



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**CUPRİZONLA İNDÜKLENMİŞ SIÇAN MULTİPL SKLEROZ MODELİNDE ÇİNKO
EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN CORPUS CALLOSUM DOKUSUNDAKİ
MOLEKÜLER FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Süeda Ecem YILMAZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Haluk GÜMÜŞ

Konya-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**CUPRİZONLA İNDÜKLENMİŞ SIÇAN MULTİPL SKLEROZ MODELİNDE ÇİNKO
EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN CORPUS CALLOSUM DOKUSUNDAKİ
MOLEKÜLER FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Süeda Ecem YILMAZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Haluk GÜMÜŞ

Konya-2023

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

“Cuprizonla indüklenmiş sıçan multipl skleroz modelinde çinko eksikliği ve desteğinin corpus callosum dokusundaki moleküler fonksiyonlar üzerine etkileri” başlıklı tez çalışmamın her aşamasında destek olan hekimliğini ve akademik başarılarını örnek aldığım, eğitimim konusunda her zaman desteğini hissettiğim çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Haluk GÜMÜŞ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi birikimi, hekimlik tecrübesi ve akademik kariyerleri ile örnek aldığım her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Şerefur ÖZTÜRK, Prof. Dr. Recep AYGÜL, Doç. Dr. Ahmet Hakan Ekmekçi, Doç. Dr. Gökhan ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Fettah Eren hocalarıma, beraber çalışmakta olduğum asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin planlanmasında, deney hayvanları uygulama kısmında ve sürecin yönetiminde büyük destekleri olan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim dalı öğretim üyesi saygıdeğer Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI hocama teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca başarılarımı destekleyen, maddi ve manevi her zaman yanımda olan, sevincimle mutlu olup üzüntümle hüzünlenen canım annem ve babama ayrıca eğitim hayatım boyunca stresli ve yorgun dönemlerimin kurtarıcısı canım kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
1.1.Multipl Skleroz	1
1.1.1.Tarihçe.....	1
1.1.2.Epidemiyoloji	2
1.1.3.Etyoloji Ve Genetik.....	3
1.1.4.İmmunpatogeneZ	6
1.1.5.Klinik Bulgular.....	9
1.1.6.Multipl Skleroz Klinik Tipleri.....	14
1.1.7.Laboratuvar Bulguları	16
1.1.8.Tanı Ve Ayırıcı Tanı	19
1.1.9.Tedavi.....	22
1.1.10.Multipl Sklerozda Özürlülük Değerlendirmesi	27
1.2.Çinko Metabolizması	29
1.2.1.Çinkonun MS’de Olası Yeri.....	33
1.2.2.ZnT3 Protein	35
1.2.3.ZnT4 Protein	37
1.2.4.Çinko Parmak Proteinleri	37
1.3. MS Hastalarında Remiyelinizasyon Süreci	39
1.3.1.NOGO-A Ve NOGO Reseptör (Ngr).....	40
1.4. MS Hastaları Ve miRNA Ekspresyonları	42
1.4.1.miRNA 300	42
1.4.2.miRNA 450b-5p	43
1.5.Sestrin	44
1.6.Klotho Protein	44
2.GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1.Deney Hayvanları	46
2.2.Cuprizon İle MS Modelinin Oluşturulması	46
2.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	47
2.4.Rotarod Performans Testi Uygulaması	48
2.5. Sıçanların Sakrifikasyonu Ve Dokuların Alınması.....	48
2.6.Corpus Callosum Dokusundan RNA İzolasyonu	48

2.7.cDNA'ların Elde Edilmesi	50
2.8.Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi	50
2.9.İstatiksel Analiz	52
3.BULGULAR.....	53
3.1.Hayvanlarında Deneysel MS Modelinin Gerçekleştiğini Belirlemek İçin Ölçümü Yapılan Parametreler.....	53
3.1.1.Rotarod Testi	53
3.1.2.Miyelin Basic Protein Gen Ekspresyon Bulguları	55
3.2.Corpus Callosum Dokusundaki Nogo-A Ve NgR Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları.....	56
3.3.Corpus Callosum Dokusundaki NZF2b Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları ..	58
3.4.Corpus Callosum Dokusundaki ZnT3 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları ..	59
3.5.Corpus Callosum Dokusundaki ZnT4 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları ..	60
3.6.Corpus Callosum Dokusundaki Sestrin-2 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları	61
3.7.Corpus Callosum Dokusundaki Klotho Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları	62
3.8.Corpus Callosum Dokusundaki miRNA-300-5p'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları.....	63
3.9.Corpus Callosum Dokusundaki miRNA-450b-5p'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları.....	64
4.TARTIŞMA	65
4.1.Rotarod Test Bulgularının Tartışılması	65
4.2.Corpus Callosum Dokusundaki MBP Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tartışılması.....	66
4.3.Corpus Callosum Dokusundaki Nogo A Ve Nogo R Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması	67
4.4.Corpus Callosum Dokusundaki ZnT3 Ve ZnT4 Bulgularının Tartışılması..	69
4.5.Corpus Callosum Dokusundaki Klotho Bulgularının Tartışılması	72
4.6.Corpus Callosum Dokusundaki NZF2b Bulgularının Tartışılması	73
4.7.Corpus Callosum Dokusundaki Sestrin-2 Bulgularının Tartışılması.....	75
4.8.Corpus callosum dokusundaki miRNA-300-5p ve miRNA-450b-5p'nin bulgularının tartışılması	76
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	79
ÖZET.....	88
SUMMARY	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Çinkonun multipl skleroz (MS) patogenezi ile olası ilişkisi.....	33
Şekil 3.1.1. Rotarod performans testi bulguları	54
Şekil 3.1.2. Miyelin temel protein gen ekspresyon düzeyi	55
Şekil 3.2.1. Nogo-A'nın corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi.....	57
Şekil 3.2.2. NgR' nün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	57
Şekil 3.3. NZF2b'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	58
Şekil 3.4. ZnT3'ün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	59
Şekil 3.5. ZnT4'ün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	60
Şekil 3.6. SESN2'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	61
Şekil 3.7. Klotho'nun corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi.....	62
Şekil 3.8. miRNA-300-5p'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	63
Şekil 3.9. miRNA-450b-5p'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi	64

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. MS tanısı için yapılan araştırmalar	18
Tablo 1.2. 2017 Revize McDonald kriterler	20
Tablo 1.3. MS ayırıcı tanı	22
Tablo 2.1. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan karışım	50
Tablo 3.1.1. Rotarod performans testi bulguları	54
Tablo 3.1.2. Miyelin temel protein gen ekspresyon bulguları	55
Tablo 3.2.1. Corpus callosum dokusundaki Nogo-A gen ekspresyon düzeyi	56
Tablo 3.2.2. Corpus callosum dokusundaki NgR gen ekspresyon düzeyi	56
Tablo 3.3. Corpus callosum dokusundaki NZF2b gen ekspresyon düzeyi	58
Tablo 3.4. Corpus callosum dokusundaki ZnT3 gen ekspresyon düzeyi.....	59
Tablo 3.5. Corpus callosum dokusundaki ZnT4 gen ekspresyon düzeyi.....	60
Tablo 3.6. Corpus callosum dokusundaki SESN2 gen ekspresyon düzeyi.....	61
Tablo 3.7. Corpus callosum dokusundaki Klotho gen ekspresyon düzeyi	62
Tablo 3.8. Corpus callosum dokusundaki miRNA-300-5p'nin gen ekspresyon düzeyi	63
Tablo 3.9. Corpus callosum dokusundaki miRNA-450b-5p'nin gen ekspresyon düzeyi.....	64

KISALTMALAR

Multipl skleroz (MS)

Merkezi sinir sistemi (MSS)

Ultraviyole B ışığı (UVB)

Epstein-Barr virüsü (EBV)

Uluslararası Multipl Skleroz Federasyonu (MSIF)

Mitokondri disfonksiyonu (MtD)

Oksidatif stres (OS)

D vitamini (VD)

Tiroid hormonu (TH)

Cuprizon (CPZ)

Oligodendrosit progenitör hücre (OPC)

Miyelin basic proteini (MBP),

Miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG)

Proteolipid proteini (Plp)

2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPase)

Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği (EDSS)

VD reseptörü (VDR)

Deneyisel otoimmün ensefalomyelit (EAE)

Çoklu genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS)

İnsan lökosit antijeni (HLA)

Ana doku uyumluluk kompleksi (MHC)

T helper (Th)

Antijen sunan hücreler (APC'ler)

İnterlökin (IL)

İnterferon gama (IFNy)

Tümör nekroz faktörü (TNF)

Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)

Fas ligandı (FasL)

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG)

Retina sinir lifi tabakası (RSLT)

Optik koherans tomografi (OCT)

Görsel uyarılmış potansiyel (VEP)

Klinik izole sendrom (KİS)

Radyolojik izole sendrom (RİS)

Ataklarla seyreden MS (RRMS)

İntravenöz (iv)

Zamanda yayılma kanıtı (DIT)

Uzayda yayılma kanıtı (DIS)

Gadolinium (GD)

Makrosiklik gadolinyum bazlı kontrast maddeleri (GBCA)

Beyin omurilik sıvısı (BOS)

Kan beyin bariyeri (KBB)

BOS/serum albümin konsantrasyon gradyanı (Qalb)

İmmünglobülin G (IgG)

Oligoklonal bant (OKB)

Somatosensoriyel uyarılmış potansiyel (SEP)

İdiyopatik İnflamatuar Demiyelinizan Bozukluklar (IIDD)

Akut Dissemine Ensefalomyelit (ADEM)

Sistemik lupus eritematozus (SLE)

İnsan T-Lenfotropik Virüs-1 (HTLV-1)

Leber'in Kalıtsal Optik Nöropatisi (LHON)

İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)

Progresif Multifokal Lökensefalopati (PML)

Nöromiyelitis Optika (NMO)
NMO Spektrum Bozuklukları (NMOSD)
Hastalık değıştirici tedavi (DMT'ler)
Plazma değışimi (PLEX)
Sekonder progresif MS (SPMS)
İmmünoadsorbsiyon (IA)
İntravenöz immunglobülin (IVIG)
Sfingosin-1-fosfat (S1P)
Primer progressif MS (PPMS)
İnterferon beta (IFN-b)
Nükleer faktör benzeri 2 (Nrf2)
Klinik sonuç ölçütü (COM)
Fonksiyonel Sistemler (FS)
Multipl Skleroz Fonksiyonel Kompozit (MSFC)
25-adım yürüyüş testi (T25FWT)
Dokuz delikli peg testi (9HPT)
Kognisyon paced auditory serial test (PASAT-3)
Multipl Skleroz Performans Testi (MSPT)
Manuel Beceri Testi (MDT)
İşleme Hızı Testi (PST)
Kontrast Duyarlılık Testi (CST)
Guy's Neurological Disability Scale (UKNDS/GNDS)
Hasta tarafından bildirilen sonuç (PRO)
Hasta Tarafından Belirlenen Hastalık Adımları (PDDS)
Hiçbir hastalık aktivitesi kanıtı yok (NEDA)
Çinko (Zn)
İnsan prolaktin (hPRL)

