



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RATLARDA KUPRİZONLA İNDÜKLENEN DENEYSEL MULTİPL  
SKLEROZ MODELİNDE GHRELİNİN OLASI HAFIZA  
KORUYUCU NÖROPROTEKTİF VE ANTİOKSİDAN  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sezai ORUK  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Özlem ERGÜL ERKEÇ

Van -2022

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KUPRİZONLA İNDÜKLENEN DENEYSEL MULTİPL  
SKLEROZ MODELİNDE GHRELİNİN OLASI HAFIZA  
KORUYUCU NÖROPROTEKTİF VE ANTİOKSİDAN  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sezai ORUK  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Özlem ERGÜL ERKEÇ

Van-2022

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2021-9320 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRLÜĞÜNE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Ratlarda kuprizonla indüklenen deneysel multipl skleroz modelinde ghrelinin olası hafıza koruyucu, nöroprotektif ve antioksidan özelliklerinin araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanıma aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma/çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sezai ORUK

Tarih: 18.03.2022

İmza:

## TEŞEKKÜR

Tezimi yazdığım süreçte hem ders döneminde hem de tez döneminde bana çok şey katan, çok şey öğreten hiç bitmeyen öğretme isteği, fedakârlıkları ve sabrı için kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Özlem ERGÜL ERKEÇ' e, çalışmama değerli katkılarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sıddık KESKİN' e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Zübeyir HUYUT ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Eda AÇIKGÖZ' e teşekkürlerimi sunarım. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, deneylerimin gerçekleşmesi esnasında vermiş oldukları destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım. Tezimin deneysel çalışmaları ve yazım sürecinde benden desteğini esirgemeyen değerli eşime ve bu projeyi TYL-2021-9320 numaralı proje olarak destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Oruk S. Ratlarda kuprizonla indüklenen deneysel multipl skleroz modelinde ghrelinin olası hafıza koruyucu, nöroprotektif ve antioksidan özelliklerinin araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2022**

Multipl Skleroz (MS), genç erişkinlerde sık görülen ciddi bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın patofizyolojisi hala netleşmemiştir. Kanıtlar, oksidatif stresin MS patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışmada antiinflamatuvar etkileri farklı bir MS modelinde ve çeşitli epilepsi modellerinde, antioksidan etkileri ise epilepsi modellerinde daha önce gösterilmiş olan ghrelinin kuprizonla indüklenen MS modelinde olası antioksidan, nöroprotektif ve hafıza koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla 48 adet Wistar albino erkek rat 21 günlükken süten kesilerek randomize olarak altı gruba ayrıldı: demiyelinizasyon kontrol, demiyelinizasyon, remiyelinizasyon kontrol, remiyelinizasyon, remiyelinizasyon ghrelin-20 ve remiyelinizasyon-ghrelin-40 grubu. Deneyin son günü ratlara Y maze testi yapıldı. Beyin dokusunda ELISA yöntemi ile ticari kitler kullanılarak oksidatif stres parametrelerinden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-PX), malondialdehit (MDA) ve katalaz (CAT) araştırıldı. Ayrıca beyin dokusunda MS ile uyumlu inflamatuvar alanların tespit edilmesi, miyelin hasarı ve onarımın gösterilmesi amacıyla hematoxilen & eozin (H&E) boyama ve luxol fast blue (LFB) boyama gerçekleştirildi. Total kol girişi sayısı, başarılı değişim sayısı ve başlangıç kolundan çıkış latansı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Ghrelin uygulanan gruplarda diğer gruplara kıyasla daha anlamlı bir remiyelinizasyon varlığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Ayrıca ghrelin uygulanan grupların antioksidan parametre değerlerinde de anlamlı artış tespit edildi ( $p<0,05$ ). Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları, kuprizon ile indüklenen deneysel MS modelinde ghrelinin nöroprotektif ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Multiple skleroz, ghrelin, deneysel otoimmün ensefalomyelopati

## ABSTRACT

**Oruk S. Investigation of potential memory protection, neuroprotection and antioxidant properties of ghrelin in cuprizone induced multiple sclerosis model in rats, University of Yuzuncu Yil, Institute of Health Science, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Master Thesis, Van, 2022.** Multiple Sclerosis (MS) is a common and serious neurodegenerative disease in young adults. The pathophysiology of the disease is still unclear. Evidence suggests that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of MS. In this study, it was aimed to examine the possible antioxidant, neuroprotective and memory protective effects of ghrelin, whose anti-inflammatory effects have been previously shown in a different MS model and various epilepsy models, and the antioxidant effects have been previously shown in a cuprizone-induced MS model. For this purpose, 48 Wistar albino male rats were weaned at 21 days of age and randomly divided into six groups: demyelination control, demyelination, remyelination control, remyelination, remyelination ghrelin-20 and remyelination ghrelin-40 groups. Y maze test was performed on the rats on the last day of the experiment. The oxidative stress parameters of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) were investigated in brain tissue using commercial kits by ELISA method. In addition, hematoxylen & eosin (H&E) staining and luxol fast blue (LFB) staining was performed to detect the inflammatory areas compatible with MS in the brain tissue and to show myelin damage and repair. There was no statistically significant difference between the groups in terms of total number of arm entries, number of successful alternations, and exit latency from the initial arm ( $p>0.05$ ). A more significant remyelination was observed in the ghrelin administered groups compared to the other groups ( $p<0.05$ ). In addition, a significant increase was also found in the antioxidant parameter levels of the ghrelin administered groups ( $p<0.05$ ). In conclusion, the results of this study may suggest that ghrelin has neuroprotective and antioxidant properties in the cuprizone induced experimental MS model.

**Key words:** Multiple sclerosis, ghrelin, experimental autoimmune encephalomyelitis.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
TABLolar LİSTESİ.....	XII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Multipl Skleroz.....	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2. Tarihçe.....	3
2.1.3. Epidemiyoloji ve etiyoloji.....	4
2.1.4. Patolojik immünoloji.....	4
2.1.5. Multipl sklerozda tedavi yaklaşımları.....	5
2.2. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelopati.....	6
2.3. Demiyelinizasyon Oluşturmak İçin Kuprizon Modeli.....	7
2.4. MS Patofizyolojisinde Oksidatif Stresin Rolü.....	8
2.5. Ghrelinin Özellikleri ve Deneysel Açından Kullanılma Amaçları.....	10
2.5.1. Ghrelinin santral sinir sistemindeki rolü.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereçler.....	13
3.1.1. Hayvanlar.....	13
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Kuprizonla deneysel MS modelinin indüklenmesi.....	14
3.2.2. Y-maze testi.....	14

3.2.3. Doku alımı.....	16
3.2.4. Oksidatif stres parametrelerinin ölçümü.....	16
3.2.5. Histopatolojik inceleme.....	17
3.2.6. Hematoksilen- Eozin (H&E) boyama.....	18
3.2.7. Luxol fast blue boyama.....	18
3.2.8. İstatistik.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Davranış Deneyi Bulguları.....	20
4.2. Oksidatif Stres Parametre Bulguları.....	23
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
5.1. Davranış Deneylerinin Değerlendirilmesi.....	33
5.2. Oksidatif Stres Bulgularının Değerlendirilmesi.....	34
5.3. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi.....	38
5.3.1. H&E boyama değerlendirmesi.....	38
5.3.2. LFB boyama değerlendirmesi.....	40
5.4. Sonuç.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	49
EKLER.....	50
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi.....	50
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu.....	51

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotropik Hormon
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CPZ</b>	: Kuprizon
<b>CSF</b>	: Serebrospinal Sıvı
<b>DM</b>	: Demiyelinizasyon
<b>DM-KNT</b>	: Demiyelinizasyon Kontrol
<b>DRN</b>	: Dorsal Rafe Nükleusu
<b>EAE</b>	: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelopati
<b>EBS</b>	: Ebsteinn-Berr Virüsü
<b>GH</b>	: Büyüme Hormonu
<b>GHSR1</b>	: Ghrelin Sekrete Edici Reseptör 1
<b>GSH-PX</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen &Eozin
<b>İCV</b>	: İntraserebrovasküler
<b>İGF-1</b>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>İ.P.</b>	: İntraperitoneal
<b>K: E</b>	: Kız/Erkek Oranı
<b>LFB</b>	: Luksol Fast Blue
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MG</b>	: Miligram
<b>ML</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimol
<b>MS</b>	: Multipl Skleroz
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>NG</b>	: Nanogram
<b>RPM</b>	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit
<b>NO<sup>-</sup></b>	: Nitrik Asit

<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>PFA</b>	: Paraformaldehit
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponu
<b>RM</b>	: Remiyelinizasyon
<b>RM-G20</b>	: Remiyelinizasyon-Ghrelin 20
<b>RM-G40</b>	: Remiyelinizasyon-Ghrelin 40
<b>RM-KNT</b>	: Remiyelinizasyon- Kontrol
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RR-MS</b>	: Relapsing Remitting-Multipl Skleroz
<b>SEM</b>	: Standart Hata
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>UVB</b>	: Ultraviyole Işınları

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	%0,6 kuprizonla homojen karıştırılmış 100 gram yemle beslenen ratlar.....	8
<b>Şekil 2.</b>	Y-maze testi.....	15
<b>Şekil 3.</b>	Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan SOD üzerine etkileri.....	25
<b>Şekil 4.</b>	Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan GSH-PX üzerine etkileri.....	26
<b>Şekil 5.</b>	Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda oksidatif stres parametrelerinden MDA üzerine etkileri.....	26
<b>Şekil 6.</b>	Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan CAT üzerine etkileri.....	27
<b>Şekil 7.</b>	Beynin kortikal alanlarının genel histolojik görüntüsü.....	28
<b>Şekil 8.</b>	Beynin kortikal alanlarında gruplar arasındaki inflamatuvar skor.....	29
<b>Şekil 9.</b>	Demiyelinize alanların histolojik görüntüsü.....	30
<b>Şekil 10.</b>	Korpus kallozum bölgelerinde gruplar arasındaki demiyelinizasyon skorları.....	30
<b>Şekil 11.</b>	Miyelin boyama görüntüsü.....	31
<b>Şekil 12.</b>	Korpus kallozum bölgelerinde gruplar arasındaki miyelin içeriği.....	32

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> MS tipleri.....	3
<b>Tablo 2.</b> Ghrelinin farklı doku/organlar üzerine etkileri.....	11
<b>Tablo 3.</b> Y-maze test parametrelerinin farklı gruplar arasındaki ilişkiyi gösteren tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırmaları.....	20
<b>Tablo 4.</b> Korelasyonlar.....	21
<b>Tablo 5.</b> Bazı antioksidan/oksidan parametrelere ait grupların ortalama ve standart hata değerleri.....	24

## 1.GİRİŞ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, inflamatuvar, otoimmün ve nörolojik bir hastalığıdır (Thomas 2012). MS’de MSS’ nin miyelinli aksonları hedeftedir ve değişen derecelerde miyelin kılıflar ve aksonlar hasarlanırlar. Başlangıçta hastaların çoğunda hastalık, geri dönüşümlü nörolojik tutulumlardan oluşsa da devam eden süreçlerde ilerleyici bozukluklara yol açmaktadır. MS tanısı klinik bulgular temelinde, beynin manyetik rezonans görüntülemesi (MRI) ve serebrospinal sıvısının (CSF) değerlendirilmesi gibi yardımcı testlerle konur. Amerikada 250.000-350.000 kadar MS hastası vardır. Bu hastaların %50 si hastalık başlangıcından sonraki 15 yıl içinde yürümek için yardıma ihtiyaç duymaktadırlar (Thomas 2012).

MS tipik olarak 20-45 yaş arası yetişkinlerde görülür, ara sıra çocukluk çağında ve genç erişkin yaşta da görülebilmektedir. MS kadın cinsiyette daha fazla görülür ancak durum her zaman böyle değildir. 1900’lerin başındaki vakalarda cinsiyet oranı neredeyse eşitti, o zamandan bu yana cinsiyet oranı (K: E) sürekli bir şekilde artıyor ve şu anda bu oran 3:1’e yakındır. (Dobson ve Giovannoni, 2019).

Hastalığın temel sebebi bilinmemekle birlikte genetik hassasiyet ve virüs, metabolizma ve çevresel faktörler gibi non-genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı bilinmektedir. MS tedavisi için yapılmakta olan girişimlerin amacı tedavi bazında hastalığın seyrinde ortaya çıkacak olan bulguların etkisini azaltarak hastanın yaşam kalitesini korumaktır. Ayrıca hastayı psikolojik, sosyal ve kognitif yönden destekleyip günlük yaşamında karşılaşılabileceği tüm zorlukları çözmeye yardımcı olmak tedavinin büyük bir parçasını oluşturmaktadır.

Hastalığın patofizyolojisi netleşmemiştir. Bu yüzden yeni etken madde çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda nöroprotektif, anti-inflamatuvar etkileri daha önceden kanıtlanmış (Ferrini ve ark., 2009) olan ghrelinin antioksidan, nöroprotektif, hafıza koruyucu etkilerini araştırmayı hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multipl Skleroz

#### 2.1.1. Tanım

MS genç erişkinlerde rastlanan en yaygın sakat bırakıcı, travmatik olmayan, merkezi sinir sisteminin kronik, inflamatuvar, otoimmün ve demiyelinizan bir hastalığıdır (Dobson and Giovannoni 2019). Hastalığın gidişatı oldukça karmaşık, çeşitli ve tahmin edilemezdir (Thomas 2012). Tanımından da anlaşılacağı üzere MS birçok sistemi bir arada etkileyebilen ve merkezi sinir sistemindeki miyelin kılıfları harap edecek bir otoimmüniteyi tetikleyen genetik ve non-genetik faktörlerin sebep olduğu düşünülen kompleks bir hastalıktır (Thomas 2012).

MS, otopsi doku parçalarında orantısız aksonal hasar ile karakterize olan demiyelinizasyon sergiler (Ransohoff ve ark., 2015). Nörologlar hastalığın gidişatına bağlı olarak hastaların dört ana kategoride gruplandırılabilceğini kabul etmektedirler (Thomas 2012). En sık görülen MS tipi alevlenme dönemlerinin olduğu relapsing yani tekrarlayan remitting yani ara verme süreçlerinin dahil olduğu relapsing-remitting tip MS' tir (RR-MS). RR-MS Yaklaşık %85 gibi büyük oranda görülür (**Tablo 1**). İyileşme dönemlerinde neredeyse tam bir düzelme olur. Nörolojik tutulumdan kaynaklanan sorunlar ilk ataklarda görülmeyebilir ancak ilerleyen süreçlerde optik sinir tutulumu (Nöromiyelitis optica), kognitif becerilerde yoksunluk, emosyonel instabilite, mesane problemlerinin neden olduğu sosyal izolasyon problemleri gibi birçok probleme neden olabilmektedir (Thomas 2012).

MS hastalarının %30'undan fazlasında başlıca bacaklarda ılımlı düzeyden ciddi düzeye kadar spastisite görülür. MS hastalarında başlangıç klinik bulgusu parestezi (uyuşma ve karıncalanma), disestezi, diplopi, ataksi, mesane bozukluklarıdır (Thomas, 2012).

**Tablo 1:** MS tipleri (Thomas, 2012)

Tip	Sıklık	Özellikler
<b>Relapsing-remitting MS</b>	~%85	Alevlenmeler ile bilinen relapsing (tekrarlama) ve ara verme (remitting) dönemleri vardır. En çok görülen MS tipidir.
<b>Sekonder progresif MS</b>	RR-MS hastalarının bazılarında	Birkaç hasta için hastalık modifiye edici ajan ile tedavi bazı semptomları geciktirebilir. Hastalığın gidişatı iyileşme periyotları olsun ya da olmasın gittikçe kötüleşir.
<b>Primer progresif MS</b>	~%10	Hastalık başından itibaren dereceli olarak kötüleşmeye devam eder. Relapsing ve remitting dönemleri yoktur. Bu MS formu hastalığı tedavi etmek için tipik olarak kullanılan ilaçlara daha dirençlidir.
<b>Progresif relapsing MS</b>	<%5	Nadir bir MS formudur. Kötüleşen semptomların aralıklı alevlenmeleriyle başlangıçta ilerleyicidir ve tekrarlama ve ara verme periyotları bulunmaz.

