135. Herrmann MM, Gaertner S, Stadelmann C, van den Brandt J, Böske R, Budach W, et al. Tolerance induction by bone marrow transplantation in a multiple sclerosis model. *Blood*. 2005;106(5):1875-83.

136. Motawi TK, El-Maraghy SA, Kamel AS, Said SE, Kortam MA. Modulation of p38 MAPK and Nrf2/HO-1/NLRP3 inflammasome signaling and pyroptosis outline the anti-neuroinflammatory and remyelinating characters of Clemastine in EAE rat model. *Biochem Pharmacol*. 2023;209:115435.

137. McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Hoffmann R. The Pathogenesis of Alopecia Areata in Rodent Models. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2003;8(1):6-11.

138. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).

139. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated

through NOX4 and $G_{i\alpha}$ dependent PI-3kinase signalling. *Journal of Inflammation*. 2012;9(1):1.

140. Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci*. 2004;20(2):467-73.

141. Krajnc N, Berger T, Bsteh G. Measuring Treatment Response in Progressive Multiple Sclerosis-Considerations for Adapting to an Era of Multiple Treatment Options. *Biomolecules*. 2021;11(9).

142. Bidgood R, Zubelzu M, Ruiz-Ortega JA, Morera-Herreras T. Automated procedure to detect subtle motor alterations in the balance beam test in a mouse model of early Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2024;14(1):862.

143. Krzyzanowska A, Avendaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain and Behavior*. 2012;2(5):678-97.

144. Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology*. 2014;22(1):1-22.

145. Rivel M, Achiron A, Dolev M, Stern Y, Zeilig G, Defrin R. Unique features of central neuropathic pain in multiple sclerosis: Results of a cluster analysis. *Eur J Pain*. 2022;26(5):1107-22.

146. Segal JP, Bannerman CA, Silva JR, Haird CM, Baharnoori M, Gilron I, et al. Chronic mechanical hypersensitivity in experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by disease severity and neuroinflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020;89:314-25.

147. Zhang S, Li Y, Tu Y. Lidocaine attenuates CFA-induced inflammatory pain in rats by regulating the MAPK/ERK/NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2021;21(3):211.

148. Frago YD, Going LC, Lourido AM, Berlim LV, Egas MBA, Souza MR. Aggressive Traits in People with Multiple Sclerosis—A Case–Control Study†. *Archives of Clinical Neuropsychology*. 2017;32(1):94-7.

149. Kavelaars A, Heijnen CJ, Tennekens R, Bruggink JE, Koolhaas JM. Individual behavioral characteristics of wild-type rats predict susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 1999;13(4):279-86.

150. Hanna M, Strober LB. Anxiety and depression in Multiple Sclerosis (MS): Antecedents, consequences, and differential impact on well-being and quality of life. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;44:102261.

151. Grace PM, Loram LC, Christianson JP, Strand KA, Flyer-Adams JG, Penzkover KR, et al. Behavioral assessment of neuropathic pain, fatigue, and anxiety in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and attenuation by interleukin-10 gene therapy. *Brain Behav Immun*. 2017;59:49-54.

152. Pestana JE, Islam N, Van der Eyk NL, Graham BM. What Pre-clinical Rat Models Can Tell Us About Anxiety Across the Menstrual Cycle in Healthy and Clinically Anxious Humans. *Curr Psychiatry Rep.* 2022;24(11):697-707.
153. Dib P, Zhang Y, Ihnat MA, Gallucci RM, Standifer KM. TNF-Alpha as an Initiator of Allodynia and Anxiety-Like Behaviors in a Preclinical Model of PTSD and Comorbid Pain. *Frontiers in Psychiatry.* 2021;12.
154. Feinstein A. Multiple sclerosis and depression. *Multiple Sclerosis Journal.* 2011;17(11):1276-81.
155. Pollak Y, Orion E, Goshen I, Ovadia H, Yirmiya R. Experimental autoimmune encephalomyelitis-associated behavioral syndrome as a model of 'depression due to multiple sclerosis'. *Brain Behav Immun.* 2002;16(5):533-43.
156. Gao Y, Ma J, Tang J, Liang X, Huang CX, Wang SR, et al. White matter atrophy and myelinated fiber disruption in a rat model of depression. *J Comp Neurol.* 2017;525(8):1922-33.
157. Brochet B, Ruet A. Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis With Regards to Disease Duration and Clinical Phenotypes. *Front Neurol.* 2019;10:261.
158. Mandolesi G, Grasselli G, Musumeci G, Centonze D. Cognitive deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis: neuroinflammation and synaptic degeneration. *Neurol Sci.* 2010;31(Suppl 2):S255-9.
159. Aharoni R, Schottlender N, Bar-Lev DD, Eilam R, Sela M, Tsoory M, et al. Cognitive impairment in an animal model of multiple sclerosis and its amelioration by glatiramer acetate. *Sci Rep.* 2019;9(1):4140.
160. Braley TJ, Chervin RD. Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment. *Sleep.* 2010;33(8):1061-7.
161. Faraji J, Bettenson D, Babatunde S, Gangur-Powell T, Yong VW, Metz GAS. Thermoregulatory dynamics reveal sex-specific inflammatory responses to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Implications for multiple sclerosis-induced fatigue in females. *Brain, Behavior, & Immunity - Health.* 2022;23:100477.
162. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6(3):126-35.
163. Phé V, Pakzad M, Curtis C, Porter B, Haslam C, Chataway J, et al. Urinary tract infections in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2016;22(7):855-61.
164. Li V, Barker N, Curtis C, Porter B, Panicker JN, Chataway J, et al. The prevention and management of hospital admissions for urinary tract infection in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2020;45:102432.
165. Aharony SM, Lam O, Corcos J. Evaluation of lower urinary tract symptoms in multiple sclerosis patients: Review of the literature and current guidelines. *Can Urol Assoc J.* 2017;11(1-2):61-4.