Büyüme hormonu (gGH)
Natürel kileer (NK)
N -metil-D-aspartat (NMDA)
 γ -aminobütirik asit (GABA)
Nitrik oksit sentaz (NOS)
Peroksinitrit (ONOO⁻)
Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)
Nörotrofin (NT)
4-(2-aminoetil) benzensülfonil florür (AEBSF)
Reaktif oksijen türleri (ROS)
Nükleer faktör (NF-KB)
IL-1 reseptör kinaz (IRAK)
Matris metalopeptidaz-9 (MMP-9)
Protein kinaz C (PKC)
Poli(ADP-riboz) polimeraz-1'i (PARP-1)
Clioquinol (CQ)
Metallotiyonein (MT)
Nitrik oksit (NO)
İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)
Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2)
12-lipoksijenaz (12-LOX)
N , N , N ' , N '-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamin (TPEN)
Irt-benzeri protein (ZIP)
Nörotropin reseptörü etkileşim faktörü (NRIF)
Nörotrofin reseptörü 75 (NTR)
Reseptör tirozin kinaz (RTK)
Sinir büyüme faktörüne (NGF)

Tirozin kinaz (Trk)

Miyelin transkripsiyon faktörü 1 (MyT1 veya NZF2)

Nöral çinko parmak faktörü-1 (NZF-1 veya MyT1 benzeri veya png-1)

Tümörjenisite 18 (ST18 veya NZF-3)

Lisine özgü demetilaz 1 (LSD1),

NOGO Reseptör (Ngr)

MikroRNA (miRNA)

Alzheimer hastalığı (AD)

Parkinson hastalığı (PD)

Huntington hastalığı (HD)

Amyotrofik lateral skleroz (ALS)

Nörodejeneratif hastalık (NDD)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

Klotho'nun transmembran formunu aşırı eksprese eden transgenik fareler (KL-OE)

Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (SÜDAM)

Karboksi-metil-selüloz (KMS)

İntraperitoneal (i.p.)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Miyelinle ilişkili inhibitör protein nörit büyüme inhibitörü-A (Nogo-A)

Çinko Parmak Proteinleri (ZFP'ler)

Sestrin 2 (SESN2)

1.GİRİŞ

1.1.Multipl Skleroz

Multipl skleroz (MS), genç erişkinler arasında en yaygın travma kaynaklı olmayan engellilik nedenidir (1). MS, tarihsel olarak, beyin ve omurilik beyaz cevherinde büyük fokal lezyonlara yol açan, değişken ölçüde aksonal demiyelinizasyon ile karakterize, merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, otoimmün, inflamatuvar bir hastalığı olarak tanımlanmıştır (2). Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artan MS insidansı ve prevalansı bulunmaktadır. Bunun altında yatan neden halen belirsizdir (3). MS karmaşık bir hastalıktır; özellikle D vitamini veya ultraviyole B ışığına (UVB) maruz kalma, Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu, obezite ve sigara gibi birkaç çevresel faktöre ek olarak birçok gen hastalığına duyarlılığı ılımlı oranda artırmaktadır (4). MS tarihsel olarak MSS'e özgü T hücre aracılı otoimmün hastalık olarak sınıflandırılmıştır. Bununla birlikte, B-hücresini hedef alan tedavilerin başarısı, standart T-hücre aracılı otoimmün hastalık düşüncesine meydan okumaktadır (5). Geleneksel olarak, hastalık iki aşamalı olarak görülmektedir. Erken dönemde inflamasyon, relapsing-remitting hastalıktan sorumlu tutulmakta, gecikmiş nörodejenerasyon sekonder ve primer progresif MS gibi relaps olmadan progresyona neden olan hastalığa neden olmaktadır (6, 7).

1.1.1.Tarihçe

MS, yüzyıllar boyunca, 'parapleji' olarak sınıflandırılan, epizodik ve ilerleyici nörolojik bozulma ile karakterize bir durum olarak kabul edildi. On dokuzuncu yüzyılın ortalarında von Frerichs, Vulpian, Charcot ve diğerleri tarafından ayrı tanımlanabilir bir klinik tablo olarak sınıflandırıldı. Patolojisi, klinik özellikleri, seyri ve prognozu ile tanımlanan vakalar, dünyada diğer hekimler tarafından da teşhis edilir hale geldi. Hastalıkla ilgili bilgi arttıkça, nedensel teoriler ve tedaviye yönelik yaklaşımlar arttı. Antikoagülanlar, antibiyotikler, histamin duyarsızlaştırma, çeşitli diyetler, aşılar ve anti-kanser ajanlarını içeren çok sayıda tedavi denemeleri yapıldı. 1960'lardan sonra, randomize klinik araştırmaları yürütmek için, geliştirilmiş hastalık sınıflandırması ve engellilik ölçeklerinin kullanılması ile metodoloji daha iyi tanımlanır hale geldi. Veriler biriktikçe, genetik etkiler, çevresel faktörler, coğrafi varyasyonlar, enfeksiyonlar ve immünolojik değişikliklerin etkilerini açıklamak için çalışmalar yapıldı. MS gruplarının gelişimi ve araştırmalar halk eğitimine de katkı

sağladı ve hastalığa karşı tutumları değiştirdi. Aynı zamanda, doktorların MS hastalarının yönetimine yaklaşımları da değişti. Son elli yılda, hastalığın altında yatan mekanizmaları ve süreçleri aydınlatmak için temel araştırmalarda, görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesinde ve hastalığın tedavi sürecinde immünmodülatör ilaçların geliştirilmesinde büyük ilerleme katedilmiştir. Son yıllarda MS'li insanlara umut ve fayda sağlayan çalışmalarla, MS'un terapötik çağını yaşamaktayız (8).

1.1.2.Epidemiyoloji

Uluslararası Multipl Skleroz Federasyonu (MSIF) Eylül 2019 ile Mart 2020 arasında, dünya nüfusunun %87'sini temsil eden 115 ülkeden epidemiyolojik veriler topladı. Dünya çapında tahmini MS'li kişi sayısının 2013'teki araştırma ile aynı metodoloji uygulandığında, %30 daha yükselerek 2020'de 2,8 milyona ulaştığı görüldü. 2020 küresel yaygınlığı 100.000 kişi başına 35,9 olarak bulundu. MS prevalansı 2013'ten beri dünyanın her bölgesinde artmıştır. Her iki yılda da verileri olan ülkelerin sadece %14'ü sabit veya azalan yaygınlık bildirmişlerdir. Rapor veren 75 ülkede havuzlanmış insidans oranı 100.000 kişi/yıl için 2.1 idi. Dünyada her 5 dakikada bir MS teşhisi konduğunu tahmin edilmektedir. Pediatrik başlangıçlı MS, 47 ülke tarafından bildirilen 18 yaşın altındaki bireylerde teşhis edilen yaklaşık 30.000 MS vakası ile önemli ölçüde artmıştır. 2013 yılında 34 ülke tarafından 7.000 vaka rapor edilmiştir. Küresel olarak, kadınların MS'e sahip olma olasılığı erkeklerin iki katıdır ancak, kadınların erkeklere oranı bazı ülkelerde 4:1'e kadar çıkmaktadır. Bildirilen prevalans değişikliğinin en önemli üç olası nedeni 'MS teşhisinde iyileşme', 'gelişmiş MS tedavisi ve desteği' ve 'MS'li hasta sayısını takip etme becerisinde iyileşme' olarak değerlendirilmiştir. İnsidanstaki bölgesel varyasyon (yılda 100.000 kişi başına) genel olarak yaygınlık modelini takip etmektedir, Avrupa'da rapor edilen en yüksek insidans 6.8, Amerika'da 4.8'dir. Güney Doğu Asya ve Afrika, 0,4 ile bildirilen en düşük insidans oranlarına sahiptir (9).

MS prevalansındaki belirgin uluslararası çeşitlilik, araştırmacılara göçle ilişkili MS riskindeki olası değişikliği inceleme konusunda ilham vermiştir. Yüksek bir prevalans alanından daha düşük prevalansa sahip alana göç, MS riskinde bir azalma ile ilişkili gibi görünmektedir, ancak bazı tartışmalar mevcuttur. Göç sırasındaki yaş ayrıca MS riskini de etkiliyor gibi görünmektedir. Bu nedenle, 15 yaşından önce yüksek bir MS risk bölgesinden daha düşük bir risk alanına göç eden

bireyler, yeni ülkelerine daha yakın bir MS riski elde ederken, daha geç yaşta göç eden bireyler, yüksek MS riskini koruyor gibi görünmektedir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, göçün 15 yaş veya daha sonraya ertelenmesi durumunda MS riskinde çok az değişiklik olduğu veya hiç değişmediği varsayımını sorgulamıştır. Aksine, yani düşük riskli bir bölgeden yüksek riskli bölgeye göç, MS riskinde çok fazla değişiklik ile ilişkilendirilmemiştir. Bununla birlikte, Avrupa'daki yüksek MS riski taşıyan ülkelerde yapılan daha yakın tarihli araştırmalar, batılı olmayan ülkelere gelen belirli göçmen gruplarının, kendi ülkelerindekilerden daha yüksek MS prevalansına sahip olduğunu ve göç yaşının düşükten yüksek MS riskli bölgelere göç eden bireyler arasında MS riskini de etkileyebileceğini göstermektedir. MS insidansı yüksek bir ülke olan Danimarkada 1968'den 2015'e kadar olan dönemi kapsayan ülke çapında yapılan geniş bir kohort çalışmasında birinci kuşak göçmenler arasında MS riski etnik Danimarkalılarından daha düşük bulunmuş, ancak doğdukları ülkedekinden daha yüksek olarak değerlendirilmiş. Buna karşılık, ikinci nesil göçmenler arasındaki MS riski, özellikle ebeveynleri düşük MS riski olan ülkelere doğmuş bireyler için etnik Danimarkalılarından daha yüksek tespit edilmiştir (10).

İçlerinde Türkiye'nin de bulunduğu Asya ve Okyanusya ülkelerinde MS epidemiyolojisi üzerine 1 Ocak 1985 ve 1 Ekim 2020 arasında yayınlanan çalışmaların derlendiği bir meta-analizde Türkiye verileri incelendiğinde MS hastalık başlangıcında ortalama yaş 29,4'dü. Havuzlanmış toplam prevalans 100.000 kişi başına 56,1'di. Havuzlanmış kadın hasta prevalans değeri 100.000 kişi başına 110 ile en yüksek olan ülkedeydi. Havuzlanmış erkek hasta prevalansı 100.000 kişi başına 27,5'di. Havuzlanmış total insidans ise 100.000 kişi başına 2,9'du ve en yaygın MS formu relapsing-remitting MS'di (11).

1.1.3.Etyoloji Ve Genetik

MS etiyolojisi, bağışıklık homeostazında değişikliklere neden olan genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşime bağlı olarak multifaktöriyeldir (12). Ancak, hastalığın etyopatogenezi ve patofizyolojisini daha iyi anlamak için dört temel faktörden yola çıkılarak bir çerçeve oluşturulabilir; mitokondri disfonksiyonu (MtD) ve oksidatif stres (OS), D vitamini (VD), seks hormonları ve tiroid hormonları. Bu faktörler MS patolojisinde doğrudan rol oynar ve hastalıkta rol oynayan diğer birçok faktör üzerinde modülatör bir etkiye sahiptir.