### 2.1.2 Tarihçe

14. yüzyılda Hollanda'da kayak yapan bir genç aniden halsizleşti ve düşerek kaburgasını kırdı. Bu düşme hastalığının ilk işaretiydi. Hastalık hızlı bir şekilde kötüleşti ve her iki bacağı paralize oldu. Tıp tarihçilerine göre bu genç ilk dokümanede edilen MS hastasıydı (Medaer, 1979). MS' in temel klinik nöropatolojik özellikleri 19.Yüzyılın ortalarında anlaşılmıştır (Ransohoff ve ark., 2015).

### **2.1.3 Epidemiyoloji ve etiyoloji**

MS' in temel sebebinin bilinmediği sıklıkla vurgulansa da bu yargı tümüyle doğru değildir. Ebsstein-barr virüs (EBS), güneş ışınlarındaki ultraviyole B ışınları (UVB), sigara kullanımı, vitamin D ve kişisel genetik altyapı birleştiğinde MS gelişiminde önemli roller oynarlar (Dobson ve Giovannoni, 2019). MS' in başlangıcı, genellikle 20-40 yaş arasındaki genç erişkinlerde meydana gelir ve kadınlar erkeklerden 2-3 kat daha fazla sıklıkta etkilenirler ve bu oran dünyanın bazı bölgelerinde kadınlar lehine daha fazla artış gösterir (Oh ve ark., 2018). MS' in küresel ortalama prevalansı farklı ülkelerde önemli değişiklikler ile birlikte her 100.000 insanda 33' tür (Belbasis ve ark., 2020).

MS, tablosu giderek kötüleşen küresel bir hastalıktır (Mehndiratta ve ark., 2014). MS prevalansı enlemle birlikte artmaktadır ancak yapılan bir çalışmada bu eğilim Norveç ve ABD'de azalmaktadır (Koch-Henriksen ve Sørensen, 2010). MS prevalansındaki enlemsel eğilim UVB' ye maruz kalmayla çok güçlü bir şekilde ilişkilidir. Düşük vitamin D biyoyararlanımına sebep olan UVB' ye maruz kalma MS hassasiyeti oluşturur (Mark ve Anthony, 2018); (Reder, 2018).

### **2.1.4. Patolojik immünoloji**

MS' in en temel karakteristik patolojik ayırıcı niteliği demiyelinizan plaklara yol açan inflamatuvar periventriküler lezyonlardır (Karussis, 2014). Bir zamanlar, MS patolojisi üzerine yapılan çalışmalar, beyaz cevherde fokal demiyelinize plaklara odaklanmış durumdaydı. Ancak sonrasında bu plakların korteksi, bazal gangliyonları, beyin sapını ve spinal kordun gri maddesini de içeren gri cevher tutulumuna neden olduğu da kanıtlandı (Brownell ve Hughes., 1962). Aktif demiyelinizasyon ya da doku hasarı, aktiflenmiş makrofaj ya da mikrogliaların morfolojik bir fenotipini ortaya çıkaran ve hasarlı bölgede yoğun bir şekilde yerleşik durumda olan fagositik hücrelerle ilişkilidir (Lassmann, 2018). MS hastalığına sahip bir beyinde fokal lezyonlar inflamasyonlu venlerin etrafında gelişir (Lassmann, 2018). Perivasküler inflamatuvar infiltratların başlıca lenfositleri ve plazma hücrelerini içerdiği bulunmuştur. Oysa aktif doku hasarı, mikroglialar ve aktiflenmiş makrofajlarla ilişkilidir (Lassmann, 2018).

İnflamatuvar infiltratlar, özellikle T-lenfositleri içerir; B-hücreleri ve plazma hücreleri de mevcuttur, ancak çok daha düşük sayılardadır (Lassmann, 2013). İnflamasyonun ve hastalığın patolojisinde de önemli yer tutan otoimmünitinin bir sonucu olarak makrofajların ya da mikrogliaların aktiviteleri sonucu oligodentrosit hasarı ve demiyelinizasyon ortaya çıkar. Hastalığın erken aşamalarında aksonlar göreceli olarak korunur. Ancak hastalık ilerledikçe geri dönüşümsüz aksonal hasar gelişir. Adaptif immün sistemin hücreleriyle ilgili olarak, CD3+ T hücreleri hastalığın tüm aşamalarında ve tüm lezyonlarında MS hastalığına sahip bir beyindeki en çok sayıda olan lenfositlerdir (Lassmann, 2018).

### **2.1.5. Multipl sklerozda tedavi yaklaşımları**

Şu ana kadar, hastalığın ilerleyişiyle birlikte hastadaki sakatlık durumu artışını durduran herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Ancak hastalığın patofizyolojisi daha iyi anlaşıldıkça hastalığın doğal seyrine olumlu katkı sağlayan tedaviler geliştirildi. Bu tedaviler hastalık modifiye edici ilaçlardır (Polman, 2000). Hastalığın ilerleyici olması ve hastalık modifiye edici ilaçlar dışında kesin bir tedavisinin olmaması, tedavinin amacını hastalığın ilerleyen dönemlerinde en konforlu bir şekilde günlük yaşam aktivitelerini olabildiğince bağımsız yapmasına yönlendirmiştir. Bu anlamda medikal tedavi, fizik tedavi, alternatif yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Akut dönemde MS tedavisinin ana amacı tekrarlamaları önlemek ve hastalığın kötüleşmesini engellemektir (Thomas, 2012). Bu amaçla, geçmişte immünsüpresif ajanlar kullanıldı. Ancak bu ilaçlar, kısıtlı etkilerinden dolayı ve önemli derecede toksik özelliklerinden dolayı hiçbir zaman yaygın kabul görmemiştir (Polman, 2000). Son zamanlarda, büyük çaplı randomize kontrollü çalışmalarda interferon-1a, interferon-1b, glatriamer asetat, natalizumab ve mitoksantron ile prognozu olumlu etkileyen sonuçlar başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Bu maddeler, immün süpresör olmaktan ziyade immün modülatörler olarak görülmelidirler (Thomas, 2012). Hastalık modifiye edici ajanlar, kötü prognoza sahip MS hastalarında erken bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmelidir. MS için kötü prognoz; erkek cinsiyet, hastalığın daha geç yaşlarda başlaması, hastalık başlangıcında motor veya serebellar bulgu olması, ilk ve ikinci atak arasında kısa süre olması, hastalığın ilk yıllarında yüksek relaps oranı, ilk relapstan sonra inkomplet remisyon, erken sakatlık ve

beynin erken dönem manyetik rezonans görüntülemesinde görülen aşırı lezyon odakları olarak sıralanabilir (Polman, 2000).

Semptomatik terapilerle ilişkili en önemli durum uykudur. Uyku bozukluğunun yaygınlığı artmıştır çünkü MS hastalık süresi artmıştır ve rapor edilen uyku bozukluğu olan hastalarda kaygı, depresyon ve yorgunluk oldukça yaygındır (Dobson ve Giovannoni, 2019). Bu noktada semptomatik tedavinin prensipte temel amacı uyku bozukluğuna yol açan etmenleri devre dışı bırakmak, uyku bozukluğunun bir sonucu olarak ortaya çıkan depresyon ve yorgunluk gibi sorunları, uyku süresini ve kalitesini arttırarak önlemektir (Braley, 2018). MS' in sosyo-ekonomik yükü düşünüldüğünde, MS semptomlarının iyileştirilmesinde; fiziksel, sosyal ve kognitif açıdan rehabilitasyonun önemli bir role sahip olduğu söylenebilir (Amedoro ve ark., 2020). MS hastaları, genel popülasyonda sağlıklı akranlarına göre daha az aktif olmayı sürdürürler. Bu durum da iyilik hallerini oldukça olumsuz etkilemektedir. İyilik halinin sürdürülmesi, fiziksel aktivite ve egzersizi içeren sağlıklı davranışlarla sağlanabilir (Kalb ve ark., 2020). Bu fiziksel aktivitelerden en dikkat çekici olanı ve spesifik olarak kas iskelet sistemine odaklanan egzersiz terapilerinden farklı olarak hemen hemen tüm sistemlere faydası olduğu düşünülen akuaterapidir (Amedoro ve ark., 2020). Akuaterapi geçmişte çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Akuatik tedaviyi eşsiz yapan özellikler birçok fayda sağlayan su yüzeyinde kalmanın verdiği rahatlık hissi, hidrostatik basınç, su direnci ve suyun türbülansı olarak düşünülebilir (Getz ve ark., 2006). Akuatik tedavi, MS'li hastaların günlük yaşam aktivitelerinin geliştirilmesinde konvansiyonel tedavi yanında iyi bir alternatif tedavi olabilir (Amedoro ve ark., 2020).

## **2.2. Deneysel Otoimmün Ensefalomyelopati**

Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE), insan inflamatuvar, kronik ve demiyelinizan hastalığı olan MS'in patofizyolojisini anlamak, açıklamak ve tedavi stratejilerini geliştirmek için laboratuvar ortamında yaygın bir şekilde kullanılan deneysel hayvan modelidir (Constantinescu ve ark., 2011). EAE modelinin ilk versiyonlarında hastalık, subpial beyaz cevher homojenatı, miyelin özütleri ya da tümüyle miyelin proteinleri (temel miyelin proteini [MBP], miyelin oligodentrosit glikoprotein [MOG], proteolipid proteini [PLP]) kullanılarak indüklenmiştir (Amor ve Baker, 2009). EAE'nin güncel versiyonlarında temel olarak iki yol izlenmektedir. İlki aktif immünizasyon

ikincisi pasif transferdir. Aktif immünizasyonda oto reaktif T-lenfositlerin istilasından MSS'deki infiltrasyon ve demiyelinizasyona kadar olan tüm süreç aynı hayvan üzerinde gerçekleşir ve pertusis toksini kullanılarak hayvanın kan beyin bariyeri geçirgenliği artırılır ve pasif mikobakterium tuberkülosis içeren komplet freund adjuvanı (CFA) kullanılarak immünüze edilir. Pasif transferde ise pertusis toksini kullanılmaz, başka bir farede miyelin peptidiyle oluşturulan immünizasyon sonrası alınan lenf nodu kültürleriyle genetik olarak birebir aynı başka bir fareye intraperitoneal enjeksiyonuyla pasif transferi gerçekleştirilir ve enjeksiyon yapılan farede EAE indüklenmiş olur (Amor ve ark., 2019). İnflamasyon, demiyelinizasyon, aksonal kayıp ve gliosis MS' te patolojik anahtar süreçleri oluşturmaktadır (Amor ve Baker, 2009). Meydana gelen inflamasyon, otoimmünite ve oligodentrosit apoptozisi miyelin kaybının başlıca nedenidir. EAE' nin tipik klinik bulgusu, optik sinir ve beyin (özellikle subpial beyaz cevher ve beyin sapı) sıklıkla etkilenseler de spinal kordun torakolomber bölgesindeki inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkili olarak sürekli kötüleşen bir paralizidir (Amor ve Baker, 2019). EAE oluşturmak için birçok metot vardır. Biz deneylerimizde EAE' yi kuprizonla indükledik.

### **2.3. Demiyelinizasyon Oluşturmak İçin Kuprizon Modeli**

Toksik bir demiyelinizasyon modeli olan kuprizon modelinde genç erişkin fareler veya ratlar bakır şelatörü olan kuprizonla (bis-siklohegzanon oksaldihidrazon) beslenirler (**Şekil 1**) (Torkildsen ve ark., 2008). Kuprizonun fizyokimyasal davranışı ile ilgili bir hipoteze göre kuprizonla indüklenen patolojinin bakır ( $Cu^{++}$ ) eksikliğinden köken aldığını desteklemektedir. Bu hipotezde bakır ile şelasyon oluşturan kuprizon modeli CPZ- $Cu^{++}$  oligomerlerinin gastrointestinal yolda çökmesiyle sonuçlanır (Praet ve ark., 2014). Böylelikle  $Cu^{++}$ 'nin girdiği enzimatik reaksiyonlarda işlev yetersizliği görülür. Bu da oligodentrosit sitozolünde reaktif oksijen türlerinin ve reaktif nitrojen türlerinin artmasına ve lipid peroksidasyon son ürünlerinden olan malondialdehitin artışıyla sonuçlanarak bir dizi inflamasyona ve oligodentrositlerin apoptozisine zemin hazırlar. MSS içerisindeki aksonlara miyelin sağlayan bu oligodentrositlerin apoptozisi demiyelinizasyon sürecinin başlamasına ve demiyelinizan plakların oluşmasına neden olur. Oligodentrositlerin ölümüne yol açan bu modelde geçici ve yaygın bir demiyelinizasyon oluşturulmuş olur (Praet ve ark., 2014).

1960'lerden bu yana merkezi sinir sisteminde (MSS) önemli derecede değişiklik yapabilen net kuprizon dozunu belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Kemirgen yemine %0,2-0,6 arasındaki değerlerde kuprizon homojen bir şekilde karıştırıldığında önemli derecede miyelin değişiklikleri saptanmıştır (Vega-Riquer ve ark., 2019).

Kuprizonun neden sadece oligodentrositlerde spesifik hücre ölümüne yol açtığı bilinmemektedir. Ancak kuprizon, bakıra bağlı mitokondriyel enzimler olan sitokrom oksidaz ve monoamin oksidazın inhibisyonuna yol açan bakır şelatrdr. Böylelikle kuprizon kullanımı oligodentrositlerin enerji metabolizmasının bozulmasına yol açar (Matsushima ve Morell, 2001; Venturini, 1973). Bununla birlikte spontane remiyelinizasyon, nrotoksinin kesilmesinden 4 gün sonra gözlemlenebilir (Lindner ve ark., 2008). Bu da kuprizonla indüklenen deneysel MS modelini demiyelinizasyonu önleyebilecek ve remiyelinizasyonu uyarabilecek faktörleri incelemek için oldukça kullanışlı hale getirir (Lindner ve ark., 2008).



**şekil 1:** %0,6 kuprizonla homojen karıştırılmış 100 gram yemle beslenen ratlar.

#### 2.4. MS Patofizyolojisinde Oksidatif Stresin Rolü

Oksijen, canlılığımızın devamı için elzemdir ancak oksijenin metabolizması zararlı etkilere yol açabilmektedir. Üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ile buna karşı antioksidan defans mekanizmasının yetersiz olması sebebiyle oksidatif stres oluşmaktadır (Gonsette, 2008; Radi ve ark., 2014). Fizyolojik koşullar altında mitokondriyal oksidatif metabolizma, mitokondriyal elektron transport zincirinin son ürünü olarak enerji üretir. Ayrıca mitokondri, solunum transport zinciri komponentlerini ve hücre içinde serbest radikallerin temel üreticileri olan bir dizi enzimi birleştirir.

Serbest radikaller; reaktiviteyi indükleyebilen, son orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kimyasal türlerdir (Pegoretti ve ark., 2020). Serbest radikaller; lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre ölümü ve nörolojik problemlere sebep olan bir süreci tetikler (Khajehnasiri ve ark., 2013). Lipid peroksidasyonu, serbest radikal aracılı ve direkt olarak hücre zarlarına hasar veren sorunların en başında gelen aynı zamanda MDA gibi aldehitleri içeren birçok sekonder ürünün sentezlenmesine neden olan bir faktördür (Sharifian ve ark., 2005). MS'te oksidatif stresin dolayısıyla lipid peroksidasyonunun zararlı etkileri; oligodentrosit apoptozisi, miyelin kaybı, aksonal hasar ve bu yıkımların sonucu olarak ortaya çıkan nörolojik plaklardır (Gonsette, 2008).