166. Altuntas CZ, Daneshgari F, Liu G, Fabiyi A, Kavran M, Johnson JM, et al. Bladder dysfunction in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2008;203(1):58-63.
167. Monaco S, Nicholas R, Reynolds R, Magliozzi R. Intrathecal Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
168. Quan N, Sundar SK, Weiss JM. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 1994;49(1-2):125-34.
169. Meneses G, Rosetti M, Espinosa A, Florentino A, Bautista M, Díaz G, et al. Recovery from an acute systemic and central LPS-inflammation challenge is affected by mouse sex and genetic background. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201375.
170. Min SS, Quan HY, Ma J, Lee KH, Back SK, Na HS, et al. Impairment of long-term depression induced by chronic brain inflammation in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(1):93-7.
171. Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1998;780(2):294-303.
172. Felts PA, Woolston AM, Fernando HB, Asquith S, Gregson NA, Mizzi OJ, et al. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain.* 2005;128(Pt 7):1649-66.
173. Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR. Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus.* 2005;15(2):260-72.
174. Mitchell AS, Czajkowski R, Zhang N, Jeffery K, Nelson AJD. Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. *Brain Neurosci Adv.* 2018;2:2398212818757098.
175. DeLuca GC, Yates RL, Beale H, Morrow SA. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical, radiologic and pathologic insights. *Brain Pathol.* 2015;25(1):79-98.
176. Beck ES, Maranzano J, Luciano NJ, Parvathaneni P, Filippini S, Morrison M, et al. Cortical lesion hotspots and association of subpial lesions with disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2022;28(9):1351-63.
177. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology.* 2011;18(1):21-9.
178. Cai Z, Hussain M, Yan L-J. Microglia, neuroinflammation, and A β in Alzheimer's disease. *The International journal of neuroscience.* 2013;124.
179. Das Sarma S, Chatterjee K, Dinda H, Chatterjee D, Das Sarma J. Cytomorphological and Cytochemical Identification of Microglia. *ISRN Immunology.* 2013;2013:205431.

180. Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Hayakawa S, Sawai S, Hattori T. Peripheral nerve demyelination in multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(8):1829-33.
181. Lizarraga AA, Rammohan KW, Weinstock-Guttman B, Sharma K. Peripheral nervous system electrodiagnostic abnormalities in predominantly Hispanic Multiple Sclerosis patients. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2021;56:103254.
182. Amin A, Akhtar MF, Saleem A, Sharif A, Shah S, Khan MI, et al. Pterostilbene improves CFA-induced arthritis and peripheral neuropathy through modulation of oxidative stress, inflammatory cytokines and neurotransmitters in Wistar rats. *Inflammopharmacology.* 2022;30(6):2285-300.
183. Hopf HC, Eysholdt M. Impaired refractory periods of peripheral sensory nerves in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1978;4(6):499-501.
184. Hosseini F, Mohammadbeigi A, Aghaali M, Borujerdi R, Parham M. Effect of pentoxifylline on diabetic distal polyneuropathy in type 2 diabetic patients: A randomized trial. *J Res Med Sci.* 2019;24:89.
185. Akbari Z, Reisi P, Torkaman-Boutorabi A, Farahmandfar M. The Effect of Pentoxifylline on Passive Avoidance Learning and Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Caspase-3 in the Rat Hippocampus Following Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Adv Biomed Res.* 2019;8:39.
186. Nassar A, Azab AN. Effects of Dexamethasone and Pentoxifylline on Mania-like and Depression-like Behaviors in Rats. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(9).
187. Yasrebi SO, Momtazmanesh S, Moghaddam HS, Shahmansouri N, Mehrpooya M, Arbabi M, et al. Pentoxifylline for treatment of major depression after percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Psychosom Res.* 2021;150:110635.
188. Tariq M, Ahmad M, Moutaery KA, Deeb SA. Pentoxifylline ameliorates lithium-pilocarpine induced status epilepticus in young rats. *Epilepsy Behav.* 2008;12(3):354-65.
189. Duarte-Silva E, Macedo D, Maes M, Peixoto CA. Novel insights into the mechanisms underlying depression-associated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2019;93:1-10.