MS hastalarında tiroid hastalıklarının yaygın olduğu görülmektedir. Tiroid hormonu (TH), demiyelinizasyon ve aksonal hasarda çok önemli bir rol oynar (13). Hayvan modellerinden elde edilen çok sayıda kanıt, TH uygulamasının, oligodendrosit soy hücrelerinin gelişimini ve remiyelinizasyonu destekleyerek cuprizon (CPZ) kaynaklı demiyelinizasyonu hafiflettiğini göstermiştir (14, 15). TH'nin, oligodendrosit progenitör hücrelerin (OPC) gen transkripsiyonundaki düzenleyici rolü aracılığıyla remiyelinizasyonu destekleyerek MS patolojisini hafifletebildiğine inanılmaktadır (16). Ayrıca, deneysel alerjik ensefalomyelitte TH tedavisinin aksonal patoloji üzerinde nöroprotektif bir etki sağladığı bulunmuştur (17). TH, miyelin basic proteini (MBP), miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) ve proteolipid proteini (Plp), 2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPase) dahil olmak üzere MSS miyelinin kritik bileşenlerini oluşturan genleri düzenler (13, 18). Otoimmün tiroid bozukluklarında Th17 lenfositleri ve Th22 hücrelerinin yükseldiği bulunmuştur (19) ve interleukin (IL)-17 üreten T helper hücrelerin Hashimoto tiroiditi hastalarında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (20). Bir MS sıçan modelinde, TH (levotiroksin) uygulamasının, serum IFN- γ konsantrasyonlarını önemli ölçüde azaltarak ve MS hastalarında çok düşük olduğu bilinen anti-inflamatuar sitokin, IL-10 (21) seviyelerindeki değişiklikleri önleyerek demiyelinizasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (22).

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen çok sayıda kanıt, VD eksikliği/yetersizliği olan kişilerin daha yüksek MS riskine sahip olduğunu göstermektedir (23, 24). Düşük serum VD seviyeleri, MS patolojisinin şiddeti ile ilişkilidir (25). Çeşitli çalışmalar, düşük VD düzeylerinin, Genişletilmiş engellilik durum ölçeği (EDSS) (26, 27) ile değerlendirildiğinde MS özürüllüğü ile yüksek düzeyde ilişkili olabileceğini bulmuştur. VD eksikliği, MS özürüllüğünün kritik bir öngörücüsü ve modülatörüdür (28). Ayrıca, demiyelinizasyon ile ilişkilidir. VD tedavisinin cuprizon kaynaklı demiyelinizasyona karşı koruduğu ve mikrogliya ve makrofaj aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (29). MS'deki oligodendrosit soy hücrelerinde VD reseptörünün (VDR) eksprese edildiği ve VD'nin OPC'lerin olgun oligodendrositlere farklılaşmasını arttırdığını ve demiyelinizan hastalıkların rejeneratif bileşeninde VD'nin çok önemli bir rolü olduğu kanıtlanmıştır (30). Ayrıca, VD immünoregülasyonda da rol oynar, anti-inflamatuar özelliklere sahiptir ve sitokinlerin immünoregülasyonunda ve proinflamatuar sitokin yanıtının down-

regülasyonunda önemli bir rol oynar (31, 32). VD'nin, VDR'nin IL-10 promotörüne bağlanması ve kalsiyum bağımlı sinyalleme modülasyonu yoluyla, aktive edilmiş B hücrelerinin IL-10 (anti-inflamatuar sitokin) ekspresyonunu desteklediği gösterilmiştir (33). VD'nin hastalığın erken döneminde MS hastalarının CD8+ T hücreleri üzerinde birincil modülatör etkisi vardır (34). VD MS dahil olmak üzere otoimmün hastalıklarda, CD4 + T hücreleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir ve MS seyri sırasında T hücresi dengesinde önemli bir rol oynar (35, 36). Yüksek VD seviyeleri, gelişmiş bir regülatuar T hücre işlevi ve RRMS hastalarında T helper (Th)1/Th2 dengesinin Th2'ye kayması ile ilişkilendirilmiştir (37).

Birkaç kanıt dizisi, MtD'nin MS'de çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. MtD'nin nörodejenerasyon, inflammatuar ve ilerleyici faz ve aksonal dejenerasyon da dahil olmak üzere MS patolojisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modeli üzerine yapılan araştırmalar, oligodendrositlerdeki mitokondriyal genetik/biyoenenerjetik işlev bozukluğunun, MS ve diğer demiyelinizan sendromların etyopatogenezinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir.

Kadın cinsiyet hormonlarının MS patogenezinde rol oynayabileceği fikri, hasta dağılımında önemli bir kadın-erkek farkı ve gebelik sırasında hastalık aktivitesinde azalma olmasına dayanmaktadır. Östrojenin nöronal plastisiteyi ve aksonal filizlenmeyi desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, seks hormonlarının immünomodülatör etkileri vardır. Kanıtlar, seks hormonlarının nöroprotektif ve anti-inflamatuar etkilere sahip olduğunu göstermektedir (38).

Dört ana faktör ve MS etyolojisinde suçlanan çevresel faktörler ile viral enfeksiyonlar aslında iç içe geçmiş bir bütündür. Örneğin sigara kullanımı, obezite ve EBV enfeksiyonu dahil olmak üzere birçok risk faktörü OS'e neden olmakta ve MS etyolojisinde yer aldığı düşünülmektedir. Aynı zamanda VD takviyesinin MS'de EBV'nin etkisini azalttığı bulunmuştur (39, 40). Ek olarak, antioksidan tedavinin EBV viral yüklerini azalttığı bulunmuştur (41). Birlikte ele alındığında, VD ve OS'nin MS'de EBV'nin rolünü açıklayabileceği varsayılabilir.

MS riski ve genetik ile ilgili araştırmalar devam etmekle beraber son 10 yılda çoklu genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), hastalık patogenezinin

bağımsız olarak katkıda bulunan 200'den fazla lokus ortaya çıkarmıştır. Diğer otoimmün hastalıklara benzer şekilde, MS'li bireyler ailelerde kümelenme eğilimindedir. Birden fazla çalışma, monozigotik ikizlerin, dizigotik ikizlere (%2–5) kıyasla daha yüksek bir birliktelik oranına (%20-30) sahip olduğunu ve MS'de genetik etyolojiyi açıklamada güçlü bir destek sağladığını göstermiştir. Ayrıca, etkilenen bir bireyin kardeşlerinin MS geliştirme olasılığı genel popülasyona göre en az yedi kat daha fazladır. İkinci ve üçüncü derece akrabalar (ancak eşler değil) ılımlı bir risk artışı taşır ve bu durum ailesel kümelenmeye neden olan genetik faktörlerle uyumludur. Toplamda, popülasyon ve aile verileri, MS'e yatkın genotipin, popülasyonda nispeten sık görülen çoklu bağımsız DNA varyantlarından kaynaklandığı konusunda kabul görmektedir (12). 1972'de keşfedilen MS ile ilişkili ilk genetik risk lokusu, kromozom 6 üzerindeki insan lökosit antijeni (HLA) sınıf I bölgesinde yer almaktadır. O zamandan beri, birkaç HLA sınıf I ve II aleli, MS geliştirme risk artışıyla ilişkilendirilmiş veya koruyucu oldukları bulunmuştur. En güçlü ilişki, MS riskini neredeyse 3 kat arttıran HLA DRB1 * 1501 aleli ile gösterilmiştir. GWAS, ana doku uyumluluk kompleksi (MHC) bölgesinde 32'ye kadar bağımsız MS risk varyantı tanımlamıştır ve genel olarak, MHC lokusunun tek başına MS kalıtsallığının %20'sini açıkladığı tahmin edilmektedir. HLA lokusu 6p21.3 kromozomu üzerinde haritalanır ve T hücre kompartımanının olgunlaşmasında ve düzenlenmesinde ve ayrıca diğer immünolojik süreçlerde önemli rollere sahip 200'den fazla geni kapsar ve MS'in, MSS'i hedef alan periferik bağışıklık sisteminin düzensizliğinden kaynaklanan bağışıklık aracılı bir hastalık olduğu hipotezini desteklemektedir. Tutarlı olarak, MHC bölgesinin bir haritalama çalışması, bu lokustaki bazı MS ile ilişkili varyantların, peptid bağlama oluşunun amino asidik dizisini etkilediğini, potansiyel olarak antijen tanıma ve T hücresi repertuar özgüllüğünü etkilediğini göstermiştir (42).

1.1.4.İmmunpatogeneze

MS'nin tanısal özelliği, MSS'de beyaz ve gri cevherde oligodendrositlerin yıkımı ve kaybı ile oluşan büyük birleşik demiyelinize lezyonların olmasıdır. Miyelinin tamamına yakınının kaybolmasına rağmen, aksonlar büyük oranda korunur ve aksonal yıkım miktarı farklı hastalar arasında ve hatta aynı hastadaki lezyonlar arasında değişkendir. Lezyonlar, T lenfositler, B lenfositler ve

plazma hücrelerini içeren inflamasyon sonucu meydana gelir. İnflamatuar reaksiyon, postkapiller venler çevresinde başlar. Bu nedenle, lezyonların ilk evrelerinde perivenöz demiyelinizasyon görülür ve bu lezyonlar, çevredeki normal görünen beyaz maddeye doğru genişleyen birleşik demiyelinizan plaklarla kaynaşır. Bu, Dawson parmakları olarak adlandırılan lezyonların tipik perivenöz uzantılarını oluşturur. Demiyelinizan süreç, aktif doku hasarı durumunda astrositlerin aktivasyonu ve inaktif lezyonlarda gliotik skar oluşumu ile ilişkilidir. MS lezyonları, oligodendrosit progenitör hücrelerin toplanması ve farklılaşmasının bir sonucu olarak kısmen remiyelinli hale gelebilir. Benzer perivenöz ve birleşik demiyelinize lezyonlar, serebral ve serebellar korteks, derin beyin sapı çekirdekleri ve omurilik dahil olmak üzere gri cevherde de oluşur. Ek olarak, serebral kortekste, özellikle hastalığın progresif aşamasında yaygın subpial kortikal demiyelinizasyon mevcuttur ve aktif subpial demiyelinizasyon, leptomeninkslerdeki inflamatuvar infiltratlarda görülür. MS lezyonlarının içinde ve çevresinde inflamasyon, hastalığın tüm evrelerinde görülür. İnflamasyon en çok aktif demiyelinizan lezyonlarda belirgindir, ancak normal görünen beyaz cevherin yanı sıra inaktif veya remiyelinli plaklarda da görülmektedir. Oligodendrosit kaybı ile seçici perivenöz primer demiyelinizasyon, MS'yi fokal beyaz ve gri cevher lezyonları olan diğer hastalıklardan ayırır. Örnek olarak, nöromiyelitis optikada, aquaporin 4'e karşı spesifik antikörler tarafından tetiklenen bir primer astrosit hasarını takip eden şiddetli aksonal yıkıma sahip fokal demiyelinizan lezyonlar görülür. Diğer inflamatuvar durumlarda, primer demiyelinizasyon, oligodendrositlerin viral enfeksiyonunu takiben gelişebilir (örneğin, progresif multifokal lökoensefalopati). Bu durumda, demiyelinizasyon başlangıçta sadece oligodendrosit bölgelerini etkiler, ancak MS'deki tipik perivenöz paterni yansıtmaz. Diğer inflamatuvar hastalıklarda veya inmede fokal beyaz cevher lezyonları, miyelin, oligodendrosit ve aksonların eş zamanlı kaybıyla oldukça yıkıcı bir tabloya neden olur.