Oksidatif stresi genellikle başlatan faktör nitrik oksit ( $\text{NO}^-$ ) ile süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) arasındaki tepkimeden oluşan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ).  $\text{NO}$  eşsiz özellikleriyle neredeyse her organda yerel sinyallerin iletimini mümkün kılan gerekli bir nörotransmitterdir.  $\text{NO}$ 'nun toksik etkileri kendisi ile ilgili değil oksidasyon sürecinde peroksinitrit üretimi ile ilgilidir (Gonsette, 2008).

Neredeyse tüm dokularda hasar oluşturacak inflamatuvar olaylar oksidatif stresten kaynaklanır. MS' teki tabloda merkezi sinir sisteminde miyelin üreten oligodentrositlerin apoptozisine yol açan süreçleri tetikleyen faktörler arasında oksidatif stresin rolü büyüktür (Jana ve Pahan, 2007). Oligodentrositlerin kaybı bir dizi nöroinflamasyon başlangıcının habercisidir. Yüksek konsantrasyondaki ROS' lar nekrotik hücre ölümüne yol açsa da oksidatif stres koşulları altında apoptotik hücre ölümlerinin de olabileceği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Mronga ve ark., 2004). Dolayısıyla MS patofizyolojisinde oligodentrogial hücrelerin kaybına neden olan oksidatif stresin rolü göz ardı edilemez.

## 2.5. Ghrelinin Özellikleri ve Deneysel Açıdan Kullanılma Amacı

Oreksijenik ve adipojenik bir peptit olan ghrelin, ilk olarak 1999 yılında bir sıçan midesinde büyüme hormonu (GH) salgılanmasını sağlayan bir aracı olarak keşfedilmiştir (Kojima ve ark., 1999). Ghrelinin etkisi sadece GH salgılanması üzerine değildir. Besin alımını arttırır, enerji homeostazisini düzenler, yağ yıkımını azaltarak enerji harcanmasını da azaltır (Nakazato ve ark., 2001).

Ghrelin hücre nükleusunda preproghrelin geni tarafından kodlanır, endoplazmik retikulumda desaçil ghrelin ve açıl ghrelina dönüştürülür daha sonrasında golgi aparatına gelir. Golgi aparatından sekretuar granüller ile dolaşıma salgılanır, hedef dokudaki ghrelin salgılayıcı reseptör 1'e (GHSR1) bağlanır ve çeşitli fizyolojik etkiler gösterir (Müller ve ark., 2015).

Giriş bölümünde bahsettiğimiz MS tedavisinin ana prensiplerinden olan immünsüpresif ajanlardan biri de ghrelindir, immünsüpresif etkileri olan ghrelinin aynı zamanda anti inflamatuar özellikleri laboratuvar ortamında kanıtlanmıştır (Miyake ve Yamamura, 2009). Ghrelinin birçok sistem üzerine etkileri bulunmaktadır (**Tablo 2**). Son yıllarda deneysel çalışmalarda farklı amaçlarla kullanılan ghrelinin antioksidan özellik gösterip göstermediği bilinmemektedir. Buradan yola çıkarak ghrelinin antioksidan özelliğini araştırmak büyük önem taşımaktadır.

**Tablo 2:** Ghrelinin farklı doku/organlar üzerine etkileri (Müller ve ark., 2015)

<b>Hedef doku/organ</b>	<b>Etkileri</b>	
<b>Hipotalamus</b>	-İştahı arttırır	-Besin alımını arttırır
<b>Hipotalamik olmayan alanlar</b>	-Tat duyusu -Ödül davranışı -Koku alma ve koklama -Öğrenme ve hafıza	-Depresyon -Nöroprotektif -Uyku ve uyanıklık ritmini düzenler
<b>Hipofiz</b>	-GH ↑	-ACTH ↑
<b>Sempatik sinir sistemi</b>	SSS aktivitesi ↓	
<b>Pankreas</b>	-İnsülin sekresyonu ↓ -Glikoz metabolizmasını düzenler	-İnsülin sensitivitesi ↑
<b>Karaciğer</b>	-İGF1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) ↑	
<b>Bağırsak</b>	-Bağırsak motilitesi ↑	
<b>Yağ doku</b>	-Lipid oksidasyonu ↓	-İnflamasyon ↓ -Lipogenezis ↑
<b>Mide</b>	-Gastrik boşalma ↑ -Gastrik asit sekresyonu ↑	-Gastrik motilite ↑
<b>Kalp</b>	-Kardiyak output ↑	-Kardiyak kontraktilite ↑ -Vazodilatasyon ↑
<b>Kahverengi Yağ Dokusu</b>	-Termogenezis ↓	

Ghrelinin bu etki alanının genişliğinden yola çıkarak oksidatif strese karşı bir defans mekanizmasında rol alıp almadığını belirleyebilmek için ghrelinin daha önceden kanıtlanmış olan (Müller ve ark., 2015; Ferrini ve ark., 2009) antiinflamatuvar, hafıza koruyucu, nöroprotektif özelliklerinin yanında antioksidan özelliklerinin araştırılması oldukça önem arz etmektedir.

### **2.5.1. Ghrelinin santral sinir sistemindeki rolü**

Keşfedildiği zamandan bu yana ghrelinin merkezi sinir sistemindeki temel kaynağı hipotalamus olarak düşünülmüştür. Bazı çalışmalarda belirtildiği gibi ghrelin, hipotalamus haricinde de özel nöron gruplarında sentez edilip etki gösterir. Orta beyinde, arka beyinde, hipokampüste ve spinal kordda ghrelinin varlığı belirlenmiştir (Ferrini ve ark., 2009).

Ghrelinin hipotalamustaki görevleri sadece beslenme davranışı ve enerji metabolizması üzerine değil, aynı zamanda uyku-uyanıklık durumunun düzenlenmesi üzerine de etki gösterir (Steiger, 2007). Ancak uygulama şekline göre farklı etkiler gösterir. Sistemik olarak uygulanması, uyku kalitesini artırır (Obal ve ark., 2003). İntraserebroventriküler (İCV) olarak uygulanması ise uyanıklığı, zindeliği artırır (Szentirmai ve ark., 2006).

Beynin öğrenme ve hafıza becerileri ile ilgili alanları hipokampus, amigdala, dorsal rafe nükleusudur (DRN). Ghrelinin hafıza işlevleriyle ilgili bir rolünün olduğu ile ilgili ilk kanıtlar Carlini ve arkadaşları tarafından 2002 yılında sunulmuştur (Carlini ve ark., 2002). Bu çalışmada ilk olarak davranış deneyleri yapılmış ve ghrelinin ICV enjeksiyonunun hafıza gücünü arttırdığı söylenmiştir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Hayvanlar

Sunulan çalışmada 48 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, 12 saat karanlık-12 saat aydınlık döngüsüne uygun olarak, sabit ısıli bir odada (21 °C) ve %40-60 nem koşulları altında tutuldu. Ratlar, laboratuvar sıçan yemi ve şebeke suyu kullanılarak, serbest yem ve su alımı sağlanarak VAN YYÜ Deneysel Tıp ve Uygulama Merkezinde barındırıldı. Çalışma VAN Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışma, VAN Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 31.12.2020 tarih ve 2021/12-32 sayılı etik onayı ile gerçekleştirildi.

Ratlar 21 günlükken 6 gruba ayrıldı (n=8):

- I. Demiyelinizasyonun kontrol (DM-KNT) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süttten kesildi ve 2 hafta normal diyetle beslendi. 35. gün sakrifiye edildi.
- II. Demiyelinizasyon (DM) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süttten kesildi ve 2 hafta %0,6 CPZ ile karıştırılmış yemlerle beslendi. 35. gün sakrifiye edildi.
- III. Remiyelinizasyon (RM) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süttten kesildi ve 2 hafta %0,6 CPZ ile karıştırılmış yemlerle beslendi. 35. gün normal diyete dönüldü ve 35 ila 42. gün arası 7 gün boyunca 1 ml/kg ip serum fizyolojik verildi.
- IV. Remiyelinizasyon (RM-G20) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süttten kesildiler ve 2 hafta %0,6 CPZ ile karıştırılmış yemlerle beslendiler. 35. gün normal diyete dönüldü ve 35 ila 42. gün arası 7 gün boyunca ghrelin (20 µg/kg, ip) enjeksiyonları uygulandı.
- V. Remiyelinizasyon (RM-G40) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süttten kesildi ve 2 hafta %0,6 CPZ ile karıştırılmış yemlerle beslendiler. 35. Gün normal diyete dönüldü ve 35 ila 42. Gün arası 7 gün boyunca ghrelin (40 µg/kg, ip) enjeksiyonları uygulandı.

VI. Remiyelinizasyon kontrol (RM-KNT) grubu: Sıçanlar 21 günlükken süten kesildi ve normal yemle beslendiler. 35 ila 42. gün arası 7 gün boyunca 1 ml/kg ip serum fizyolojik enjeksiyonları uygulandı (Silvestroff ve ark., 2012).

### 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Kuprizon (Bis(cyclohexanone) oxaldihidrazone) (*Sigma- Aldrich, Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765*)
- Ghrelin (*GenScript, Cat. No. RP10781*)
- Hematoksilen Boya (*Harris*) (*C.I. 75290 REF: BS01-104-1000 LOT: BSH 190321*)
- Eozin Boya (*Norateks 104012*)
- Luxol Fast Blue Boya (*ScyTek 205s 600w Logan-Utah USA 800-729-8350 REF: LBC-2 LOT: 61230*)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kuprizonla deneysel MS modelinin indüklenmesi

DM, RM, RM-G20, RM-G40 grupları 2 hafta boyunca %0,6 kuprizonlu yem ile beslendi. %0,6 kuprizonlu yem her sabah taze olarak hazırlandı: Pellet yem mutfak robotunda iyice öğütülene kadar karıştırılıp toz haline getirildi. Toz halindeki yem %0,6 kuprizonla homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra hayvanlara verildi. %0,6 CPZ ile karıştırılmış yemlerle beslenen grupların yedikleri yem miktarı ve hayvanların ağırlıkları düzenli bir şekilde not edildi.

Toksik bir madde olan CPZ' nin vereceği zararı önlemek amacıyla tüm hijyen kurallarına riayet edilerek üretici firmanın talimatları doğrultusunda deney esnasında N95 maske (toz maskesi tipi), siperlik, tulum ve eldiven kullanıldı.

### 3.2.2. Y-maze testi

DM ve DM-KNT grubundaki ratlara deneyin 35. günü, diğer gruplardaki ratlara deneyin 42. gününde Y maze testi uygulandı. Y-labirenti her iki kol arasında 120° açı olan üç koldan (30 cm uzunluğunda, 8 cm genişliğinde ve 15 cm yüksekliğinde) oluşmaktadır (**Şekil 2**). Kollar rastgele A, B ve C olarak adlandırıldı. Çalışma sırasında,

sıçanlar ilk testte başlangıç koluna yerleştirildi; sıçanların tüm kolları keşfetmesine izin verildi ve toplam 6 dakika süreyle kol girişlerinin sayısı ve sırası kaydedildi. Başlangıç kolundan çıkma latansı kaydedildi; Total kol girişi sayısı lokomotor aktiviteyi göstermektedir ve örtüşen üçlü setler biçiminde (ABC, BCA, CAB, vb.) peş peşe üç kola girişler spontane değişen davranış yüzdesini hesaplamak için kullanıldı. Örneğin ABC kollarına giriş dizisi ACBABCABAB biçimindedir, bu durumda 5 değişim olacaktır: (1) ACB, (2) CBA, (3) BAC, (4) ACB, (5) CBA. Bunlar başarılı (pozitif) değişimlerdir. Daha sonra başarılı değişimlerin sayısı değişim olanaklarının sayısına bölündü. Bilişsel davranış ve çalışma belleği, aşağıdaki formüle göre hesaplandı: % spontane değişimler:  $[\text{yapılan başarılı değişimlerin sayısı} / (\text{total kol girişi sayısı} - 2)] \times 100$  (Kola ve ark., 2017; Attrey ve ark., 2012).



**Şekil 2:** Y-maze testi

### 3.2.3. Doku alımı

Davranış deneyleri bittikten sonra anestezi altındaki (10 mg/ kg/ ip ksilazin ve 50 mg/ kg/ ip ketamin) ratların kanları kalbin apeksinden kardiyak ponksiyon ile alınarak sakrifiye edildi (DM ve DM-KNT grubuna deneyin 35.günüde Y-maze deneyi yapıp sakrifiye edildi, diğer gruplara deneyin 42.günüde Y-maze deneyi yapıp sakrifiye edildi). Ardından, beyin hızlıca izole edildi. Her gruptan alınan beyin dokusunun bir hemisferi ELISA çalışmalarına, diğer hemisfer ise patolojik parametrelerin çalışılmasına uygun biçimde alındı. Bir hemisfer, çalışma gününe kadar ELISA için -80 °C'de muhafaza edildi. Diğer hemisfer ise çalışma gününe kadar patoloji için formaldehitte muhafaza edildi.

### 3.2.4. Oksidatif stres parametrelerinin ölçümü

Beyin dokusunda CAT (*BT-LAB E0869Ra*), SOD (*BT-LAB E0168Ra*), GSH-PX (*BT-LAB E1242Ra*) ve MDA (*BT-LAB E0156Ra*) seviyeleri ELISA yöntemi ile ticari kitler kullanılarak Bio-Tek ELX800 cihazında çalışıldı.

Ratlardan alınan beyin dokuları hassas terazide ölçülerek 200'er mg parçalara ayrılıp küçük tüplere alındı. Bu tüplerin üstüne 1,8 ml ve 50 mM'lik fosfat tamponu (pH:7,4) ilave edildi (ağırlık/ hacim = 1/10). Bu karışımdaki katı halde olan beyin dokusunu sıvılaştırmak ve homojenize etmek için bir homojenizatör kullanılarak işlem yapıldı (14x5 tekrar karıştırılıp 10 saniye beklendi). Homojenize edilen tüpler 3000 rpm ve 6 °C de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası küçük parçacıklar dibe çökerken süpernatant (üst faz) sıvısı üstte kaldı. Süpernatantlar yeni ependorf tüplerine alındı ve ELISA kitleriyle beraber kullanıma hazır hale getirildi. Bundan sonraki aşamada SOD, GSHPX, MDA ve CAT kitlerinin kutuları içindeki standart prosedürlere göre işlem tamamlandı.

Dokularda protein ölçümü Bradford yöntemiyle gerçekleştirildi (Bradford, 1976): ELISA testleri için hazır hale getirilen süpernatantlar protein ölçümü için de kullanıldı. Drabkin solüsyonu hazırlandı: 100 mg Commesie Brilliant Blue G-250 %95'lik 50 ml etanolde çözüldükten sonra üzerine 100 ml %95'lik fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin son hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı. Kör tüpüne 4900 µl drabkin solüsyonu ve 100 µl saf su ilave edildi. Numune tüplerine ise 4900 µl drabkin solüsyonu, 90 µl saf su ve 10

ul süpernatant eklendi ve 10 dk. boyunca ışık görmeyen bir yerde bekletildi. Kör tüpleri ve numune tüplerinin 595 nanometre dalga boylu spektrofotometri cihazında protein ölçümleri yapıldı.

### **3.2.5. Histopatolojik inceleme**

Histopatolojik yöntemler, nörolojik olarak MS ile uyumlu inflamatuvar demiyelinize lezyonları teşhis etmede, hasarı ve onarımın gösterilmesinde kullanılmaktadır. Çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda MS tanısı, meydana gelen hasarların karakterizasyonu ve uygulanan tedavilerdeki onarım düzeylerin ortaya koyulmasında altın standart histopatolojik korelasyondur.

MS tanı ve tedavi modellerinde doku ve hücre düzeyinde meydana gelen değişimlerin gösterilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, çalışmada doku ve hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimlerin incelenmesinde histolojik yöntemlerin kullanılması planlanmaktadır.