Mikroglia aktivasyonu en çok aktif demiyelinizan lezyonların kenarında belirgindir ancak aynı zamanda perioplakta ve hatta normal görünen beyaz cevherde de bol miktarda bulunur. Perioplakta, kısmen dejenere olan aksonları çevreleyen aktive mikroglia beyaz cevher kümeleriyle sıklıkla karşılaşılır. Plak merkezindeki makrofajların, aktive edilmiş mikroglia havuzundan mı yoksa hematojen monositlerden mi türetildiği çözülmemiştir. Makrofajlar, tahrip olmuş miyelin kılıflarının kalıntılarını içerir. Aktif olmayan lezyonlar keskin bir şekilde

sınırlandırılmışlardır ve primer demiyelinizasyon, kısmi aksonal koruma ve reaktif gliosis gösterirler. Periplak beyaz cevherde değişken derecelerde mikrogliya aktivasyonu bulunurken, mikrogliya sayısı demiyelinizan plağın merkezinde önemli ölçüde azalır. Yoğun fibriler skar dokusu, demiyelinizan aksonlar arasındaki boşluğu doldurur. Daha da önemlisi, aktif olmayan lezyonlarda hızlı aksonal taşınmanın bozulmasıyla, kronik olarak demiyelinizan aksonların devam eden ölümünü gösteren düşük derecede akut aksonal hasar vardır. Aktif olmayan lezyonlar gibi, remiyelinli gölge plakları, kendisini çevreleyen normal görünen beyaz cevherden keskin bir şekilde ayrılır. Bu lezyonlar içindeki aksonlar, kısaltılmış internodlara sahip tek tip ince miyelin kılıflarına sahiptir. Remiyelinizasyon, progenitör hücre havuzundan türetilen yeni oligodendrositler tarafından gerçekleştirilir ve lezyonun tamamında mevcut olabilir veya sadece plak veya plak sınırı içindeki odak alanlarında bulunabilir. Remiyelinizasyonun kapsamı, farklı MS hastaları arasında büyük ölçüde değişir ve kısmen lezyon konumuna bağlıdır. Örnek olarak remiyelinli plaklar periventriküler beyaz cevhere kıyasla subkortikal alanda daha sıktır. Gri cevher demiyelinizasyonu beyaz cevherdeki ile karşılaştırıldığında inflamasyon, ödem, mikrogliya aktivasyonu ve makrofaj infiltrasyonunun derecesi, çok daha azdır ve remiyelinizasyon, kortekste beyaz maddeye göre daha gelişmiştir.

Meninkslerde, inflamatuvar hücreler, üçüncül lenfatik dokunun özelliklerini gösteren büyük agregatlar oluşturur. Meninkslerdeki bu tür inflamatuvar folikül benzeri yapılar, altta yatan kortekste özellikle şiddetli aktif demiyelinizasyon ile ilişkilidir. Benzer agregatlar, beynin büyük perivasküler Virchow-Robin alanlarında da bulunur (2).

Birçok çalışma, Th hücresi (CD4+ T hücreleri olarak da bilinir) ve antijen sunan hücreler (APC'ler) ile T lenfositleri arasındaki etkileşimle başlatılan adaptif immün yanıtın MS'in başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını öne sürmüştür. Patojenle ilişkili moleküller eşzamanlı olarak APC'ler üzerindeki toll-like reseptörlere bağlanır ve IL-12, IL-23 ve IL-4'ü içeren spesifik sitokinlerin üretimi indüklenir. Bu sitokinler CD4+ T hücre farklılaşmasını Th1, Th2 veya Th17 fenotiplerine doğru indüklemeye başlar. İnterferon gama (IFN γ) veya tip II interferon ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a), doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık için kritik olan proinflamatuvar sitokinlerdir. Bu sitokinler Th1 hücreleri tarafından üretilir. Th2 farklılaşmasını baskılayarak inflamasyonu teşvik etme yeteneğine sahiptirler. Th2

hücreleri, anti-inflamatuar sitokinler olan IL-4 ve IL-13'ü salgılar. IL-4, M2 makrofajındaki (onarım makrofajları) artış ve inflamasyonu destekleyen M1 makrofajların alternatif aktivasyonu yoluyla patolojik inflamasyonu azaltır. IL-13'ün bağışıklık hücreleri üzerindeki etkileri IL-4'e benzer. Bu sitokin, matriks metalloproteinaz salgılayarak, özellikle alerjik inflamasyon sırasında anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Th17, inflamasyonu teşvik edebilen çok sayıda sitokini (IL-17, IL-21, IL-22 ve IL-26) indükleyen başka bir CD4+ T hücresidir. B lenfositleri ve sitokinleri MS patogeneğinde yer alan diğer faktörlerdir. Lenfotoksin [veya transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)] ve bu hücreler tarafından üretilen TNF- α , inflamasyonu destekler. Ayrıca bu hücreler, bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'u üretebilir. Bu nedenle, B lenfositlerin MS gelişiminde hem olumlu hem de olumsuz etkileri vardır. Birçok çalışma, MS lezyonlarında CD8+ T hücrelerinin (veya sitotoksik T hücrelerinin) bulunabileceğini göstermiştir. Bu hücreler, perforin gibi sitolitik proteinlerin üretimi yoluyla, CD4+ T hücrelerinin baskılanmasına ve inaktivasyonuna aracılık eder. Ayrıca bu hücreler vasküler geçirgenliği doğrudan artırarak, glial hücreleri yok ederek ve oligodendrosit ölümünü tetikleyerek MS patogeneğinde önemli rol oynarlar. MSS inflamasyonuna ek olarak, oligodendrosit ölümüne bağlı miyelin onarım süreci de bozulur. Fas ligandı (FasL), lenfosit hücreleri tarafından üretilir. Bu ligand, bu hücrelerin apoptoz sürecini başlatan oligodendrosit hücreleri üzerindeki Fas reseptörlerine [TNF reseptör süper ailesine ait hücre yüzeyi reseptörü] bağlanır. Bu nedenle miyelin sentez hücrelerinin sayısı azalır ve miyelin kılıfının sentezini bozar (43).

Son yıllarda güncellik kazanan MS'de nörodejenerasyonun patogenezi ise halen net değildir. Bazı deneysel çalışmaların sonuçlarına göre Enflamasyonun nörodejenerasyona neden olduğu, nörodejenerasyonun enflamasyona neden olduğu, enflamasyonun ve nörodejenerasyonun birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığı ve enflamasyonun nörodejenerasyona karşı koruduğu örnekler mevcuttur (44).

1.1.5.Klinik Bulgular

MS'in çok çeşitli belirti ve semptomları bulunmaktadır. Lezyon yerleşimine göre optik sinir, beyin sapı, beyincik ve omurilik dahil olmak üzere MSS'de çeşitli odaklar etkilenebilir. Ancak manyetik rezonans görüntülemeye (MRG) görülen lezyonlar ve klinik belirtiler arasındaki korelasyon her zaman aynı olmayabilir.

Bunun nedeni, lezyonun onarımı, nöral plastisitenin hasarı telafi etmesi ve rezidüel fonksiyonun MRG'deki değişikliklere paralel olmaması olabilir. Ek olarak, son çalışmalar, hem beyaz hem de gri cevherde standart MRG'de görünmeyen patolojik özellikler olduğunu göstermiştir. MS semptomları, MSS'deki miyelinli yolların kesintiye uğramasından kaynaklanır. İlk semptomlar genellikle aşağıdakilerden birini veya daha fazlasını içerir: bir veya daha fazla ekstremitede güçsüzlük veya el becerisinde azalma, duysal bozukluk, monooküler görme kaybı (optik nörit), çift görme (diplopi), yürümede dengesizlik ve ataksi. Hastalık ilerledikçe, birçok hastada mesane disfonksiyonu, yorgunluk ve ısı hassasiyeti ortaya çıkar. Ek olarak, Lhermitte belirtisi, fasyal güçsüzlük veya ağrı, vertigo, kısa tonik spazmlar ve diğer paroksizmal semptomları içerir. Özellikle ileri vakalarda hafıza kaybı, dikkat bozukluğu, problem çözme güçlükleri, yavaş bilgi işleme ve bilişsel görevler arasında geçiş yapma güçlükleri gibi bilişsel kayıplar yaygındır (45).

Optik nörit: Akut demiyelinizan optik nörit, MS hastalarının yaklaşık %20'sinde ortaya çıkan bir semptomdur ve hastalık seyrinin bir noktasında MS hastalarının yaklaşık yarısını etkiler. Optik nörit, tipik olarak göz ağrısı ile ilişkili, saatler veya günler içinde gelişen, subakut görme bulanıklığı veya kaybı öyküsüne dayanarak klinik olarak teşhis edilir. En belirgin şekilde renkli görme, özellikle kırmızı desatürasyon ve düşük kontrastlı görme etkilenir. Hastalar, görme alanı testinde bir skotoma karşılık gelen görme alanı içinde "kör nokta" veya "bulanık nokta"dan şikayet edebilirler. Optik nöritin akut fazı sırasında, vakaların üçte ikisinde fundoskopik muayenede optik disk normal görünür (retrobulbar optik nörit); vakaların diğer üçte birinde, optik sinir şişkin (papillit) görünür. Göreceli bir afferent papiller defekt (bir Marcus Gunn pupili) genellikle mevcuttur. Akut optik nöritte, MRG genellikle etkilenen optik sinirin T2 ağırlıklı görüntülerinde hiperintensiteyi ve sinir içindeki kontrast artışını gösterir. Görsel uyarılmış potansiyeller (VEP'ler) tipik olarak, etkilenen gözün uyarılmasının ardından iyi oluşturulmuş bir P100 potansiyelinin gecikme süresinde uzama sergiler. Bu gecikme paterni demiyelinizan bir hasarı düşündürür. Akut optik nörit azaldıktan sonra, çoğu hasta, optik disk solukluğu olsun veya olmasın, fundoskopide saptanabilen bir dereceye kadar retina sinir lifi tabakası (RSLT) kaybı sergiler. RSLT kaybının büyüklüğü retinal optik koherans tomografi (OCT) kullanılarak ölçülebilir.

Beyin sapı sendromları: MS'de beyin sapı sıklıkla etkilenir. MS'de beyin sapı tutulumuna bağlı klinik sendromlar; çift görme (kraniyal sinirler III, IV, VI), internükleer oftalmopleji (medial longitudinal fasciculus), fasyal güçsüzlük veya miyokimi (kraniyal sinir VII), vertigo (kraniyal sinir VIII) veya bulbar disfaji, dizartri ve dil kaslarında güçsüzlük gibi semptomlar (kraniyal sinirler IX, X, XII). Yüz duyu bozukluğu (kraniyal sinir V), beyin sapı, servikal kord (afferent trigeminal yolların pontomedüller bileşkedeki girişlerinden üst servikal omurga seviyesine inmesi nedeniyle), subkortikal ve kortikal duysal yollar dahil olmak üzere değişik lokalizasyonlardan kaynaklanabilir. MS'de daha az görülen beyin sapı semptomları, işitme kaybı ve şiddetli bulbar belirtileri içerir. Beyin sapına bağlanan serebellar ağların tutulumu tek taraflı ataksi, dismetri veya disdiadokokineziye yol açabilir. MS'de edinilmiş pendüler nistagmusun, nöral entegrasyon ve bakışın korunmasında yer alan serebellopontin ağlarının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sendrom, görmede "parıldama" veya osilasyon olarak kendini gösterir ve standart takipte göz hareketleri büyük ölçüde normal görünse bile, optik diskin sarkaç hareketlerinin saptanmasıyla fundus muayenesinde doğrulanabilir.

Motor semptomlar: Güçsüzlük, MS hastalarının %89'unu hastalık seyrinin bir noktasında etkiler. MS'de ekstremitelerdeki fokal zayıflık genellikle kortikospinal yolun tutulumundan kaynaklanır ve bu nedenle sıklıkla hiperrefleksi, spastisite ve Babinski veya Chaddock testinde ekstansör plantar yanıt gibi üst motor nöron tutulumunun bulguları eşlik eder. Pasif kas gerilmesine karşı dirençte hıza bağlı bir artış olan spastisite, sertlik, spazmlar, kramplar ve yürüme bozukluğu ile ilişkilidir ve güçsüzlük yokken de ortaya çıkabilir. Ekstremitelerin istemsiz kasılmaları şeklinde görülen paroksizmal tonik "nöbetler", sıklıkla spinal etkilenme ve beyin sapı lezyonları ile birlikte görülür. Vücudun bir tarafıyla sınırlı, yaklaşık 30 saniye ila bir dakika süren tonik spazmlardan oluşurlar; günde birden fazla (genellikle >15) kez ortaya çıkar. Bu durum, tedavileri farklı olduğu için sıklıkla spastisite ile ilişkili olan kas spazmlarından ayırt edilmelidir. Tonik spazmlar muhtemelen MS'de görülen paroksizmal dizartri-ataksi gibi diğer paroksizmal sendromlarla ilişkilidir. Düşük dozlarda karbamazepin veya ilgili ajanlarla tedavi genellikle hızlı ve önemli ölçüde rahatlama sağlar.

Duyusal semptomlar: Uyuşma ve parestezi, MS hastalarının yaşadığı yaygın semptomlardır. Bu semptomlar geçici olduğunda, sadece saniyelerle dakikalar arasında sürerse, MS'de atağı düşündürmezler. Tersine, saatler veya günlerce sürdüklerinde, akut inflamatuvar demiyelinizan bir hasarı yansıtabilirler. Duyusal şikayetler MS hastalarının %87'sini hastalık seyrinin bir noktasında etkiler. MS'de ağrı genellikle yanma, elektriksel veya keskin duyular gibi nöropatik özelliklere sahiptir. Lhermitte'in semptomu -boyun fleksiyonu üzerine omurgadan aşağı doğru inen elektrik şoku benzeri bir his- hastalığın bir noktasında MS hastalarının üçte birine kadarında ortaya çıkar. Lhermitte semptomu nöroanatomik olarak, servikal veya üst torasik omurilikte arka kolondan kaynaklanır.

Dengesizlik: MS hastaları genellikle dengesiz veya koordinasyonsuz olma hissini tanımlar. Bu durumlarda, sorunu lokalize etmek için dikkatli bir nörolojik muayene gereklidir, çünkü bu semptomlar serebellar disfonksiyon, duysal bozukluk (duysal ataksi), vestibüler disfonksiyon, spastisite veya güçsüzlükten kaynaklanabilir.

Kognitif bozukluk: İnce bilişsel eksiklikler MS hastalarının %40-70'ini etkiler. MS demansa yol açabilir, ancak bu nadirdir ve genellikle yaygın hastalık bağlamında ortaya çıkar. MS'de formal nöropsikolojik testlerden etkilenen en yaygın alanlar, yavaş bilgi işleme, yürütücü işlev bozukluğu ve uzun süreli sözel ve görsel hafızanın bozulmasıdır. MS'deki bilişsel bozulma, beyaz cevher tutulumu ve beyin atrofisinin yanı sıra standart MRG dizileri kullanılarak iyi görüntülenemeyen kortikal demiyelinizan plaklarla ilişkilidir.

Depresyon: Majör depresyon, MS hastalarının yaklaşık %30-45'ini etkiler. Nedeni belirsizdir, ancak bazı hastalarda MS'den kaynaklanan frontotemporal ağların etkilenmesi ile ilgili olabilirken, diğerlerinde sadece komorbid bir durum olabilir.

Yorgunluk: Yorgunluk, MS'deki en yıpratıcı semptomlardan biridir ve geniş bir ankette hastaların %83'ünde mevcut bir semptom olarak bildirilmiştir. Hastalar çoğunlukla MS yorgunluğunu genel bir düşük enerji hissi olarak tanımlarlar. Yorgunluk şikayetlerini motor güçsüzlük şikayetlerinden ayırt etmek önemlidir. Yorgunluk klinik nöksler arasında devam edebilir, ancak genellikle hastalık aktivitesi ile bağlantılı olarak kötüleşir. Yorgunluk, MS'in belirgin bir özelliğidir ve

muhtemelen kronik MSS inflamasyonu ile ilgilidir. Bununla birlikte, özellikle depresyon, hipotiroidizm, adrenal yetmezlik, anemi, uyku bozuklukları gibi alternatif nedenleri dışlamak, yorgunluğu olan MS hastalarının değerlendirilmesinde her zaman önemlidir.

Mesane ve barsak disfonksiyonu: Nörojenik mesane ve alt üriner sistem bozukluğu MS'de önemli bir özrürlük nedenidir. MS'de nörojenik mesanenin en yaygın belirtilerinden biri, formal ürokinamik teste tabi tutulan MS hastalarının yaklaşık üçte ikisinde bulunan detrusor hiperrefleksi “aşırı aktif” mesanedir. Bu refleks, üretral sfinkterin gevşemesi ile aynı anda detrusor kasının koordineli kasılmasını içerir. Detrüör refleksi, korteksten köken alan ve omurilikte ilerleyen yollar aracılığıyla istemli olarak inhibe edilir ve muskarinik kolinerjik innervasyon tarafından kontrol edilir. Bu inhibisyonun kaybı, küçük mesane hacimlerinde refleksin aşırı aktivasyonuna ve otomatik boşalmaya yol açarak üriner aciliyet, sık idrara çıkma ve inkontinans semptomlarına yol açar. Antimuskarinik antikolinerjik ilaçlarla tedavi semptomatik rahatlama sağlayabilir. Bununla birlikte, antikolinerjik tedaviler, özellikle işeme sonrası rezidü testi yüksek olan hastalarda, yetersiz boşalma semptomlarını şiddetlendirebilir ve idrar retansiyonuna neden olabilir. Şiddetli detrusor hiperaktivite vakalarında ve mikst patolojili vakalarda temiz aralıklı kateterizasyon gerekebilir. Botulinum toksininin mesaneye lokal enjeksiyonu, oral tedavi yetersiz olduğunda detrusor aşırı aktivitesinden semptomatik rahatlama sağlayabilir. Mesane semptomları olan MS hastalarının yaklaşık %20-25'i, ürokinamik testlerde düşük kontraktileteye bağlı mesane yetersizliği bulguları sergiler, bu da idrar sıklığında artış ve eksik boşaltım semptomlarına yol açar. MS'de yönetilmesi en zor üriner durum, detrusor-sfinkter dissinerjisi. Detrüör-sfinkter dissinerjisi, detrusor ve sfinkter kasları arasındaki koordinasyon kaybından kaynaklanır ve idrarda duraksamaya, idrar akımının kesilmesine ve tam boşaltamamaya yol açar. Destrusor sfinkter dissinerjisi genellikle temiz aralıklı kateterizasyon gerektirir. MS hastalarında, nörojenik mesane disfonksiyonu karışık patolojiler içermektedir. Bir MS hastasında tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları, yüksek oranda nörojenik mesane disfonksiyonunu düşündürür. Stres inkontinans (gülme, atlama veya diğer fiziksel manevralara bağlı sızıntı), özellikle kadınlarda yaygın bir ürolojik komorbiditedir, ancak tipik olarak MS hastalığı süreciyle ilgisi yoktur ve üriner inkontinansın nörojenik nedenlerinden ayırt edilmesi gerekir. Akut

idrar retansiyonu, akut miyelitin bir semptomu olabilir. MS'de barsak disfonksiyonu mesane tutulumundan daha az görülür ve kabızlık en sık şikayettir. MS kaynaklı bağırsak inkontinansı genellikle ciddi omurilik hasarına bağlı ortaya çıkar. Cinsel işlev bozukluğunun bazı serilerde hastaların üçte birini, diğerlerinde ise erkeklerin %80'ini ve kadınların %50-70'ini etkilediği bildirilmektedir. En genel tanımlanan patolojiler erkeklerde erektil disfonksiyon ve kadınlarda libido kaybı ve/veya yorgunluktur.

Isı hassasiyeti: Isı, MS semptomlarını karakteristik olarak şiddetlendirir ve daha önce hafiflemiş olan eski semptomları geçici olarak ortaya çıkarabilir. Bu, sıcak bir gün, sıcak bir duş veya yoğun egzersiz bağlamında ortaya çıkabilir. MS'de - Uthoff fenomeni- ısı duyarlılığının fizyolojik temeli, daha yüksek sıcaklıklarda demiyelinizan sinirlerin iletiminde yavaşlama olmasıdır. Bu durumda geçici olarak ortaya çıkan semptomlar rahatsız edici ve engelleyici olabilir, ancak bunlar yeni inflamatuvar aracılı hasara neden olmaz veya bunu göstermez ve nüks olarak kabul edilmez.

Baş ağrısı: MS hastalarının yaklaşık üçte ikisi baş ağrısından şikayet eder ve MS hastalarındaki baş ağrılarının çoğu migrene bağlanabilir. MS'de migren ve MS semptomatolojisini ayırt etmek, uygun tedaviyi yönlendirmek ve migren semptomlarını MS atakları olarak yanlış sınıflandırmamak için migrenin doğru teşhisi önemlidir.

Psödorelaps: MS semptomlarının geçici olarak kötüleşmesi veya tekrar ortaya çıkmasıdır. Enfeksiyon veya diğer stres faktörleri bağlamında ortaya çıkabilir. Özellikle kadınlarda asemptomatik olabilen bir idrar yolu enfeksiyonu sık olarak psödorelapsa neden olabilir (46).

1.1.6. Multipl Skleroz Klinik Tipleri

MS klinik tipleri Lublin ve arkadaşları tarafından 2013 yılında revize edilmiştir. 1996 yılında tanımlanan çekirdek MS fenotipleri arasında yer alan progresif relapsing tanımı çıkarılmış progresif aktif hasta grubuna dahil edilmiştir. Klinik izole sendrom (KİS) tanımı ise takip gerektiren bir hasta grubu olarak MS fenotipleri arasında yer almıştır. Radyolojik izole sendrom (RİS) hastalarda klinik

belirti ve bulgulara sahip olmadığından bir MS fenotipi olarak kabul edilmemiştir. MS klinik fenotipleri KİS, relapsing (ataklı) MS ve progresif (kötüleşen) MS olarak üç başlık altında toplanmıştır. Temel olarak sınıflandırma yapılırken hastalık aktivitesi/ataklarla seyretmesi ve hastalığın ilerleyici olması/özürlülüğe neden olması sınıflamanın temelini oluşturmuştur. Aktif hastalık tanımı klinik olarak tam düzelen ya da sekel bırakan atakların olduğu ve/veya MRG T1 incelemede kontrast tutan ve/veya T2 incelemelerde hiperintens yeni lezyon gelişmesi olarak yapılmıştır.

KİS: İzole optik nörit, medulla spinalis hasarı, beyin sapı etkilenmesi ve daha az sıklıkla hemisferik tutulum şeklinde klinik bulgu vererek ortaya çıkan, MR'de MS'i düşündüren semptomatik ya da asemptomatik lezyonların görüldüğü, SSS'nin inflamatuvar demiyelinizan doğada etkilendiği ilk nörolojik tablo KİS olarak adlandırılmaktadır.

Ataklarla seyreden MS (RRMS): Akut atakları izleyen tam ya da tama yakın düzelme dönemleri mevcuttur, Ataklar arasında hastalıkta ilerleme gözlenmez. Aktif RRMS ve non-aktif RRMS olarak alt gruplara sınıflandırılır.

Progresif seyreden MS: Hastalık seyri sırasında özürlülüğün eklendiği gruptur. Atak ve iyileşmeler ile giden ortalama 5-6 yıllık bir dönem sonrası atak sayısının azaldığı, düzelmenin az olduğu, özürlülüğün giderek arttığı sekonder progresif dönem gözlenebilir, başlangıçtan itibaren ataklar yaşansa da devamlı bir özürlülük artışı gözlenebilir veya iyileşme olmaksızın, başlangıçtan itibaren hastalık kötüleşebilir. Aktif progresif MS, Aktif non-progresif MS, Non-aktif progresif MS, Non-aktif non-progresif MS (stabil hastalık) olarak alt gruplara sınıflandırılır.