Hayvanlardan alınan beyin %4 fosfat tamponlu paraformaldehit (PFA) (pH 7.4) içerisinde 24 saat bekletilerek tespit edildi. Tespit aşaması bittikten sonra beyinler bir gece boyunca fosfat tamponu (PBS) içerisinde yıkama yapılarak tespit solusyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra rutin histolojik takip işlemleri uygulandı. Rutin doku takibinde öncelikle yükselen derecelerdeki alkol serisi %60 alkolden başlanarak, kontrollü olarak, ortalama 1 saat süreyle ve sırasıyla %70, %80, %96, %100 (I), %100 (II) ve %100 (III) şeklinde uygulandı. Bu aşamayı takiben şeffaflandırma işlemi yapıldı. Ksilol I, ksilol II ve ksilol III'de 15'er dk. bekletildi. Daha sonra, doku örnekleri 30 dk. parafinde bekletildi. Parafinden çıkarılan örnekler erimiş parafin blokların içerisine gömüldü. Parafin bloklardan, mikrotomda 5µm kalınlığında kesitler poly-L-lysin'li lamlara alındı. Alınan beyin kesitleri histolojik boyama yapılarak değerlendirildi.

### **3.2.6. Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama**

Beyin kesitleri H&E ile boyandı. Dokular kesildikten sonra, 60 °C'de 2 saat bekletildi. Daha sonra, dokular 30'ar dk. yukarıda bahsedildiği gibi ksilol-I-II-III aşamalarından geçirildi. Ksilol aşamasından sonra azalan alkol serilerinde (%100-95-80) 2'şer dk. bekletildi. Alkol serilerinden sonra, kesitler distile suda yıkandı. Kesitler hematoksilen boyası ile 3 dk. muamele edildi. Sonrasında, akarsu içerisinde 5 dk. bekletildi. Hafif pembe renk oluşana kadar asit alkol içerisinde bekletildikten sonra akarsuda yıkandı. Yıkama işleminden sonra, kesitler mor renk oluşana kadar amonyaklı su ile muamele edildikten sonra iyice yıkandı. Bu aşamayı takiben, kesitler eozin boyası (2.5 dk.) ile boyandı. Eozin boyamadan sonra, artan alkol serilerinden (%95-100-100) geçirildi. Daha sonra, kesitler 15'er dk. ksilol serilerinden (ksilol-I-II-III) geçirildi. Sonrasında, kesitler entellan ile kapatıldı. Kapatma işleminden sonra, kesitler Olympus DP74 kamera ataçmanlı Olympus BX53 mikroskopta incelendi.

### **3.2.7. Luxol Fast Blue (LFB) miyelin boyama**

Fikse edilmiş dokularda ise miyelinin durumu luxol fast blue (LFB) miyelin boyama ile gösterilir. Bu boya normal miyeline kuvvetle bağlanır, miyelin yıkımı olan alanlar ise boya almazlar.

Luxol fast blue, alkolde çözünebilen ve miyelin kılıfının lipoproteinlerine bağlanma özelliği gösteren bir bakır ftalosiyenin boyasıdır. Luxol fast blue boyamada miyelin lifleri mavi, sinir hücreleri mor görünür. LFB boyama işleminde aşağıdaki basamaklar yapıldı:

- Deparafinize edilen dokular etil alkol serisinden (%99-%95-%70) geçirildi.
- Kesitler Luxol fast blue solüsyonu içinde 56°C'de bir gece bekletildi.
- %95'lik etil alkol içinde çalkalandıktan sonra distile suda yıkama işlemi yapıldı.
- Lityum karbonat solüsyonu içinde 30 saniye differansiye edildi (Bu aşamada substantia grisea ve substantia alba kısımlarının ayırımı görülür).
- Differansiye işlemine %70'lik etil alkolde 30 saniye devam edildi. Daha sonra diferansiyasyon aşamasını durdurmak için kesitler distile suda bekletildi. Bu aşamada substantia grisea ve substantia alba kısımlarının ayırımı görülür. Mikroskopik

görüntüleme ilgili bölgelerin ayırt edilememesi durumunda “Lityum karbonat” aşamasından itibaren işlem tekrarlandı.

- Kesitler Cresyl violet solüsyonunda 30 saniye bekletildi.
- Distile su içerisinde yıkama işlemi yapıldı.
- %95’lik etil alkolde 2 defa çalkalandı.
- %100 etil alkolden geçirildi.
- Kesitler ksilenden geçirildi.
- Kesitler entellan kullanılarak lamelle kapatıldıktan sonra Olympus DP74 kamera ataçmanlı Olympus BX53 mikroskopta incelemeler yapıldı.

Kesitlerin ortalama 8-10 bölümü aşağıdaki değerlendirme standardı kullanılarak skorlandı (Qiu ve ark., 2018):

İnflamasyon için:

0 = inflamatuvar hücre yok;

1 = birkaç dağınık inflamatuvar hücre;

2 = kan damarlarının etrafına inflamatuvar sızıntı;

3 = parankim içine yayılmış geniş perivasküler manşet görünümü.

Demiyelinizasyon için:

0 = yok;

1 = nadir odaklar;

2 = birkaç demiyelinizasyon alanı;

3 = büyük (birleşen) demiyelinizasyon alanları.

Luxol fast boyama sonrasındaki miyelinli bölgelerinin nicel miktar tayini Image-J yazılımı kullanılarak mavi renk yoğunluğu ölçülmüştür (Mojaverrostami ve ark. , 2020).

### **3.2.8. İstatistik**

Üzerinde durulan özellikler için Tanımlayıcı İstatistikler; Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Spearman Korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Davranış Deneyleri Bulguları

Y-maze davranış deneyinde başlangıç kolundan çıkış latansı, total kol giriş sayısı ve başarılı değişim sayısı gruplardaki her bir rat için kaydedildi ve % spontane değişimler hesaplandı. Bu özellikler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı (**Tablo 3**).

**Tablo 3:** Y-maze test parametrelerinin farklı gruplar arasındaki ilişkiyi gösteren tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırmaları

	Grup	Ort.	Med	Std. Sapma	Std. Hata	Min.	Maks.	p
Total kol girişi sayısı	DM	13,13	13,50	3,14	1,11	8,00	18,00	,225
	DM-KNT	11,63	10,50	5,42	1,92	4,00	22,00	
	RM	13,14	12,00	3,80	1,44	9,00	21,00	
	RM-KNT	12,29	11,00	3,55	1,34	8,00	18,00	
	RM-G20	9,00	8,00	5,83	2,92	3,00	17,00	
	RM-G40	8,71	9,00	3,86	1,46	4,00	15,00	
Başarılı değişim sayısı	DM	7,38	7,50	1,77	,63	5,00	10,00	,389
	DM-KNT	6,25	6,50	3,28	1,16	2,00	11,00	
	RM	7,00	7,00	3,92	1,48	2,00	14,00	
	RM-KNT	6,57	6,00	3,99	1,51	1,00	12,00	
	RM-G20	4,25	2,50	4,57	2,29	1,00	11,00	
	RM-G40	4,57	5,00	2,30	,87	2,00	9,00	
Başlangıç kolundan çıkış latansı	DM	14,00	6,00	19,63	6,94	3,00	61,00	,052
	DM-KNT	7,25	4,50	7,67	2,71	3,00	26,00	
	RM	7,14	3,00	6,04	2,28	2,00	16,00	
	RM-KNT	8,00	5,00	7,39	2,79	2,00	21,00	
	RM-G20	6,50	4,00	6,40	3,20	2,00	16,00	
	RM-G40	2,71	3,00	,95	,36	1,00	4,00	
% Spontane değişim	DM	68,88	67,95	16,90	5,97	45,45	100,00	,623
	DM-KNT	71,59	79,17	26,54	9,38	22,22	100,00	
	RM	59,57	63,64	20,30	7,67	28,57	90,00	
	RM-KNT	58,95	66,67	23,56	8,90	16,67	92,31	
	RM-G20	64,17	61,67	28,98	14,49	33,33	100,00	
	RM-G40	76,22	71,43	24,39	9,22	42,86	100,00	

Değerlendirilen parametreler bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ).

Total kol girişi sayısı, başarılı değişim sayısı, başlangıç kolundan çıkış latansı ve % spontane değişim arasındaki korelasyon ilişkisine bakıldı (Tablo 4).

**Tablo 4. Korelasyonlar**

**Grup = DM**

	Total kol girişi sayısı	Başarılı değişim sayısı	Başlangıç kolundan çıkış latansı	%Spontane değişim
Total kol girişi sayısı	1,000			
Başarılı değişim sayısı	,652	1,000		
Başlangıç kolundan çıkış latansı	,228	-,244	1,000	
%Spontane değişim	-,659	,073	-,749 <sup>a</sup>	1,000

a: % Spontane değişim ve başlangıç kolundan çıkış latansı arasında negatif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ).

**Grup = DM-KNT**

	Total kol girişi sayısı	Başarılı değişim sayısı	Başlangıç kolundan çıkış latansı	%Spontane değişim
Total kol girişi sayısı	1,000			
Başarılı değişim sayısı	,723 <sup>a</sup>	1,000		
Başlangıç kolundan çıkış latansı	-,331	-,093	1,000	
%Spontane değişim	-,699	-,049	,398	1,000

a: başarılı değişim sayısı ve total kol girişi arasında pozitif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ).

**Grup = RM**

	<b>Total kol girişi sayısı</b>	<b>Başarılı değişim sayısı</b>	<b>Başlangıç kolundan çıkış latansı</b>	<b>%Spontane değişim</b>
<b>Total kol girişi sayısı</b>	1,000			
<b>Başarılı değişim sayısı</b>	,847 <sup>a</sup>	1,000		
<b>Başlangıç kolundan çıkış latansı</b>	-,411	,000	1,000	
<b>%Spontane değişim</b>	,721	,964 <sup>b</sup>	,148	1,000

a: başarılı değişim sayısı ve total kol girişi arasında pozitif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ); b: % Spontane değişim ve başarılı değişim sayısı arasında pozitif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,01$ ).

**Grup = RM-KNT**

	<b>Total kol girişi sayısı</b>	<b>Başarılı değişim sayısı</b>	<b>Başlangıç kolundan çıkış latansı</b>	<b>%Spontane değişim</b>
<b>Total kol girişi sayısı</b>	1,000			
<b>Başarılı değişim sayısı</b>	,936 <sup>b</sup>	1,000		
<b>Başlangıç kolundan çıkış latansı</b>	-,791 <sup>a</sup>	-,582	1,000	
<b>%Spontane değişim</b>	,882 <sup>b</sup>	,982 <sup>b</sup>	-,491	1,000

a: Başlangıç kolundan çıkış latansı ile total kol girişi sayısı arasında negatif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ); b: % Spontane değişim ile total kol girişi arasında ve % Spontane değişim ile başarılı değişim sayısı arasında pozitif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,01$ ).

#### Grup = RM-G20

	Total kol girişi sayısı	Başarılı değişim sayısı	Başlangıç kolundan çıkış latansı	%Spontane değişim
Total kol girişi sayısı	1,000			
Başarılı değişim sayısı	,949	1,000		
Başlangıç kolundan çıkış latansı	,500	,316	1,000	
%Spontane değişim	-,316	-,200	,316	1,000

Gruplar arasındaki değişkenler arasında anlamlı bir korelasyon yoktur ( $p>0,05$ ).

#### Grup = RM-G40

	Total kol girişi sayısı	Başarılı değişim sayısı	Başlangıç kolundan çıkış latansı	%Spontane değişim
Total kol girişi sayısı	1,000			
Başarılı değişim sayısı	,821 <sup>a</sup>	1,000		
Başlangıç kolundan çıkış latansı	,716	,434	1,000	
%Spontane değişim	-,767 <sup>a</sup>	-,291	-,695	1,000

a: başarılı değişim sayısı ile total kol girişi sayısı arasında pozitif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ); % spontane değişim ile total kol girişi sayısı arasında negatif anlamlı bir korelasyon vardır ( $p<0,05$ ).

#### 4.2. Oksidatif Stres Parametre Bulguları

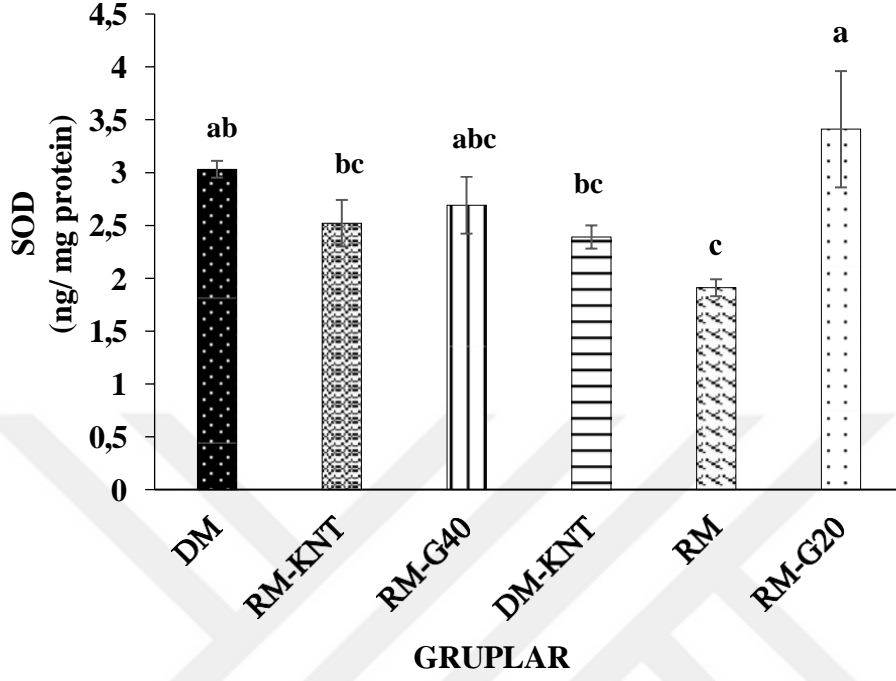
Bu çalışmada oksidatif stres parametrelerinden SOD, GSH-PX, MDA ve CAT çalışıldı. SOD değerleri bakımından RM-G20 grubunda RM-KNT, DM-KNT ve RM gruplarına kıyasla anlamlı bir artış tespit edildi ( $p=0,002$ ; **Tablo 5**; **Şekil 6**). GSH- PX değerleri bakımından RM grubunda RM-KNT ve RM-G20 gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ).

RM-G20 grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi (**Tablo 5; Şekil 7**;  $p<0,05$ ). MDA değerleri bakımından DM grubunda diğer bütün gruplar kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi (**Tablo 5; Şekil 8**;  $p<0,05$ ). CAT değerleri bakımından RM-KNT ve RM grubunda RM-G40 grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ), RM-G20 grubunda diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi (**Tablo 5; Şekil 9**;  $p<0,05$ ).