Benign MS geriye dönük olarak değerlendirilebilen bir tanıdır. Atak sıklığının az olduğu ve hastalığın ciddi sekel bırakmadığı hastalarda, MRG'de düşük lezyon yükünün varlığı ve hastalığın başlangıcından 15 yıl sonra EDSS skorları ≤ 3 olması durumunda hastalar benign MS olarak kabul edilir. Ancak yine de hastalığın seyrini tanımlamak için 'benign' ve 'malign' terimlerinin dikkatli kullanılması önerilir. Özellikle, benign kesin bir terim değildir; bu geriye dönük bir tanıdır ve bazı durumlarda yanıltıcı olabilir, çünkü MS herhangi bir aşamada, hatta uzun süreli (örneğin 10 veya 20 yıl) belirgin stabileden sonra bile kötüleşebilir (47).

1.1.7.Laboratuvar Bulguları

MS tanısı için spesifik belirteçler yoktur. Tanı esas olarak tıbbi öykü ve nörolojik muayeneye bağlıdır. Bu nedenle atakları doğru tanımlamak çok önemlidir. Ataklar, ateş veya herhangi bir enfeksiyon yokluğunda, anatomik bir lokalizasyonla ilişkili olabilen, 24 saatten uzun süren yeni nörolojik defisitler olarak tanımlanır.

Atak ile başvuran bir hastada tanıyı doğrulamak için en önemli paraklinik test, gadolinyum içeren intravenöz (iv) kontrast madde ile yapılan MRG incelemesidir. Bu, hem ayırıcı tanı için lezyonların doğasını (inflamatuvar ve demiyelinizan özellikler) hem de lezyonların MSS içindeki dağılımını (en son tanı kriterleri için zaman [DIT] ve uzayda [DIS] yayılma kanıtı) aydınlatır. 2015 yılında MS Çalışma Grubunda (MAGNIMS) Manyetik Rezonans Görüntüleme ile MRG taramasının temel özellikleri tanımlanmıştır. Minimum kesit kalınlığı, sekansların teknik özellikleri ve kontrast madde miktarı (Gadolinium, Gd) gibi kontrast bölümleri ve gadolinyum uygulamasından sonra yeniden taramanın zamanlaması gibi özellikler açıkça belirlenmiştir. Ek olarak, daha erken evrelerdeki (RIS, CIS) takip MRG'leri için gerekli zamanlama da netleştirilmiştir (48). 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS, MS'lu hastalarda MRG kullanımına ilişkin fikir birliği önerilerine göre önceki kılavuzlar ile karşılaştırıldığında, klinik sonuçlarda ikna edici kanıt olmamasına rağmen makrosiklik gadolinyum bazlı kontrast maddeleri (GBCA)'ların tekrarlanan kullanımı azaltılmalıdır önerisinde bulunmuştur. GBKA'lar birçok klinik durumda, özellikle de multipl skleroz tedavilerinin izlenmesi sırasında gerekli olmadığından, bunların makul ve az kullanımı daha güvenli görünmektedir. Multipl sklerozlu hastalarda hastalık aktivitesinin rutin takibi için spinal MRG'si önerilmemektedir. Bununla birlikte, MSS tutulumunun başlangıçtaki kapsamını (yani hastalık yükü) değerlendirirken ve açıklanamayan ve beklenmedik hastalık kötüleşmesi ve multipl skleroz dışında bir tanı olasılığı dahil olmak üzere diğer özel durumlarda spinal MRG'sinin uygulanması tanı için önemlidir. Umut vadeden MRG incelemeleri arasında santral ven işaretinin tespiti ve kortikal lezyonların tanımlanmasına yönelik yeni yaklaşımlar bulunmaktadır (49).

MS tanısında bir diğer önemli tetkik beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesidir. BOS ve serumdaki albümin ve immünoglobulin düzeylerinin

ölçülmesi, artan protein içeriğinin bozulmuş kan beyin bariyerinden mi (KBB) kaynaklandığını veya izole bir intratekal sentezin mi söz konusu olduğunu ayırt etmemize yardımcı olur. BOS/serum albümin konsantrasyon gradyanı (Qalb), KBB geçirgenliğini yansıtan önemli bir parametredir. MS hastalarında BOS protein ve Qalb seviyeleri genellikle normal veya hafif yüksek bulunmuştur, hastaların yaklaşık %20'sinde KBB geçirgenliğinde hafif bir artış görülebilir. İzole intratekal immünglobülin G (IgG) sentezi matematiksel olarak Reiber tarafından nicel intratekal IgG analizi olarak formüle edilmiştir. Yaygın olarak kullanılan IgG indeksi QIgG/Qalb'e (BOS IgG/serum IgG)/(BOS albümin/serum albümini) eşittir ve normal değer 0,7'nin altındadır. Öte yandan, oligoklonal IgG tespiti, izoelektrik odaklama ile serum ve BOS numunelerinin paralel elektroforezi ile gerçekleştirilen kalitatif bir yöntemidir. Kesin MS olan hastaların oligoklonal bantları (OKB) yaklaşık %80-90'ında pozitif bulunmuştur, ancak BOS'ta OKB'lerin varlığı MS için patognomonik değildir. MS'deki BOS tipik olarak berraktır, normal basınç ve glukoz seviyeleri izlenir, yaklaşık 1/3'ünde yüksek protein olabilir, ancak 100 mg/dl'nin üzerindeyse MS teşhisi pek olası değildir. Lenfositik hafif pleositoz olabilir; Bununla birlikte, eğer hücre sayısı 50 / mm üzerindeyse ayırıcı tanıda yine diğer hastalıklar düşünülmelidir. Bunların dışında gerektiğinde elektrofizyolojik testler (görsel uyarılmış potansiyeller [VEP] ve somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller [SEP]) çalışılabilir (48).

Tablo 1.1. MS tanısı için yapılan araştırmalar (48)

Birincil testler
Kan testleri hemogram, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri, elektrolit seviyeleri, sedimantasyon, CRP, B12, folat ve D vitamini, tiroid fonksiyon testleri, lipid paneli, viral seroloji (anti HIV, anti HCV, HbsAg, anti-Hbs), VDRL-RPR, ANA (1/320 titre ve paternler), ANA pozitif ise ENA profili, antifosfolipid antikorları, anti-ds DNA MRI kraniyal, servikal ve torakal CSF analizleri BOS proteini, BOS ve eş zamanlı kan şekeri), BOS albümin ve IgG, BOS laktat, serum albümin ve IgG, BOS IgG indeksi, IEF elektroforezi ile BOS OCB analizi Optik nevritli hastalarda: VEP ve optik koherens tomografi
İkincil testler
Uyarılmış potansiyeller (VEP ve SEP) Optik koherens tomografi Ürodinamik testler Bilişsel testler
Ayrırcı tanı için diğer testler
Ek biyokimyasal testler vaskülit şüphesi varsa, daha geniş otoantikör paneli, 24 saatlik idrar analizi, GFR değerlendirmesi, romatolojik bozukluklar için anti CCP, serum kompleman seviyeleri, lenfoma için serum anti beta2 mikroglobulinler, sarkoidoz için kan ve BOS ACE seviyeleri , adrenolökodistrofi için adrenal hormon seviyeleri, uzun/çok uzun zincirli yağ asitleri, mitokondriyal hastalıklar için serum piruvat, laktat seviyeleri, nöromiyelitis optika için anti-aquaporin 4 ve anti-MOG testleri Enfeksiyöz etiyolojiler için spesifik testler Lyme hastalığı ve bruselloz için antikorlar, tüberküloz için PPD ve kantiferon testleri Anjiyografi serebral, floresein, MRA Biyopsi cilt, lenf nodu, beyin ve/veya leptomeninks, periferik sinir, diğer Göz muayenesi metabolik bozukluklar için retina değerlendirmesi, sarkoidoz ve Behçet hastalığı için uvea değerlendirmesi İşitme testleri Susac için Elektrofizyoloji sinir iletim çalışmaları, EMG Göğüs röntgeni kronik latent/sekel enfeksiyöz akciğer bozuklukları ve hiler adenopati için Kalp muayenesi SLE ve mitokondriopatiler için ekokardiyografi Diğerleri Sjögren hastalığı için Schirmer testi ve maligniteler ve metabolik bozukluklar için tükürük bezi sentigrafisi SPECT ve PET

1.1.8.Tanı ve Ayırıcı Tanı

1950'lerden bu yana MS tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü artırmak için çeşitli kriterler geliştirmeye yönelik birçok girişimde bulunulmuştur. Bu kriterlerin temel amacı klinik tabloya neden olan lezyonların MSS içindeki zaman ve mekan yayılımını göstermek ve MS'i klinik ve radyolojik olarak taklit edebilecek diğer bozuklukları ayırt etmektir. Bazı durumlarda MS, klinik ve laboratuvar özellikleri ile kolayca teşhis edilebilir. Ancak hastalığın erken evrelerinde veya atipik klinik ve radyolojik özellikleri olan hastalarda kesin tanı koymak zor olabilir.

İlk kapsamlı klinik kriterler 1965'te Schumacher ve diğerleri tarafından önerildi. Bu kriterlere göre, bir nörolog diğer olası tanıları ortadan kaldırdıktan ve “olası MS” tanısına yol açan atağı tanımladıktan sonra, bulunması gereken iki durum olmalıdır. Birincisi, en az 1 ay arayla, en az 24 saat süren iki veya daha fazla atak olması, ikincisi ise MSS’de birden fazla bölgenin tutulumunu gösteren iki veya daha fazla nörolojik bulgunun varlığıdır.

Poser, 1983 yılında bu kriterlere paraklinik testleri dahil ederek tanıyı “klinik olarak kesin” veya “laboratuvar destekli kesin” MS olarak tanımlayarak tanının güvenilirliğini artırmıştır. Bu sırada uyarılmış potansiyeller ve BOS analizleri klinik kriterlere paraklinik destekleyici bulgular olarak eklendi. Daha sonra MRG kriterleri geliştirildi ve halen kullanılmaktadır.

McDonald kriterleri ilk olarak 2001 yılında geliştirilmiş ve daha sonra 2005, 2010 ve son olarak 2017'de revize edilmiştir (48).

Tablo 1.2. 2017 Revize McDonald kriterler (48)

Atak	Objektif klinik bulgulu lezyon sayısı	MS tanısı için gereken ek veri
≥ 2 atak	≥ 2	yok
≥ 2 atak	1+ öyküde başka bir alanda ki lezyona ait atak	yok
≥ 2 atak	1	MSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ile mekanda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥ 2	Ek bir klinik atak veya MRG ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	MSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ile mekanda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB varlığı
Sinsi progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2’si •MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥ 1 lezyon • Spinal kordda ≥ 2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı

MRG’de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥ 2 ’sinde ≥ 1 lezyon olması.

MRG’de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG’de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG’inde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması.

Mc Donald'ın 2017 kriterlerindeki üç büyük revizyon mevcuttur. Bunlar sırasıyla;

1. Tipik CIS'li hastalarda uzayda yayılımın klinik veya radyolojik kanıtı varsa ve BOS'a özgü OKB'ler mevcutsa, MRG veya ikinci yeni atak ile gösterilen zamanda yayılmaya gerek kalmadan kesin MS tanısı konulabilir.

2. 2010 kriterlerinde spinal semptomatik lezyonlar uzayda veya zamanda yayılım kanıtı olarak kabul edilmedi, ancak bu lezyonların tanı kriterlerine eklendiklerinde tanısal duyarlılığa katkıları gösterildiğinden spinal lezyonlar da 2017 kriterlerine dahil edildi.

3. Jukstakortikal, periventriküler ve infratentoryal lezyonların yanı sıra kortikal lezyonlar da uzayda yayılmaya dahil edildi (48).

Tablo 1.3. MS ayırıcı tanı (48)

Diğer İdiyopatik İnflamatuar Demiyelinizan Bozukluklar (IIDD)	İdiyopatik İnflamatuar Demiyelinizan Olmayan Hastalıklar	Bulaşıcı Hastalıklar	Metabolik Bozukluklar
Akut Dissemine Ensefalomyelit (ADEM)	Nöro-Behçet Hastalığı	Lyme hastalığı	Adrenolökodistrofi (X'e bağlı adrenolökodistrofi, Addison-Schilder hastalığı)
Schilder Hastalığı	Sistemik lupus eritematozus (SLE)	HTLV-1 (İnsan T-Lenfotropik Virüs-1) ilişkili Miyelit	Leber'in Kalıtsal Optik Nöropatisi (LHON)
Balo'nun Konsantrik Sklerozu	Sjögren Sendromu	HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) ilişkili MSS Tutuşumu	Subakut Kombine Dejenerasyon
MS'nin Marburg Varyantı	Paraneoplastik Nörolojik Sendromlar	Progresif Multifokal Lökensefalopati (PML)	
Nöromiyelitis Optika (NMO) ve NMO Spektrum Bozuklukları (NMOSD)	Sarkoidoz	Nörosifiliz	
	Wegener Granulomatosis (Granülomatöz Polianjiitis)		

1.1.9.Tedavi

Şu anda, MS için kesin bir tedavi yoktur. MS tedavisi temel olarak immünosupresif ve immün modüle edici ajanların kullanımına dayanmaktadır. Bununla birlikte, atak hızını azaltan ve ilerlemeyi geciktiren ve esas olarak bu hastalarda inflamasyonu hedefleyen bir dizi DMT tasarlanmıştır. MS tedavisinde kayda değer gelişmeler olmasına rağmen, ilerleyici özürlülük ve erken ölüm oranı hala endişe vericidir. Son zamanlarda, bir monoklonal antikorun

(ocrelizumab) primer progresif MS klinik denemesinde faydalı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, remiyelinizasyon veya nöroproteksiyona odaklanan yeni tedavi stratejileri değerlendirilmektedir (50).

1.1.9.1.Akut atak tedavisi

Yüksek doz iv veya oral kortikosteroidler, MS'de nöksler için birinci basamak tedavidir. Kortikosteroidlerin, hızlı immünosupresan etki ile MS nöksleri üzerinde etkisi olduğuna inanılmaktadır. Veriler, iv veya oral kortikosteroidlerin, EDSS veya Kurtzke Fonksiyonel Sistem Skalası ile ölçülen relapsların şiddetini azalttığını ve relapsing-remitting MS'de hastanın iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir, ancak progresif MS'deki nöksler üzerindeki etkisinin kanıtı çok sınırlıdır.

Plazma değişimi (PLEX)'in MS'de yararlı olduğuna dair kanıtlar, büyük ölçüde, şiddetli inflamatuvar demiyelinizan hastalıklarda (tümü MS'li değil) atakları olan ve iv yüksek doz metilprednizolon tedavisinden sonra iyileşmede göstermeyen hastalarda yapılan randomize, plasebo kontrollü, çift kör bir çalışmadan kaynaklanmaktadır. Genel olarak, üç PLEX tedavisinden sonra klinik iyileşme görülmekte ve tedaviye yanıt verenlerde PLEX'in tamamlanmasından 6 ay sonrasına kadar devam eden iyileşme izlenmektedir. Sekonder progresif MS'de (SPMS) kortikosteroide dirençli üst üste binen relapslarda PLEX'in rolü için yalnızca anekdot niteliğinde kanıtlar mevcuttur. PLEX'in aksine, immünoadsorbsiyon (IA), plazma ürünü değişiminden kaçınırken antikorları ve immün kompleksleri ortamdaki uzaklaştırır. PLEX'e benzer şekilde, retrospektif çalışmaların sonuçları, kortikosteroide dirençli relapsları olan MS hastalarında üç prosedürden sonra IA'nın en etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kortikosteroide dirençli MS relapsları için PLEX ve IA kullanımını destekleyen sınırlı kanıt görünmektedir. Bununla birlikte, intravenöz immünglobülin (IVIG)'nin şiddetli relapslarda hiçbir etkisi yok gibi görünmektedir (51).

1.1.9.2.Koruyucu tedaviler

DMT'ler, bağışıklık fonksiyonunun baskılanması veya modülasyonu yoluyla MS'in seyrini değiştirir. Esas olarak MS'in nökseden fazında anti-inflamatuvar aktivite gösterirler; relaps oranını ve MRG lezyonlarının birikimini azaltır ayrıca sakatlığı stabilize eder, geciktirir ve bazı durumlarda orta derecede iyileştirir.

İlk onaylanmış tedaviler, interferonlar ve glatiramer asetat, tesadüfi keşiflerdi. Bu iyi tolere edilen ilaçların MS nükslerinin sıklığını orta derecede azalttığından anlaşılmasından sonra oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başladılar. Ardından adezyonu bloke ederek lenfositlerin MSS'e erişimini engelleyen stratejiler (natalizumab) veya birincil lenfoid organlardaki sekestre lenfositlerin sfingosin-1-fosfat (S1P) reseptör modülatörleri fingolimod, siponimod ve ozanimod hem MS hem de EAE'de etkili bulundu. Son yıllarda önemli bir ilerleme olarak MS patogenezinde B hücreler ve humoral bağışıklığın etkisinin anlaşılmasıyla ilk olarak anti-CD20 monoklonal antikor rituximab geliştirildi ve ardından bunu ocrelizumab ve ofatumumab'ın başarılı gelişimleri izledi.

Relapsing-remitting MS tedavisi

DMT'ler RRMS için sıklıkla kullanılmaktadırlar. Olgun B hücrelerinin yüzeyindeki CD20 molekülüne karşı humanize bir monoklonal antikor olan okrelizumab, onaylandığı 2017 yılından bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır. Okrelizumab, RRMS hastalarında relapslara ve sessiz progresyona karşı oldukça etkilidir ve MRG ile saptanan yeni beyaz cevher lezyonlarının gelişimini durdurmada önemli faydalara sahiptir. Ocrelizumab, önceden var olan humoral bağışıklığı ve B hücresi yeniden oluşturma kapasitesini koruyarak CD20 eksprese eden B hücrelerini seçici olarak azaltır. B-hücresinin azalması, periferden MSS'e B-hücresi geçişinde güçlü bir düşüş, T hücrelerine B hücresi antijen sunumunun azalması, B hücreleri tarafından proinflamatuvar sitokin salgılanmasının modülasyonu ve immünoglobulin salgılayan plazmablastların aktivasyonunun ve farklılaşmasının azalması ile ilişkilidir.

Rituximab, ön çalışmalarda ve gerçek dünya verilerinde RRMS ve primer progressif MS (PPMS)'e karşı benzer şekilde etkili görünen kimerik bir anti-CD20 monoklonal antikordur ve herhangi bir düzenleyici kurumdan onay almamasına rağmen yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ofatumumab, evde aylık subkutan enjeksiyonla uygulanan tamamen humanize bir anti-CD20 monoklonal antikordur ve RRMS için faz 3 denemelerinde yüksek derecede güvenlik ile okrelizumab'a benzer bir etkinlik profiline sahiptir.

Humanize bir monoklonal antikor olan Natalizumab, lenfositlerin yüzeyinde eksprese edilen ve endotelden MSS'e geçişte rol oynayan bir adezyon molekülü olan

a4b1 integrininin bir inhibitörüdür. Natalizumab, 4 haftada bir intravenöz infüzyon olarak uygulanır. Natalizumab, gerçek dünya çalışmalarında daha uzun vadede sürdürülen plasebo veya interferon beta (IFN-b)-1a'ya kıyasla, RRMS hastalarında nöksleri azaltmada ve hastalık ilerlemesini yavaşlatmada oldukça etkilidir. Natalizumab genellikle iyi tolere edilir; ancak uzun süreli tedavi, hastaların ~%0,4'ünde meydana gelen progresif multifokal lökoensefalopati (John Cunningham virüsünün neden olduğu fırsatçı bir beyin enfeksiyonu) riski taşır. Bu nedenle, natalizumab genellikle yalnızca JC virüs antikör testi negatif hastalar için önerilir.

Fingolimod, RRMS için onaylanan ilk oral tedavidir. Sekonder lenfoid organlardan lenfositlerin çıkışını önleyen, otoreaktif lenfositlerin MSS'e sızmasını engelleyen bir S1P inhibitörüdür. Fingolimod iyi tolere edilir, ancak rutin laboratuvar değerlendirmesinde hafif anormallikler (örn., karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme veya lenfopeni) görülebilir. Tedavi başlatıldığında kalp bloğu ve bradikardi de oluşabilir, bu nedenle ilk dozunu alan tüm hastalar için 6 saatlik bir gözlem süresi (elektrokardiyogram izleme dahil) önerilir. Diğer yan etkiler arasında maküler ödem ve nadiren dissemine varicella-zoster virüsü, kriptokok enfeksiyonları ve progresif multifokal lökoensefalopati yer alır; tedaviye başlamadan önce, bir oftalmik muayene ve seronegatif bireyler için suçiçeği-zoster virüsü aşısı endikedir. Yakın zamanda onaylanmış bir seçici S1P reseptör modülatörü olan Ozanimod'un da uygun güvenlik ve tolere edilebilirlik ile RRMS'de etkili olduğu gösterilmiştir.

Dimetil fumarat, nükleer faktör (eritroitten türetilmiş 2)-benzeri 2 (Nrf2) yolunun ve Nrf2'den bağımsız yolların aktivasyonu yoluyla anti-inflamatuar ve sitoprotektif etkiler gösterir. Dimetil fumarat genellikle iyi tolere edilir, ancak bazı hastalarda progresif multifokal lökoensefalopati riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu vakaların çoğu lenfopeniktir, bu nedenle her 6-12 ayda bir lenfopeni izlenmesi önerilir. Diroximel fumarat yakın zamanda onaylanmıştır ve dimetil fumarat gibi mono-metil fumarata metabolize edilir.

Teriflunomid, romatoid artritte kullanılan bir immün baskılayıcı ilaç olan leflunomidin aktif metabolitidir. Teriflunomid, pirimidin sentezinde yer alan bir enzim olan dihidroorotat dehidrojenazı ve otoreaktif olduğu varsayılan aktive lenfositlerin proliferasyonunu inhibe eder. Hepatotoksisite ve teratogenez riski bulunmaktadır. Yaygın yan etkiler arasında baş ağrısı, ishal, bulantı, saç dökülmesi

ve hepatik alanin transferaz artışı yer alır. Gerektiğinde, teriflunomid kolestiramin ile hızla elimine edilebilir.

IFN-b, etki mekanizması büyük olasılıkla, antijen sunan hücreler üzerinde majör histocompatibility kompleks moleküllerinin ekspresyonunu down regüle ederek, proinflamatuvar sitokinleri azaltıp, anti-inflamatuvar sitokinleri artırarak, T hücresi proliferasyonunu inhibe ederek immünomodülasyonu sağlayan bir sınıf I interferondur. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin MSS'e geçişini engeller. IFN-b, hastalık aktivitesinin nüks oranını ve MRG aktivitesini orta düzeyde azaltır ve özürülük birikimini yavaşlatır. Yaygın advers olaylar arasında grip benzeri semptomlar ve rutin laboratuvar değerlendirmesinde hafif anormallikler ve ayrıca subkutan uygulama ile enjeksiyon bölgesi reaksiyonları yer alır. Yan etkiler genellikle nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarla yönetilebilir.