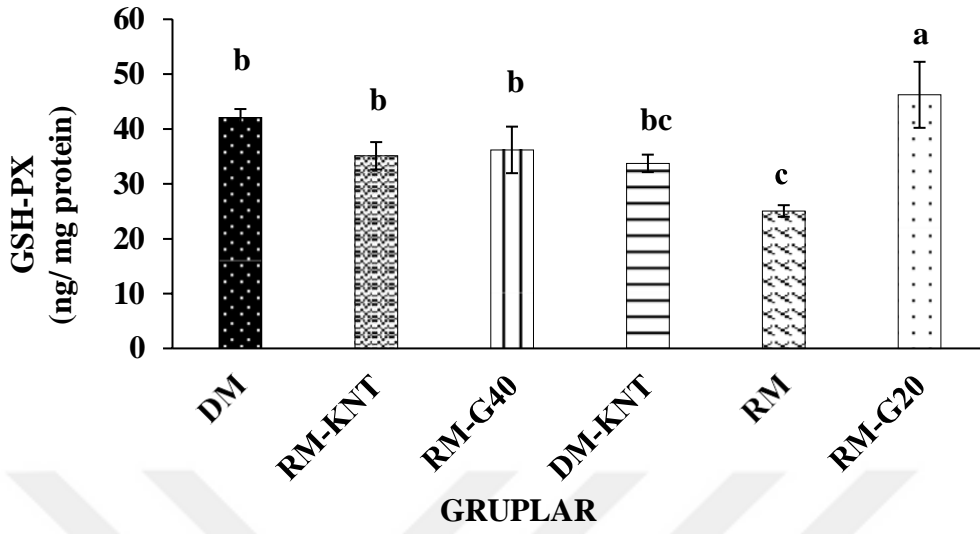
**Tablo 5:** Bazı antioksidan/ oksidan parametrelerine ait grupların ortalama ve standart hata değerleri (Ortalama $\pm$ SEM)

	DM	RM KNT	RM G40	DM KNT	RM	RM G20	P Değeri
<b>SOD</b> (ng/ mg)	3,03 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	2,52 $\pm$ 0,22 <sup>bc</sup>	2,69 $\pm$ 0,27 <sup>abc</sup>	2,39 $\pm$ 0,11 <sup>bc</sup>	1,91 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	3,41 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	<b>0,002</b>
<b>GSH-PX</b> (ng/ mg)	42,08 $\pm$ 1,55 <sup>b</sup>	35,11 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>	36,17 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	33,73 $\pm$ 1,59 <sup>bc</sup>	25,05 $\pm$ 1,06 <sup>c</sup>	46,24 $\pm$ 6,02 <sup>a</sup>	<b>0,001</b>
<b>MDA</b> (nmol/mg)	1,15 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,74 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,81 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	<b>0,001</b>
<b>CAT</b> (ng/ mg)	26,04 $\pm$ 0,83 <sup>bc</sup>	18,74 $\pm$ 1,80 <sup>c</sup>	24,33 $\pm$ 1,65 <sup>b</sup>	22,45 $\pm$ 0,98 <sup>bc</sup>	18,03 $\pm$ 0,47 <sup>c</sup>	29,63 $\pm$ 2,95 <sup>a</sup>	<b>0,001</b>

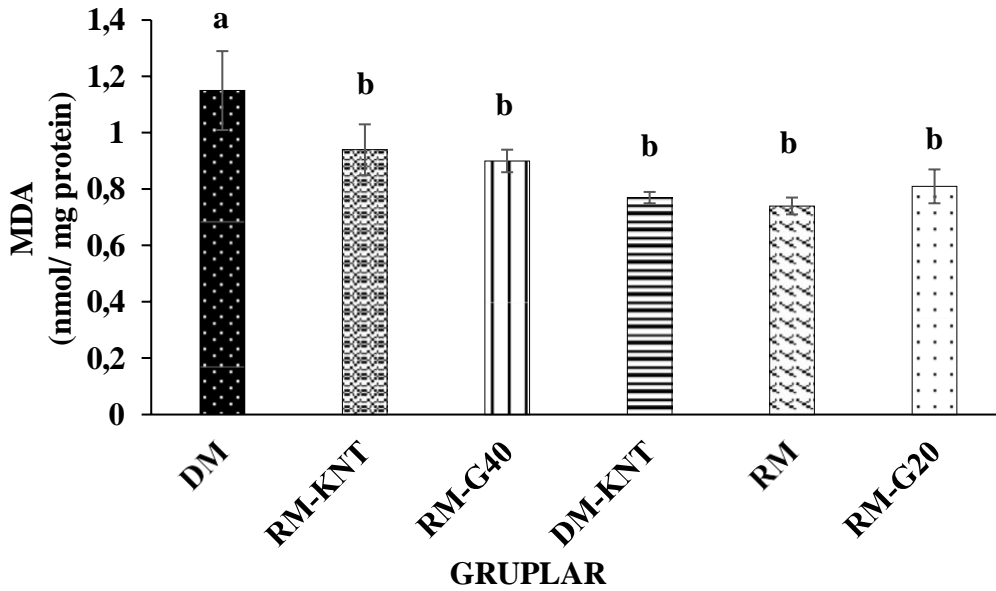
Veriler ortalama  $\pm$  Standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. DM: Demiyelinizasyon kontrol, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G40: Remiyelinizasyon ghelin 40, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-G20: Remiyelinizasyon ghelin 20, SOD: Süperoksit dismutaz, GSH-PX: Glutatyon peroksidaz, MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz. ng: nanogram, mg: miligram, nmol: nanomol <sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harf alan değerler birbirine göre anlamlıdır ( $p\leq 0,05$ ).



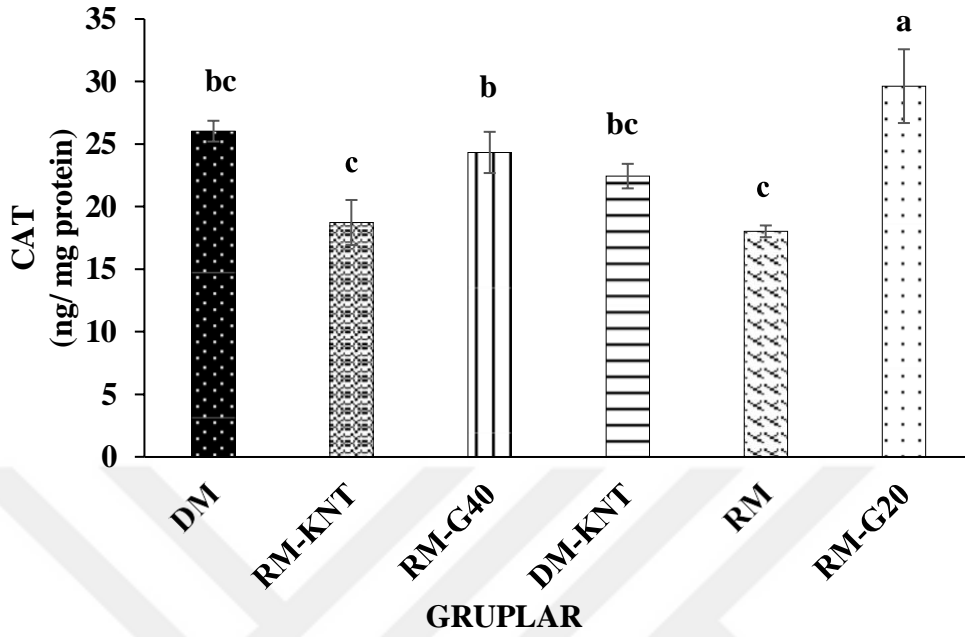
**Şekil 3:** Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan SOD üzerine etkileri. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b,c: Farklı harf alan değerler birbirlerine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4:** Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan GSH-PX üzerine etkileri. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b,c: Farklı harf alan değerler birbirlerine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 5:** Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda oksidatif stres parametrelerinden MDA üzerine etkileri. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b: Farklı harf alan değerler birbirlerine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).



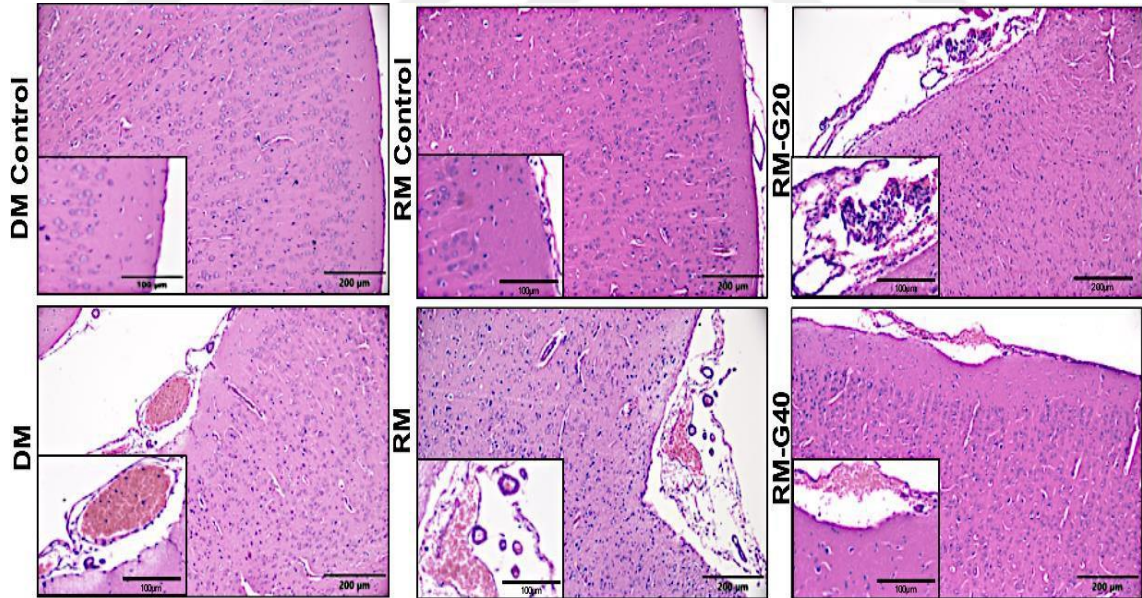
**Şekil 6:** Ghrelin uygulamasının sıçan beyin dokusunda antioksidan bir enzim olan CAT üzerine etkileri. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b,c: Farklı harf alan değerler birbirlerine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3. Histopatolojik Bulgular

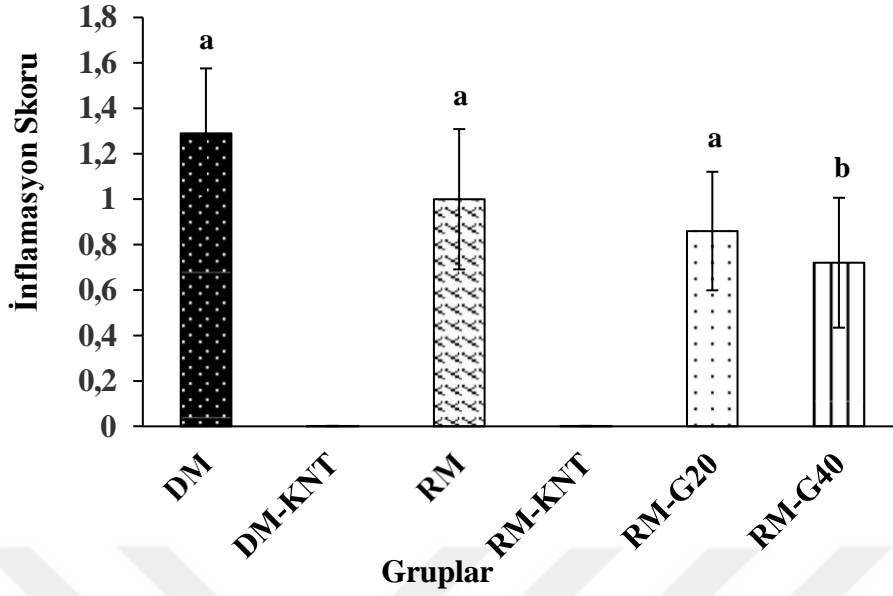
Çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda MS tanısı, meydana gelen hasarların karakterizasyonu ve uygulanan tedavilerdeki onarım düzeylerin ortaya koyulmasında altın standart histopatolojik korelasyondur. MS histopatolojik olarak immün hücre infiltrasyonu, akut demiyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterize edilmektedir (Brück, 2007).

MS tanı ve tedavi modellerinde doku ve hücre düzeyinde meydana gelen değişimlerin gösterilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışma kapsamında, histolojik prosedürlerin kombinasyonu, MS ile uyumlu inflamatuvar alanların tespit edilmesi, miyelin hasarı ve onarımın gösterilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Beyin dokusundaki genel histolojik organizasyon, vaskülerize alanlar ve lenfatik infiltrasyon bölgelerinin

Değerlendirilmesi H&E boya ile yapılmıştır. Kontrol gruplarının (DM-KNT ve RM-KNT) kortikal alanlarının normal olduğu tespit edilmiştir. Kuprizon ile indüklenen gruplarda (DM ve RM) ise vasküler alanlardaki artışın oldukça belirgin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, damar yapılarının hem içerisinde hem de çevresinde lenfatik infiltrasyon alanlarının varlığı tespit edilmiştir (**Şekil 10**). DM-KNT grubu ile kıyaslandığında, DM grubunda lenfatik hücre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,003$ ). Benzer şekilde RM-KNT grubuna kıyasla, RM grubundaki inflamatuvar hücre sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,009$ ) DM grubu ile kıyaslandığında, RM-G20 ( $p=0,266$ ) ve RM-G40 ( $p=0,173$ ) gruplarındaki inflamatuvar hücre gruplarında azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. RM-KNT grubu ile kıyaslandığında RM-G20 ( $p=0,008$ ) ve RM-G40 ( $p=0,24$ ) gruplarında inflamatuvar hücre sayılarında artışın olduğu bulunmuştur. Tedavi grupları kendi içerisinde kıyaslandığında, yüksek doz ghrelin (RM-G40) grubundaki vasküler alanlar ve inflamatuvar hücre gruplarındaki azalmanın daha fazla belirgin olduğu, ancak inflamatuvar hücre gruplarındaki azalmanın tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (**Şekil 11**;  $p=0,674$ )

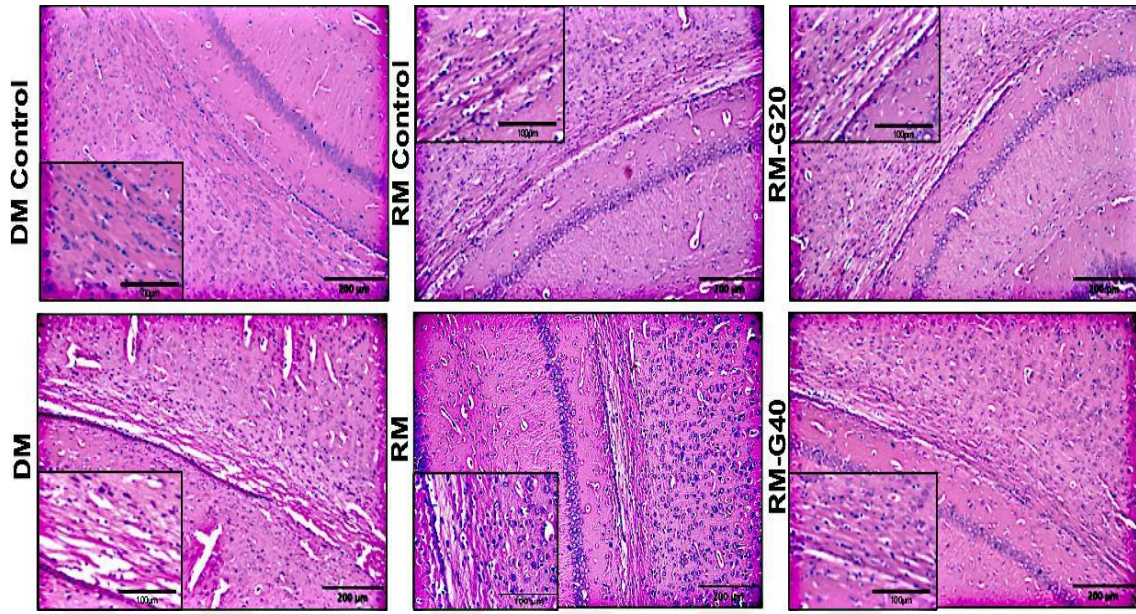


**Şekil-7:** Beynin kortikal alanlarının genel histolojik görüntü (H&E boyama, Scale bar: 100 µm ve 50 µm).

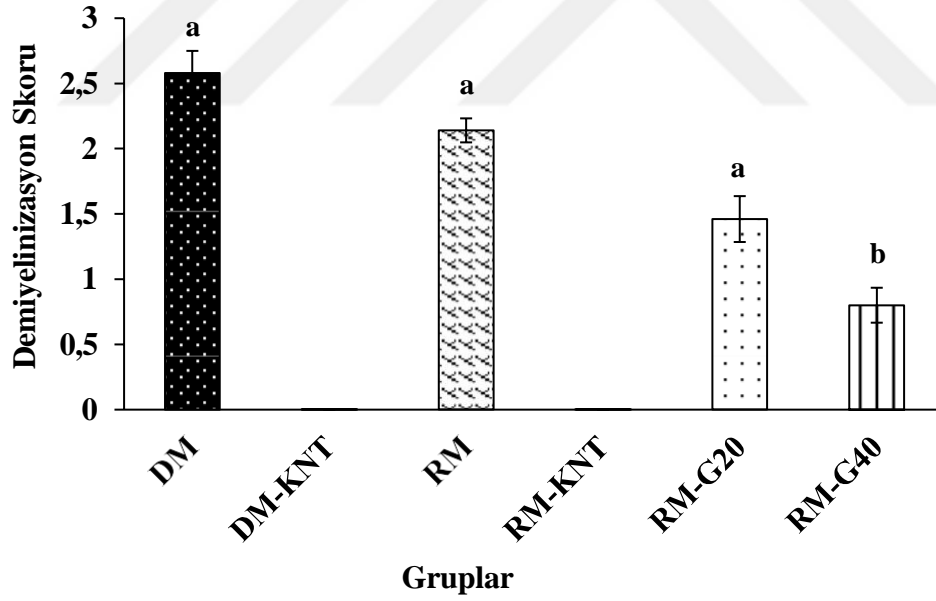


**Şekil-8:** Beynin kortikal alanlarında gruplar arasındaki inflamatuvar skor. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama ± standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b: Farklı harf alan gruplar birbirine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ )

Beyin kortikal alanlarının dışında, miyelin içeriğindeki değişimlerin tespit edilmesinde özellikle korpus kallozum alanları incelenmiştir. H&E boyama sonucunda kuprizon uygulamasına bağlı olarak geniş vakuolasyon alanları ile düzensiz, parçalanmış, demiyelinizan sinir liflerinin varlığı tespit edilmiştir (**Şekil 12**). Buna ek olarak, demiyelinize bölgelerde piknotik nükleus ile karakterize oligodentrositlerin varlığı izlenmiştir. Korpus kallozum bölgesinde, gruplar arasındaki demiyelinizasyon skorlaması metot kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. DM ve RM grupları kendi kontrolleri ile kıyaslandığında, DM ve RM gruplarının demiyelinize alanlarının belirgin olduğu bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). RM grubuna kıyasla RM-G20 ( $p < 0,01$ ) ve RM-G40'daki ( $p < 0,001$ ) demiyelinize alanların anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Tedavi grupları kendi içinde kıyaslandığında yüksek doz ghrelin uygulanan gruptaki demiyelinize alanlardaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 13**;  $p < 0,01$ ).

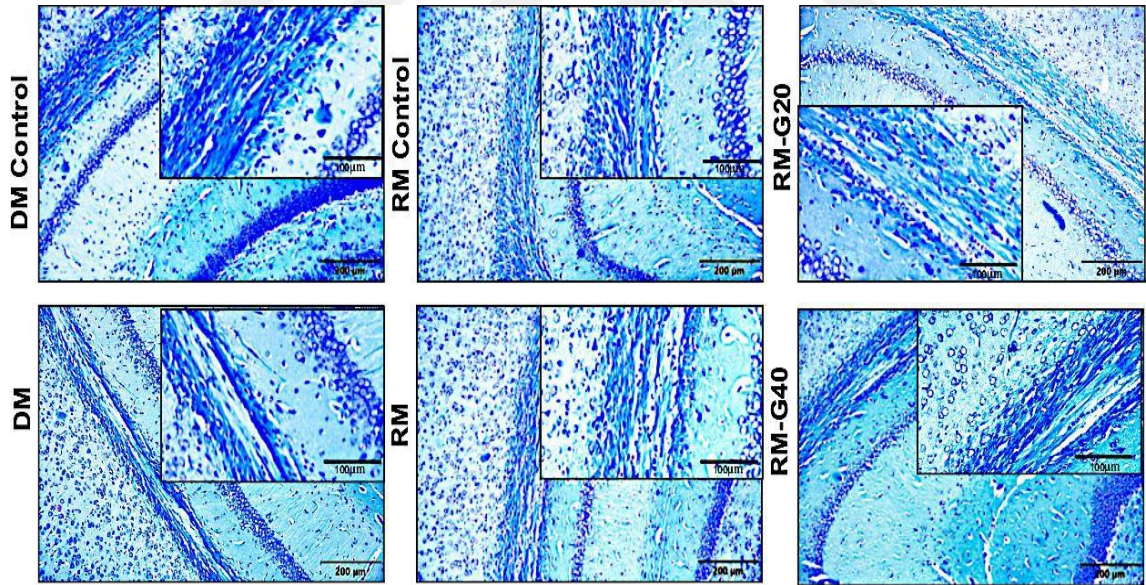


**Şekil 9:** Korpus kallozumda demiyelinize alanların histolojik görüntüsü (H&E boyama, Scale bar: 100 µm ve 50 µm).

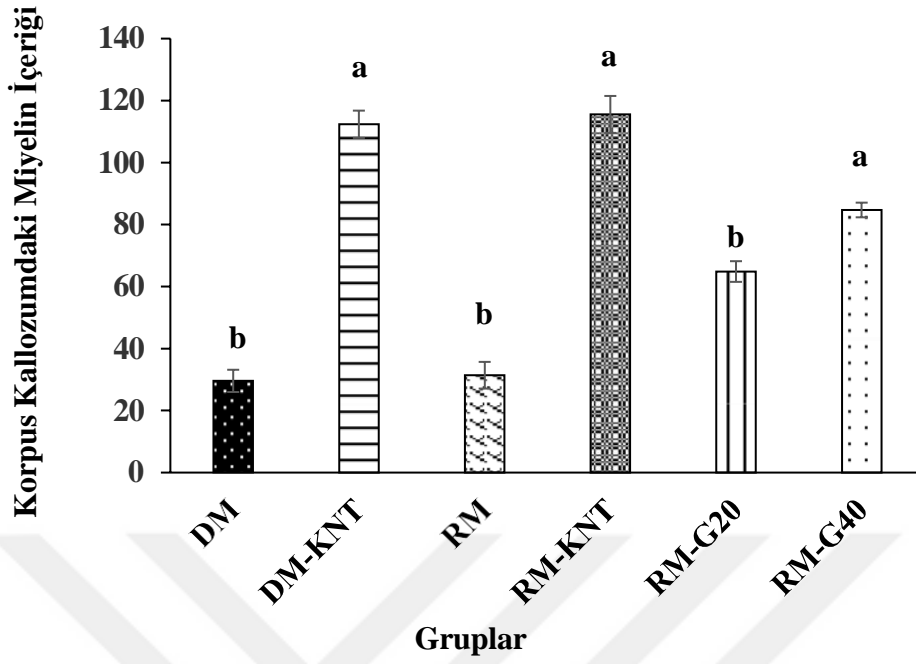


**Şekil 10:** Korpus kallozum bölgelerinde, gruplar arasındaki demiyelinizasyon skoru. DM: Demyelinizasyon, DM-KNT: Demyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama ± standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b: Farklı harf alan gruplar birbirine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).

H&E boyama sonucunda görülen miyelin değişimlerindeki bulguların konfirme edilmesi için dokulardaki miyelinizasyon düzeylerinin gösterilmesinde sıklıkla kullanılan LFB boyama yöntemi kullanılmıştır (Carriel ve ark., 2017). LFB boyama sonuçlarına bağlı olarak korpus kallosum bölgelerindeki miyelin içeriği İmage-J programı ile ölçülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, kuprizon ile indüksiyona bağlı olarak demiyelinize alanların arttığını göstermiştir. Tedavi gruplarında ise, artan ghrelin dozuna bağlı olarak miyelin kayıplarının belirli oranlarda onarıldığı tespit edilmiştir (**Şekil 14**). Yapılan istatistiksel analizlerde, DM ve RM grupları kendi kontrol grupları (sırasıyla DM KNT ve RM-KNT) ile kıyaslandığında miyelin içeriğinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur ( $p<0,01$ ). RM grubu ile kıyaslandığında, RM-G20 ( $p=0,002$ ) ve RM-G40 ( $p=0,001$ ) gruplarındaki miyelin içeriğinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Tedavi grupları kendi arasında kıyaslandığında artan ghrelin dozuna bağlı olarak miyelin içeriğinin yüksek olduğu bulunmuştur (**Şekil 15**;  $p=0,001$ )



**Şekil 11:** Korpus kallozumdaki miyelin boyama görüntüsü (Luxol fast blue boyama, Scale bar: 100 µm ve 50 µm).



**Şekil 12:** Korpus kallozum bölgelerinde gruplar arasındaki miyelin içeriği. DM: Demiyelinizasyon, DM-KNT: Demiyelinizasyon kontrol, RM: Remiyelinizasyon, RM-KNT: Remiyelinizasyon kontrol, RM-G20: Remiyelinizasyon ghrelin 20, RM-G40: Remiyelinizasyon ghrelin 40. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde ifade edilmiştir. a,b: Farklı harf alan gruplar birbirine göre anlamlıdır ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ghrelinin daha önceki çalışmalarda MS'te antiinflamatuvar, nöroprotektif ve hafıza koruyucu etkileri araştırılmıştır (Theil ve ark., 2014; Souza-Moreira ve ark, 2013). Ancak bu çalışmada ghrelinin ratlarda kuprizonla indüklenen MS modelinde antioksidan özellikleri ilk defa araştırıldı.

### 5.1. Davranış Deneylerinin Değerlendirilmesi

Kurulumu ve kullanımını basit olsa da Y-maze testi farelerde ve ratlarda kısa süreli hafızayı değerlendirmek için kullanılabilir (Krauter ve Guest, 2019). Örneğin kısa süreli hafızayı ölçen spontane değişim, kemirgene tüm Y-maze kollarını bağımsız bir şekilde keşfetmesine izin vererek değerlendirilebilir. Kemirgen doğuştan gelen merakı ile daha önce girmediği alanları keşfetmek için bu davranışı sürdürür (Lalonde, 2002). Kısa süreli belleği iyi olan bir hayvan daha önce keşfettiği kolu hatırlar ve daha az ziyaret ettiği kollara giriş yapar (Krauter ve Guest, 2019). Bu anlamda daha önce yapılan bir çalışmada, değişim davranışının CPZ ile demiyelinizasyon oluşturulan grupta kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur, aynı zamanda CPZ kullanılan grupta total kol girişi sayısı yüksek bulunmuştur (Rowhani-Rad ve Taherianfard, 2019). Başka bir çalışmada CPZ ile indüklenen MS modelinde CPZ uygulanan grupta kısa süreli hafıza performansının azaldığını kanıtlayan bulgular elde edilmiştir (Omotoso ve ark., 2018). Çalışmamızda ghrelinin hafıza koruyucu etkisini DM VE DM-KNT gruplarına deneyin 35. günü; diğer tüm gruplara deneyin 42. günü uyguladığımız Y-maze testiyle araştırdık. Bazı çalışmalarda ghrelinin hafıza koruyucu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Diano ve ark., 2006; Rowhani-Rad ve Taherianfard, 2019). Çalışmamızda, lokomotor aktivite ya da çalışma belleği açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi.

## 5.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Oksidatif stres MS patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir ve oksidatif strese yol açan faktör reaktif oksijen türlerinin ortamda gerektiğinden fazla bulunmasıdır. Oksidatif stres, antioksidan sistemi aktive eder, aynı zamanda antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). Fizyolojik koşullar altında tüm organizmalar tarafından bazal düzeyde ROS üretimi gerçekleşir. Mitokondride biyomoleküler oksijenin önemli bir kısmı tam olarak indirgenmez ve süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal (-OH) ve hidroksiperoksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri olarak ortaya çıkarlar (Gonsette, 2008). Normalde ROS üretimi nöronal hücre stabilitesi, sinaptik plastisitenin modülasyonu ve beyin fonksiyonları için gereklidir (apoptozis, sinaptik plastisite, immün sistem vb.) ama ROS' un gerekli ve zararlı süreçleri arasındaki sınırı hala çok hassastır (Padureanu ve ark., 2019). ROS' un gerekli miktardan fazla üretilmesi bu hassas dengenin zararlı süreçler lehine dönmesine neden olur. ROS fizyolojik ve patolojik koşullar altında, insan vücudunda sitozol, mitokondri, lizozom, peroksizom ve plazma membranlarında üretilir (Touyz, 2012). Bu ROS' lar doğal enzimatik antioksidanlar (SOD, CAT, GSH-PX vb.) tarafından dengelenir (Gonsette, 2008). Oksidatif stres MS patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (Ohl ve ark., 2016).

Serbest radikaller, lipitlerin oksidatif modifikasyonuna sebep olurlar ve lipit peroksidasyonu denilen bir süreci başlatırlar. Bu süreç, ROS' ların kendi kararlı iç dengelerini oluşturmak için çoklu doymamış yağ asitlerinden bir elektron kopararak onları oksidize etmesiyle oluşur (Pegoretti ve ark., 2020). Lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonudur ve bu zincir reaksiyonunda lipit hidroksiperoksitlerinin yağ asidi karbon zincirleri ayrılır. Bu da oldukça reaktif bir tür olan yüksek reaktif aldehitleri oluşturur. Bunlardan biri de MDA' dır (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). MDA total antioksidan kapasiteyi (TAC) düşürür (Khajehnasiri ve ark., 2013). Plazma total antioksidan kapasite, oksidatif stres indikatörü olarak bildirilmektedir (Sharifian ve ark., 2005). MS' te antioksidan kapasite düştüğünde ve mikrogilalar ile makrofajlar tarafından ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aştığında miyelin kılıflar zarar görebilir (Mørkholt ve ark., 2019). Daha önce yapılan bir çalışmaya göre serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun miyelin kaybına sebep olduğu bildirilmiştir (Mickel, 1975). Başka bir

Çalışmada miyelin kılıfların hasara uğramaya başladıkları bir zon tanımlanmıştır. Bu bölgenin; apoptozis benzeri çekirdek değişikliklerine sahip oligodentrositleri, normal peri-plak beyaz cevher arasına yayılmış aktifleşmiş mikrogliaları ve makrofajları içerdiği bildirilmiştir (Haider ve ark., 2011). Aynı zamanda bu bölgede peroksidasyona uğrayan lipidlerin ve DNA'ların olması, lipid peroksidasyonunun miyelin kılıfının hasarını başlatan en temel sorun olduğu düşünülmüştür (Haider ve ark., 2011). MDA, lipid peroksidasyon son ürünlerindedir aynı zamanda bir oksidatif stres parametresidir (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). Çalışmamızda DM grubunda MDA seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek çıkması, kuprizon uygulamasının lipid peroksidasyonuna yol açtığını ve antioksidan kapasiteyi azaltıp oksidatif strese yol açtığını düşündürmektedir. Bu sonuca dayanarak, çalışmamızda da lipid peroksidasyonunun, miyelin kaybına zemin hazırlayan patolojik süreçleri tetiklediği düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, sonuçlarımıza benzer şekilde kontrol grubuyla kıyaslandığında demiyelinizasyon grubunda MDA (lipid peroksidasyon parametresi) seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). Sonuçlarımıza benzer şekilde kuprizonla indüklenen bir başka deneysel MS çalışmasında; kuprizon kullanılan grupta kontrol grubuna kıyasla MDA düzeyinin arttığı bildirilmiştir (Khodaei ve ark., 2020).

SOD, oksijen katabolizmasında görev alan antioksidan enzimlerden biridir. (Siddique ve ark., 2013). Hücrede süperoksit radikalinin eliminasyonunda defans mekanizması olarak SOD' un işlevi ilk sırada gelir ve süperoksit anyonunu moleküler oksijen ile hidrojen peroksite dönüştürür (Schreibelt ve ark., 2007). SOD, MnSOD biçiminde oligodentrositlerin mitokondriyel matriksinde bulunan süperoksit radikalini  $H_2O_2$ ' ye dönüştürür (Praet ve ark., 2014). Çalışmamızda kuprizon uygulanan DM grubunda SOD düzeyi DM-KNT grubuna kıyasla yüksek çıkmıştır ancak bu artış anlamlı değildir. RM grubunda ise RM-KNT grubuna göre anlamlı düzeyde düşük çıkmıştır. Sonuçlarımızın aksine önceki bir çalışmaya göre, yaşları 19-56 arasında değişen MS tanılı 34 hasta ve kontrol grubu olarak 64 sağlıklı insan kullanılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla MS hastalarında eritrositlerdeki SOD aktivite düzeyi anlamlı bir şekilde düşük çıkmıştır (Zagórski ve ark., 1991). Nöropatolojik ve klinik olarak MS tanısı konmuş 18 hastanın otopsi doku materyalleri ve kontrol grubu oluşturmak amacıyla nörolojik bir hastalığı olmayan 4 kişinin subkortikal beyaz cevheri ile korpus kallozum

Bölgelerinden alınan doku örnekleri kullanılarak yapılan ve çalışmamızın sonuçlarına benzer sonuçları olan bir çalışmaya göre aktif demiyelinize MS bölgelerinde lipit, protein ve nükleotidlere zarar veren yoğun oksidatif stres varlığını takip eden aşamalarda endojen antioksidan enzimlerden olan SOD değerinin arttığı gözlemlenmiştir (Horsssen ve ark., 2008). MS hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan natalizumab etken maddesinin oksidatif hasar üzerine etkisi araştırılmıştır. Gönüllü RR-MS'li 24 hastadan alınan kan örnekleriyle yapılmış bu çalışmaya göre MS tedavisinde kullanılan natalizumab etken maddeli ilaçların SOD aktivitesi üzerine olumlu bir etkisi tespit edilememiştir (Tasset ve ark., 2013). EAE' nin MOG35–55 ile indüklendiği bir çalışmada melatonin etkileri araştırılmıştır. Melatoninin kontrol grubuyla kıyaslandığında tedavi grubunda SOD düzeyini anlamlı düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (Martinez ve Peplow, 2020). Kuprizonla indüklenen bir deneysel MS çalışmasında terapötik ajan olarak kullanılan resveratrolün de oksidatif stresin yol açtığı hasarları düzelterek SOD aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Ghaiad ve ark., 2017). MS çalışmalarında SOD düzeyinin artmasının hastalığın patofizyolojisinde olumlu sonuçlara yol açan bir faktör olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da 20 µg/ kg ghrelin verdiğimiz grupta (RM-G20) RM, RM-KNT ve DM-KNT gruplarına kıyasla SOD değerinde anlamlı düzeyde bir artış tespit edilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak MS' te terapötik ajan olarak kullandığımız ghrelinin SOD aktivitesini olumlu yönde etkileyerek antioksidan özellik gösterdiği düşünülmektedir.

GSH-PX, oksijen katabolizmasında görev alan antioksidan enzimlerden biridir. (Siddique ve ark., 2013). GSH-PX,  $H_2O_2$ ' yi,  $H_2O$  ve  $O_2$ ' ye dönüştürür (Praet ve ark., 2014). Çalışmamızda kuprizon verdiğimiz DM grubunda DM-KNT grubuna kıyasla GSH-PX düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. RM grubunda ise GSH-PX değerinin DM, RM-KNT ve RM-G20 grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir azalma saptanmıştır. Yaşları 21-50 arasında değişen RR-MS tanılı 36 birey ve kontrol grubu olarak benzer yaşlarda 15 sağlıklı bireyde yapılan bir çalışmaya göre MS hastalarından ve kontrol grubundan alınan kan örneklerine dayanarak kan trombositlerindeki GSH-PX aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı bildirilmiştir (Fijałkowski ve ark., 2018). Çalışmamızda da benzer şekilde, 20 µg/ kg ghrelin verdiğimiz grupta (RM-G20) DM, DM-KNT, RM, RM-G40 gruplarına kıyasla GSH-PX düzeyinde anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi. MS patofizyolojisinde oksidatif stres önem arz etmektedir. Bu nedenle MS hastaları için kullanılan ilaçların oksidatif stres

Üzerine etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır: Natalizumab etken maddeli ilaç ile tedavi edilen RR-MS tanılı hastaların kontrol grubuna kıyasla GSH-PX aktivite düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanamadı (Tasset ve ark., 2013). MS hastalarında yapılan ve MS' te ilaç etken maddesi olarak kullanılan mitoksantron tedavisinden sonra serum GSH-PX düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanamadı (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). Bu bilgilerden yola çıkararak MS' te etkilerini araştırdığımız ghrelinin GSH-PX aktivitesini olumlu yönde etkileyerek antioksidan özellik göstermesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

CAT, oksijen katabolizmasında görev alan antioksidan enzimlerden biridir. (Siddique ve ark., 2013). Oligodentrosit sitozolündeki peroksizomda biriken  $H_2O_2$ ' yi,  $H_2O$  ve  $O_2$ ' ye dönüştürür ve böylece zararlı serbest radikaller zararsız hale getirilir (Praet ve ark., 2014). Çalışmamızda kuprizon verdiğimiz DM grubunda DM-KNT grubuna kıyasla CAT düzeyi yüksek çıkmıştır ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. RM grubundaki CAT düzeyi DM ve DM-KNT grubuna kıyasla daha düşük çıkmıştır ancak bu düşük düzey istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. MOG35-55 ile indüklenen bir EAE çalışmasında 8- 10 haftalık dişi C57BL/6 farelerde intraperitoneal melatonin uygulamasının antioksidan bir enzim olan CAT düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Martinez ve Peplow, 2020). Kuprizonla indüklenen deneysel MS modeli oluşturulmuş bir başka çalışmaya göre, ellagic asidin antioksidan etkileri beyin dokusunda CAT düzeyi bakımından araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre ellagic asit kullanılan grupta diğer gruplara kıyasla CAT değeri bakımından anlamlı düzeyde bir artış saptanmıştır (Khodaei ve ark., 2020). Çalışmamızda da 20  $\mu g/ kg$  ghrelin verdiğimiz grupta (RM-G20) diğer tüm gruplara kıyasla CAT değerinde anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi. Bu bilgilerden yola çıkararak MS' te etkilerini araştırdığımız ghrelinin CAT aktivitesini olumlu yönde etkileyerek antioksidan özellik gösterdiği düşünölmektedir.

İki antioksidatif enzim olan CAT ve GSH-PX,  $H_2O_2$ 'nin etkili eliminasyonu için hücre defansında ilk sırada yer alırlar (Adamczyk-Sowa ve ark., 2012). Çalışmamızda demiyelinizasyon oluşturduğumuz gruplara tedavi olarak uygulanan düşük ghrelin dozunun (20 $\mu g/ kg$ ) kontrol gruplarına göre SOD, GSH-PX, CAT değerindeki artış göz önünde bulundurulduğunda ghrelinin antioksidan etki gösterdiği söylenebilir.

Çalışmamızın sonuçlarına benzer sonuçları olan ve kuprizonla indüklenen kronik bir deneysel MS modelinde, resveratrolün kuprizon intoksikasyonunu takiben gelişen demiyelinizasyonu azalttığı ve remiyelinizasyonu geliştirdiği bildirilmiştir (Ghaiad ve ark., 2017). Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde sonuçları olan kuprizonla indüklenen diğer bir kronik deneysel MS çalışmasında etken madde olarak koenzim-Q10 kullanılmıştır. Antioksidan özellikleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiş olan (Crane, 2001; Varela-López ve ark., 2016) koenzim-Q10'in kuprizon uygulamasından sonra korpus kallozumda meydana gelen demiyelinizasyona karşı remiyelinizasyon oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada koenzim-Q10'in CPZ uygulamasından sonra korpus kallozumda meydana gelen demiyelinizasyonu azaltarak remiyelinizasyon sağladığı bildirilmiştir (Khalilian ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da ghrelinin korpus kallozumda CPZ uygulamasını takiben gelişen demiyelinizasyona karşı remiyelinizasyon geliştirdiği böylelikle nöroprotektif etki gösterdiği ve ghrelinin antioksidan enzimler olan SOD, GSH-PX, CAT düzeylerini anlamlı ölçüde arttırarak antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir.

### **5.3. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi**

#### **5.3.1. H&E boyama değerlendirilmesi**

H&E boyama; fikse edilmiş, işlenmiş, gömülmüş ve kesitlere ayrılmış olan dokuların mikroskopik değerlendirilmesinde kullanılan bir standart boyama yöntemidir (Cardiff ve ark., 2014). H&E ile boyanmış olan doku kesitleri, anatomik patolojiyi teşhis etmenin köşe taşı olarak kabul edilmektedir (Feldman ve Wolfe, 2014). MS karakterizasyonunda kullanılan immün hücre infiltrasyonu, özellikle korpus kallozumdaki demiyelinizan bölgeler bu boyama yöntemiyle saptanmaktadır (Brück, 2007). Ayrıca beyin dokusundaki genel histolojik organizasyon, vaskülarize alanlar ve inflamatuvar alanların tespiti bu yöntem kullanılarak belirlenmektedir.

MS' in temel patolojik göstergesi, MSS' de "plak" ya da "lezyon" olarak adlandırılan, çoklu fokal alanlardaki miyelin kaybıdır (Popescu ve Pirko, 2013). Bu miyelin kaybına neden olan faktörün MSS'de miyelin üretmekten sorumlu

Oligodentrogial hücrelere karşı gelişen bir otoimmüniteyi tetikleyen inflamatuvar reaksiyonlar olduğu bilinmektedir (Mronga, Stahnke ve Goldbaum, 2004). Sonuçlarımıza benzer biçimde daha önce yapılan bir çalışmada MS' in akut klinik semptomlarının genel kabul gören histopatolojik korelasyonu, aksonal disfonksiyon ya da total aksonal kayba yol açan fokal inflamatuvar demiyelinizan beyaz cevher lezyonu olduğu söylenmiştir (Kipp ve ark., 2016). Bu demiyelinizan bölgeleri, inflamasyonu ve lenfatik infiltrasyonu en iyi gösteren yöntem H&E boyama yöntemidir. Çalışmamızda H&E yöntemi kullanılarak ghrelinin korpus kallozum bölgesindeki demiyelinizasyonu azalttığı bulunmuştur.

MSS' deki miyelinli aksonları hasara uğratan MS için patofizyolojik altyapıyı tanımlamak ve hastalık için tedavi stratejileri geliştirmek amacıyla miyelin oligodentrosit glikoprotein MOG(35–55) kullanılarak indüklenen EAE'de ghrelin kullanan bir çalışmaya göre ghrelinin, MSS' deki otoimmün ve inflamatuvar cevaplara yol açan inflamatuvar infiltratların görünümünü azaltarak hastalığın tedavisinde özellikle kronik ve RR-MS' te oldukça etkili bir terapötik ajan olabileceği bildirilmiştir (Souza-Moreira ve ark., 2013). Bu çalışmada, demiyelinizasyonu indüklemek için kuprizon kullanıldı. Ghrelin uygulanan gruplarda (RM-G20 ve RM-G40), RM ve RM-KNT grubuna kıyasla inflamatuvar infiltratlarda anlamlı bir azalma gözlenmedi. Bir diğer çalışmada ghrelin uygulamasının, inflamatuvar faktörleri ve mikrogial aktiviteyi inhibe ederek EAE'li ratların merkezi sinir sisteminde inflamasyonu ve demiyelinizasyonu önemli derecede azalttığı aynı zamanda fonksiyonel davranışı geliştirdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2019). Çalışmamızda RM-G40 grubuna uyguladığımız ghrelinin korpus kallozum bölgesindeki demiyelinizasyonu önemli derecede azalttığı bulundu. Başka bir çalışmada eksojen ghrelin uygulamasının bir multipl skleroz deneysel hayvan modeli olan ve MOG (35-55) ile indüklenen EAE'yi mikrogialardaki proinflamatuvar sitokinleri azaltarak baskıladığı bildirilmiştir (Theil ve ark., 2009). Çalışmamızda saptanan bulgular ışığında kuprizon uygulanmasının beyin dokusunda oluşturduğu inflamasyonun, artmış vaskülarizasyonun ve lenfatik infiltrasyonun DM ve RM gruplarında diğer gruplara kıyasla belirgin olmasıyla birlikte uyguladığımız 20 µg/ kg ve 40 µg/ kg ghrelinin bu inflamasyonu anlamlı düzeyde azalttığı söylenemez. Ancak DM ve RM gruplarında korpus kallozum bölgesinde belirgin olan demiyelinize alanların uygulanan ghrelin dozlarıyla anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada demiyelinizasyon bakımından ghrelinin

doza bağılı bir etki gösterdiği söylenebilir. Ghrelinin korpus kallozum bölgesindeki miyelinizasyonu sağlamasından yola çıkarak, ratlarda kuprizonla indüklenen deneysel MS modelinde nöroprotektif etki gösterdiği düşünülebilir.

### 5.3.2. LFB boyama değerlendirilmesi

LFB boyama özellikle merkezi sinir sisteminin analiz edilmesi için oldukça kullanışlı bir boyama yöntemidir (Carriel ve ark., 2017). Özellikle, dokulardaki miyelinizasyon düzeylerinin incelenmesi bakımından elverişli bir yöntemdir (Van Der Valk ve De Groot, 2000). Daha önce yapılan bir çalışmada, MOG (35-55) kullanılarak indüklenen EAE’ de medulla spinalis kesitlerindeki miyelin içerikleri LFB boyama ile gösterilmiş ancak ghrelin kullanılan grup ile kontrol grubu arasında medulla spinalisteki miyelin içeriği bakımından anlamlı bir fark bildirilmemiştir (Theil ve ark., 2009). Yine MOG (35-55) kullanılarak indüklenen EAE’ de spinal kordda, serebellumda ve optik sinirdeki demiyelinize alanlar LFB boyama yöntemiyle tespit edilmiştir ve zeytin yağından elde edilen oleacein etken madde verildikten sonraki ölçümlerde aynı bölgelerdeki remiyelinizasyon varlığı LFB boyama yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Gutiérrez-Miranda ve ark., 2020). Liu ve ark. (2019), komplet freund adjuvanıyla indükledikleri EAE’nin neden olduğu spinal korddaki demiyelinizasyonu göstermek için LFB boyama yöntemini kullanmışlar ve ghrelinin EAE’li ratların spinal kordlarındaki dokularda demiyelinizasyonu azalttığını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada kuprizonla indüklenen deneysel MS modelinde korpus kallozum bölgesindeki demiyelinizasyonu LFB yöntemiyle gösterilmiş ve resveratrol uygulaması sonrasında remiyelinizasyon da LFB yöntemiyle gösterilmiştir (Ghaiad ve ark., 2017). Kuprizonla indüklenen bir başka deneysel MS modelinde, spinal kordda kuprizonun neden olduğu demiyelinizasyon odakları LFB boyama kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ellagic asit kullanımı sonrası spinal kordda anlamlı düzeyde remiyelinizasyon LFB yöntemi kullanılarak saptanmıştır (Khodaei ve ark., 2020). 30 MS’li hastadan alınan parafine gömülü arşivsel otopsi materyalleri kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada, aktif beyaz cevher lezyonundaki miyelin kaybı LFB boyama yöntemiyle belirlenmiştir (Haider ve ark., 2011). Çalışmamızda kuprizon ile indüklenen demiyelinizasyon odakları net bir şekilde belirlenmiştir. Bu demiyelinize alanların remiyelinizasyonu için kullanılan

ghrelinin, doza bağımlı olarak beyin dokusundaki miyelin içeriğini arttırdığı saptanmıştır. Total olarak ele alındığında verilerimiz, ghrelinin nöroprotektif etki gösterdiğini düşündürmektedir.

#### **5.4. Sonuç**

Sonuç olarak MS patofizyolojisinde önemli bir rol oynayan oksidatif stresin, ratlarda kuprizonla indüklenen MS modelinde de olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında kuprizon uygulamasının demiyelinizasyona, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese yol açtığı görüldü. Ghrelin, korpus kallozum bölgesinde oluşan demiyelinizasyona karşı yüksek dozda (40 µg/kg), daha etkin bir demiyelinizasyona yol açarken, düşük dozda ghrelinin (20 µg/kg) antioksidan özellikleri daha etkin olarak gözlemlendi. Sonuç olarak ghrelinin MS tedavisinde kullanılmaya aday bir etken madde olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu bulgularımızı destekleyecek nitelikte daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKÇA

- Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pierzchala K, Polaniak R, Labuz-Roszak B. Antioxidative Enzymes Activity and Malondialdehyde Concentration during Mitoxantrone Therapy in Multiple Sclerosis Patients. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(6):683–90.
- Amedoro A, Anna B, Antonella C, Elisa P, Donatella V, Giuseppe M. The Effect of Aquatic Physical Therapy on Patients with Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2020;41:1020-22. doi: 10.1016/j.msard.2020.102022.
- Amor B, Sandra B, David B. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Biology of Multiple Sclerosis. 2009;102:35–61. doi: 10.1017/CBO9780511979088.004.
- Amor B, Sandra B, David B. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 2019;10: 35–61.
- Attrey DP, Singh AK, Naved T, Roy B. Effect of seabuckthorn extract on scopolamine induced cognitive impairment. *Indian J Exp Biol.* 2012;50:690–95.
- Belbasis L, Vanesa B, Evangelos E, Ioanna T. Environmental Factors and Risk of Multiple Sclerosis: Findings from Meta-Analyses and Mendelian Randomization Studies. *Mult Scler Jo.* 2020;26(4):397–404. doi: 10.1177/1352458519872664.
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 1976;72: 248-54.
- Brownell B, Hughes JT. The Distribution of Plaques in the Cerebrum in Multiple Sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1962;25:315–20. doi: 10.1136/jnnp.25.4.315.
- Brück W. New Insights into the Pathology of Multiple Sclerosis: Towards a Unified Concept? *J Neurol.* 2007;254(1 SUPPL.):3–9. doi: 10.1007/s00415-007-1002-0.
- Cardiff RD, Claramae H, Miller RJ, Munn RD, Cardiff CH. Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;6:655-58 doi: 10.1101/pdb.prot073411.
- Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Communicat.* 2002;299(5):739-43.
- Carriel V, Campos A, Alaminos M, Raimondo S, Geuna S. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2017; 1560:207-18. doi: 10.1007/978-1-4939-6788-9\_15.

- Carriel V, Antonio C, Miguel A, Stefania R, Stefano G. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2017;1560:207–18. doi: 10.1007/978-1-4939-6788-9\_15.
- Constantinescu CS, Nasr F, Kate O, Bruno G. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as a Model for Multiple Sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1079–1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
- Diano A, Sabrina A, Susan A, Farr C, Stephen C, Benoit C. Ghrelin Controls Hippocampal Spine Synapse Density and Memory Performance. *Nat Neurosci.* 2006;9(3):381–88. doi: 10.1038/nn1656.
- Dobson R, Giovannoni G, Multiple Sclerosis – a Review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27–40. doi: 10.1111/ene.13819.
- Feldman T, Ada T, Delia W. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. *Meth Mol Biol.* 2014;1180:31–43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2.
- Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A. Ghrelin in Central Neurons. *Cur Neuropharmacol.* 7(1):37–49. doi: 10.2174/157015909787602779.
- Fijałkowski P, Jedrzejczak-Pospiech K, Jan B. Do Catalase and Glutathione Peroxidase Protect Blood Platelets from Lipid Peroxidation in Multiple Sclerosis? *Postepy Psychiatr.* 2018;27(1):49–53. doi: 10.5114/ppn.2018.74323.
- Getz M, Yeshayahu H, Adri V. Effects of Aquatic Interventions in Children with Neuromotor Impairments: A Systematic Review of the Literature. *Clin Rehabil.* 2006;20(11):927–36. doi: 10.1177/0269215506070693.
- Ghaiad HR, Mohammed MN, El-Sawalhi MM, Amira AS. Resveratrol Promotes Remyelination in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Biochemical and Histological Study. *Mol Neurobiol.* 2017;54(5):3219–29. doi: 10.1007/s12035-016-9891-5.
- Gonsette RE, Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: The Role of Oxidative Stress and Excitotoxicity. *J Neurol Sci.* 2008;274(1–2):48–53. doi: 10.1016/j.jns.2008.06.029.
- Haider L, Marie-therese F, Frischer JM, Jan B. Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain.* 2011;134(7):1914–24. doi: 10.1093/brain/awr128.
- Horsssen J, Schreibelt VG, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, Van Der Valk P. Free Radical Biology & Medicine Severe Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Lesions Coincides with Enhanced Antioxidant Enzyme Expression. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(12):1729–37. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.023.
- Jana A, Kalipada P. Oxidative Stress Kills Human Primary Oligodendrocytes Via Neutral Sphingomyelinase : Implications for Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.*

2007;2(2):184–93. doi: 10.1007/s11481-007-9066-2.

- Kalb R, Theodore RB, Susan C, Kathleen C, Ulrik D, Eric G. Exercise and Lifestyle Physical Activity Recommendations for People with Multiple Sclerosis throughout the Disease Course. *Mult Scler J*. 2020;26(12):1459–69. doi: 10.1177/1352458520915629.
- Khalilian B, Soheila M, Nima F, Beheshteh A. Coenzyme Q10 Enhances Remyelination and Regulate Inflammation Effects of Cuprizone in Corpus Callosum of Chronic Model of Multiple Sclerosis. *J Mol Histol*. 2020;10(0123456789). doi: 10.1007/s10735-020-09929-x.
- Karussis D. The Diagnosis of Multiple Sclerosis and the Various Related Demyelinating Syndromes: A Critical Review. *J Autoimmun*. 2014;48–49:134–42. doi: 10.1016/J.JAUT.2014.01.022.
- Khajehnasiri F, Seyed BM, Abdolamir A, Shahin A, Hassan H. Total Antioxidant Capacity and Malondialdehyde in Depressive Rotational Shift Workers: A Research Article. *J Environ Public Health*. 2013; doi: 10.1155/2013/150693.
- Khodaei F, Mohammad JK, Sepideh H, Reza H, Mohammad HKB, Negar A. The Effect of Ellagic Acid on Spinal Cord and Sciatica Function in a Mice Model of Multiple Sclerosis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(11):1–10. doi: 10.1002/jbt.22564.
- Kipp M, Stella N, Tanja H, Sandra A. Multiple Sclerosis Animal Models : A Clinical and Histopathological Perspective. 2017;27(2):123–37. doi: 10.1111/bpa.12454.
- Koch-Henriksen N, Per Soelberg S. The Changing Demographic Pattern of Multiple Sclerosis Epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520–32. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
- Kojima M, Hiroshi H, Yukari D, Masamitsu N, Hisayuki M, Kenji K. Ghrelin Is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach. *Nature* 1999;402(6762):656–60. doi: 10.1038/45230.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *InPre-clinical models*. 2019;1916:105–11.
- Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspec Med*. 2018;8(3):1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a028936.
- Lassmann H. Pathology and Disease Mechanisms in Different Stages of Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013;333(1–2):1–4. doi: 10.1016/J.JNS.2013.05.010.
- Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F. Sequential Myelin Protein Expression during Remyelination Reveals Fast and Efficient Repair after Central Nervous System Demyelination. *Neuropath Appl Neuro*. 2008;34(1):105–14. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00879.x.
- Liu F, Zijian L, Xin H, Haiyang Y, Juan F. Ghrelin Attenuates Neuroinflammation and

- Demyelination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Involving NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway and Pyroptosis. *Front Pharmacol.* 2019;10:1–12. doi: 10.3389/fphar.2019.01320.
- Mark MB, Sintzel RA, Reder T. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol. Ther.* 2018;7(1):59-85. doi: 10.1007/s40120-017-0086-4.
- Martinez B, Philip VP. Protective Effects of Pharmacological Therapies in Animal Models of Multiple Sclerosis: A Review of Studies 2014-2019. *Neural Regen Res.* 2020;15(7):1220–34. doi: 10.4103/1673-5374.272572.
- Matsushima GK, Pierre M. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Path.* 2001;11(1):107–16. doi: 10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x.
- Medaer R. Does the History of Multiple Sclerosis Go Back as Far as the 14th Century? *Acta Neuro Scand.* 1979;60(3):189–92. doi: 10.1111/j.1600-0404.1979.tb02968.x.
- Mehndiratta MM, Prachi M, Natasha SG, Mohammad W. Global Perspectives. *Neurology* 2014;83(9):842–44. doi: 10.1212/WNL.0000000000000728.
- Mickel HS. Multiple Sclerosis: A New Hypothesis. *Perspect Biol Med.* 1975;18(3):363–74. doi: 10.1353/pbm.1975.0045.
- Miyake S, Takashi Y. Ghrelin: Friend or Foe for Neuroinflammation. *Disc Med.* 2009;8(41):64–67.
- Mojaverrostami S, Parichehr P, Soheila M, Saeid N, Davood Z, Leila N. Calorie Restriction Promotes Remyelination in a Cuprizone-Induced Demyelination Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Metab Brain Dis.* 2020;35(7):1211–24. doi: 10.1007/s11011-020-00597-0.
- Mørkholt AS, Michael ST, Michal KEO, Luise B, Lona JK, Colin EJP. CPT1A Plays a Key Role in the Development and Treatment of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-019-49868-6.
- Mronga T, Thomas S, Olaf G. Mitochondrial Pathway Is Involved in Cell Death of Oligodendrocytes. 2004;46(4):446–55. doi: 10.1002/glia.20022.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. *Mol Metab.* 2015;4(6):437–60. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005.
- Nakazato M, Noboru M, Yukari D, Masayasu K, Hisayuki M, Kenji K, et al. A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding. *Nature* 2001;409(6817):194–98. doi: 10.1038/35051587.
- Obal F, Jeremiah A, Ping T, Janos G, James MK. Sleep in Mice with Nonfunctional Growth Hormone-Releasing Hormone Receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

- Physiol. 2003;284(1 53-1):131–39. doi: 10.1152/ajpregu.00361.2002.
- Oh J, Angela VJ, Xavier M. Multiple Sclerosis: Clinical Aspects. *Cur Opin Neurol*. 2018;31(6):752–59. doi: 10.1097/WCO.0000000000000622.
- Ohl K, Klaus T, Markus K. Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Central and Peripheral Mode of Action. *Exp Neurol*. 2016;277:58–67. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.11.010.
- Omotoso G, Olaiya, IJU, Leviticus A, Fatima S, Ismail TG. Kolaviron Protects the Brain in Cuprizone-Induced Model of Experimental Multiple Sclerosis via Enhancement of Intrinsic Antioxidant Mechanisms: Possible Therapeutic Applications? *Pathophysiology* 2018;25(4):299–306. doi: 10.1016/j.pathophys.2018.04.004.
- Qiu X, Qingqing G, Xue L, Hui L, Danping F, Yongqi D, et al. Pien Tze Huang Alleviates Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice by Regulating Th1 and Th17 Cells. *Front Pharmacol*. 2018;1237:1–10. doi: 10.3389/fphar.2018.01237.
- Padureanu R, Carmen VA, Radu RM, Manuela VB, Anca OD, Daniela C. Oxidative Stress and Inflammation Interdependence in Multiple Sclerosis. *J Clin Med*. 2019;8(11):1–11. doi: 10.3390/jcm8111815.
- Polman CH. Drug treatment of multiple sclerosis. *Bmj*. 2000;321(7259):490-4.
- Popescu BFG, Istvan P. Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand? *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2013;19(4):901–21.
- Praet J, Caroline G, Zwi B, Annemie VL, Peter P. Cellular and Molecular Neuropathology of the Cuprizone Mouse Model: Clinical Relevance for Multiple Sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:485–505. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004.
- Radi E, Patrizia F, Carla B, Antonio F. Apoptosis and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimer's Dis*. 2014;42(3):125-52. doi: 10.3233/JAD-132738.
- Ransohoff RM, David AH, Claudia FL. Multiple Sclerosis- A Quiet Revolution. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(3):134–42. doi: 10.1038/nrneurol.2015.14.
- Rowhani RS, Mahnaz T. Crosstalk between BDNF and TNF $\alpha$  in Brain versus Serum of the Cuprizone-Induced Multiple Sclerosis in C57BL/6 Mice. *Physiol Pharmacol (Iran)* 2019;23(3):174–82.
- Sharifian A, Saeed F, Parvin P, Marjan G, Omid A. Shift Work as an Oxidative Stressor: Short Paper. *J Circadian Rhythms*. 2005;3:1–3. doi: 10.1186/1740-3391-3-15.
- Siddique T, Deng HX, Ajroud-Driss S. Motor Neuron Disease. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* 2013;1–22. doi: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00141-5.

- Silvestroff L, Bartucci S, Pasquini J, Franco P. Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination. *Exp Neurol*. 2012;235(1),357-67.
- Souza-Moreira L, Delgado-Maroto V, Maria M, O'Valle F, Raimundo GDM, Gonzalez-Rey E. Therapeutic Effect of Ghrelin in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Antigen-Specific Th1/Th17 Responses and Inducing Regulatory T Cells. *Brain Behav Immun*. 2013;30:54–60. doi: 10.1016/j.bbi.2013.01.080.
- Steiger A. Ghrelin and Sleep-Wake Regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(1):573-74. doi: 10.1152/ajpregu.00618.2006.Editorial.
- Szentirmai E, Hajdu I, Obal F, James MK. Ghrelin-Induced Sleep Responses in Ad Libitum Fed and Food-Restricted Rats. *Brain Res*. 2006;1088(1):131–40. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2006.02.072.
- Tasset I, Carmen B, Eduardo A, Cristina C, Antonio HC, Aleyda P, et al. Effect of Natalizumab on Oxidative Damage Biomarkers in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Pharmacol Rep*. 2013;65(3):624–31. doi: 10.1016/S1734-1140(13)710399.
- Theil MM, Sachiko M, Miho M, Chiharu T, Croxford JL, Hiroshi H, et al. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol*. 2009;183(4):2859–66. doi: 10.4049/jimmunol.0803362.
- Thomas FP. Multiple Sclerosis. *Path Princ Geriatr Med*. 2012;1(3):823–33. doi: 10.1002/9781119952930.ch70.
- Tiffany JB. Sleep Disorders in Patients with Multiple Sclerosis. *Pract Neurol*. 2018;8(1):47-56.
- Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *Primer on the Autonomic Nervous System* 2012;42(4):335–38. doi: 10.1016/B978-0-12-386525-0.00069-X.
- Torkildsen Ø, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The Cuprizone Model for Demyelination. *Acta Neuro Scand*. 2008;117(SUPPL. 188):72–76. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x.
- Van Der VP, De Groot CJA. Staging of Multiple Sclerosis (MS) Lesions: Pathology of the Time Frame of MS. *Neuropath Appl Neuro*. 2000;26(1):2–10. doi: 10.1046/j.1365-2990.2000.00217.x.
- Varela-López A, Francesca G, Maurizio B, Quilles JL. Coenzyme Q and Its Role in the Dietary Therapy against Aging. *Molecules* 2016;21(3):373. doi: 10.3390/molecules21030373.
- Vega-Riquer JM, Mendez-Victoriano G, Morales-Luckie RA, Gonzalez-Perez O. Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(2):129–41. doi:

10.2174/1570159x15666170717120343.

Venturini G. Enzymic Activities and Sodium, Potassium and Copper Concentrations in Mouse Brain and Liver After Cuprizone Treatment in Vivo. *J Neurochem.* 2014;21(5):1147–51. doi: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb07569.x.

Zagórski T, Dudek I, Berkan L. Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol.*1991;25(6):725-730. PMID: 1811177.