Glatiramer asetat, 4 amino asitten oluşan rastgele polipeptitlerin bir karışımının asetat tuzudur. Etkisini, proinflamatuvar ve düzenleyici sitokinler arasındaki dengeyi olumlu şekilde değiştirerek gösterir. Nüks oranlarını ve bazı hastalık şiddeti skorlarını orta derecede azaltır ve RRMS'de IFN-b'ye eşit derecede etkili bir alternatif olarak kabul edilebilir. Yaygın advers olaylar arasında enjeksiyon bölgesi reaksiyonları, kızarma, göğüste sıkışma, nefes darlığı, çarpıntı, enjeksiyondan sonra anksiyete ve daha az sıklıkla, nadiren şekil bozukluğuna neden olabilen ve tedavinin kesilmesini gerektiren lipoatrofi yer alır.

RRMS için nadiren kullanılan DMT'ler arasında mitoksantron, alemtuzumab ve kladribin yer almaktadır. Hepsinin RRMS'de kanıtlanmış faydaları vardır; bununla birlikte, tedaviyle ortaya çıkan ciddi advers olaylar kullanımlarını sınırlar. Son olarak, artan kanıtlar, otolog hematopoietik kök hücre transplantasyonunun birçok RRMS hastasında uzun süreli bir remisyona neden olabileceğini göstermektedir. Bu prosedürü diğer oldukça etkili tedavilerle karşılaştıran randomize çalışmalar devam etmektedir. Şu an için, otolog hematopoietik kök hücre nakli, yalnızca diğer tüm makul tedavi seçeneklerini tüketmiş olan RRMS hastaları için önerilmektedir ve mevcut veriler, bu tedaviye rağmen ilerlemenin sıklıkla devam ettiğini gösterdiğinden, progresif MS hastalarına önerilmemektedir.

Sekonder progresif MS tedavisi

Siponimod, aktif SPMS (yani yakın zamanda klinik relapsları olan veya yeni veya genişleyen MRG lezyonlarının kanıtı olan SPMS'li hastalar) de dahil olmak üzere tekrarlayan MS formları için onaylanmış seçici bir S1P modülatörüdür. Aktif SPMS'li hastalarda okrelizumab, kladribin ve diroksimel fumarat da kullanılabilir.

Primer progresif MS tedavisi

Okrelizumab, PPMS tedavisi için onaylanmış tek DMT'dir. Dozlama, RRMS ile aynıdır. Okrelizumab, klinik özüllülüğün ilerlemesini yaklaşık dörtte bir oranında azaltır ve bu popülasyonda inflamatuvar ve dejeneratif hastalık aktivitesinin diğer klinik ve MRG belirteçlerini iyileştirir. (52)

1.1.10. Multipl Sklerozda Özüllülük Değerlendirmesi

MS'in tanımlanmasından bu yana engellilik ve hastalık durumu ile ilgili hastaları takip edebilmek ve hekimler arasında ortak bir dil oluşturabilmek amacıyla birkaç klinik sonuç ölçütü (COM) ortaya çıkmıştır.

Genişletilmiş özüllülük durum ölçeği (EDSS), 1983'te yayınlanan MS ile ilişkili engelliliğin değerlendirilmesinde ilk standartlaştırılmış araçlardan biridir. 0'dan (normal nörolojik muayene) 10'a (MS nedeniyle ölüm) kadar bir sıralı skaladan oluşur. Hesaplamasında eğitimli bir doktor, Fonksiyonel Sistemler (FS, her biri 0'dan 4, 5 veya 6'ya kadar) ve ambulasyon adı verilen yedi fonksiyonel grubu değerlendirir. Değerlendirilen fonksiyonlar görsel, beyin sapı, piramidal, serebellar, duyuşal, barsak/mesane ve serebral foksionlardır. Bu alanların nihai özet puanı üzerindeki etkisi sabit değildir. Dinlenmeden maksimum yürüme mesafesi olarak değerlendirilen ambulasyon, final skorunda baskın bir öneme sahiptir. EDSS'nin son adımı üç bölüme ayrılabilir: aralığın alt kısmında (EDSS adım 0 ila 4.0), EDSS nörolojik muayenenin sonuçlarını yansıtır ve bu nedenle engellilikten ziyade FS'lerde bozulmanın bir göstergesidir. 4.5 ve 7.5 aralığında bir EDSS, ambulasyonun bir ölçüsü haline gelir. Daha yüksek skorlar (EDSS adım 7.5'in üzerinde) herhangi bir ambulasyonu olmayan hastalarda günlük yaşam aktivitesini yansıtır.

Multipl Skleroz Fonksiyonel Kompozit (MSFC) ise ambulasyon, üst ekstremité fonksiyonu ve kognisyonu değerlendiren üç testten oluşan klinik bir

skorlamadır. Ambulasyonu değerlendirmek için zamanlı 25-adım yürüyüş testi (T25FWT) kullanılır. T25FWT, hastanın belirtilen 25 ft (7,62 m) mesafeyi her zamanki gibi, güvenli, hızlı ve duraklamadan yürümesi için gereken süreyi değerlendirir. Üst ekstremité fonksiyonunu değerlendirmek için dokuz delikli peg testi (9HPT) kullanılır. 9HPT, hasta dokuz mandalı bir tahta üzerindeki 9 deliğe ve arkasını bir kutuya hareket ettirirken el becerisini değerlendirir, MSFC'de bu test her elle iki kez yapılır ve her biri için ayrı ayrı süreler ortalaması alınır. Kognisyon değerlendirmesinde ise kognisyon paced auditory serial test (PASAT-3) testi kullanılır. PASAT-3, her yeni basamağı hemen bir öncekine ekleyen hastaya her 3 saniyede bir 60 sayı sunarak işitsel bilgi işleme kapasitesini değerlendirir.

Multipl Skleroz Performans Testi (MSPT), MS'li kişilerin değerlendirilmesinde en yeni araçlardan biridir. MSFC'ye dayalı nörolojik anamnez ve muayenenin farklı fonksiyonel alanlarında veri toplama platformu olarak bir akıllı tablet kullanılarak geliştirilmiştir. Testin içeriğinde Yürüme Hızı Testi (MSFC'den T25FWT'yi simüle eder); Manuel Beceri Testi (MDT, 9HPT'ye dayalı); İşleme Hızı Testi (PST, Sembol Rakam Modaliteleri Testi ile aynı prensiplere sahip); ve Kontrast Duyarlılık Testi (standart Sloan düşük kontrastlı harf keskinliği testi çizelgelerini simüle etmek için tasarlanmış CST) bulunmaktadır. Bu testler, eğitilmiş bir doktor tarafından uygulanan MSFC'ye dayalı olanlarla büyük bir güvenilirlik ve korelasyon göstermiştir.

Diğer bir klinik değerlendirme aracı Guy's Neurological Disability Scale (UKNDS/GNDS). İlerlemiş hastalığı veya ciddi bozukluğu olan hastalara da uygulanabilecek duyarlı ve çok boyutlu bir ölçeğin olmaması nedeniyle geliştirilmiş bir hasta tarafından bildirilen sonuç (PRO) ölçeğidir. GNDS, biliş, ruh hali, görme, konuşma, yutma, üst ve alt ekstremité, mesane ve bağırsak, cinsel fonksiyonu, yorgunluk ve 'diğerleri' ile ilgili işlevleri içeren 12 alanda hasta görüşmesi tarafından yönlendirilen bir ankettir. Engellilik, hastanın algılanan engelliliğine dayanır ve 12 fonksiyonel alanın her birini 0'dan (normal durum) 5'e (toplam fonksiyon kaybı – maksimum yardım gerekli) 6 seviyeli bir şiddet ölçeğinde değerlendirir.

Bir diğer PRO ise Hasta Tarafından Belirlenen Hastalık Adımları (PDDS) anketidir. PDDS, muhtemelen hastalar için klinik olarak anlamlı olan daha fazla değişikliğin tespit edilebilmesi avantajıyla, engelliliği standart bir şekilde ölçmeye

alışan bir PRO'dur. Bu, klasik hekim temelli sonuçların yanı sıra günlük hastalık karakterizasyonu konusunda hekimleri destekleyebilir. PDDS, engelliliği sekiz nörolojik alanda ölçer: hareketlilik, el işlevi, görme, yorgunluk, biliş, mesane/bağırsak, duyuusal alan ve spastisite. Bu alanlar, EDSS'nin FS'si ile neredeyse tamamen eşdeğerdir, ana fark, serebellar fonksiyonun, mobilite ve el fonksiyonuna yansıtılmasına rağmen, PDDS'de doğrudan temsil edilmemesidir. Özellikle hareket kabiliyeti kısıtlı olan ve farklı nedenlerle nörolojik değerlendirmeye gitmekte güçlük çekenler için PRO teletıp ortamlarında veya uzun mesafeli muayenelerde önemli olabilir.

Son yıllarda DMT'nin zaman içindeki etkisinin değerlendirilmesinde “hiçbir hastalık aktivitesi kanıtı yok” (NEDA) ve varyantları artan bir önem kazanmıştır. NEDA, düzenli EDSS değerlendirmelerini MRG ve relapslarla birleştirerek değerlendirme sağlar. Başlangıçta  değişkenden oluşuyordu (NEDA-3): klinik nüks olmaması, 12 hafta boyunca devam eden doğrulanmış EDSS progresyonu olmaması ve yeni veya genişleyen T2 lezyonu veya kontrast tutulumu olmaması. Ayrıca beyin atrofisine dayalı dördüncü bir değişken, inflamasyonu ve nörodejenerasyonu değerlendiren NEDA-4 terimini ortaya çıkardı. Nörofilament hafif zincir gibi beyin omurilik sıvısı veya serum belirteçleri, olası bir NEDA-5'te nörodejenerasyonu değerlendirmek için de kullanılabilir.

EDSS eksik yönleri ile eleştirilse de halen en yaygın kullanılan değerlendirme leğidir. Teletıpın gelişmesi ve ölçeklerin eksik görülen alanlarda iyileştirilmesi ile yeni değerlendirme leklerinin geliştirilme çabaları devam etmektedir. (53)

1.2.Çinko Metabolizması

Vücutta demirden sonra en yaygın ikinci besin maddesi olan inko (Zn), vücuttaki proteinlerin %10'unun bağlandığı bir mikro besindir. Çinko vücutta Zn^{+2} olarak serbest halde bulunur ancak çeşitli yapılara bağlanarak bu yapılara görevlerini yerine getirmelerini sağlayacak nitelikler kazandırır. DNA polimeraz ve RNA polimeraz dahil olmak üzere toplam 7200 enzim , TFIIIA, GATA6 ve DM gibi birçok parmak proteini ve insan prolaktin (hPRL) ve büyüme hormonu (gGH) gibi çok sayıda hormon işlevlerine devam etmek için çinkoyu bağlar. Çinko ayrıca nöromodülatör ve nörotransmitter kapasitelerinde de işlev görür. Presinaptik alandan salındığında, nöronlarda postsinaptik alanda etki

eder. Bu nedenle çinko, öğrenme ve hafıza ile de bağlantılıdır. Sinir sistemi ile ilgili olarak çinko eksikliği öğrenme bozukluğuna, hafıza kaybına ve depresyona yol açar. Çinko, bağışıklık sistemi üzerindeki önemli etkilerini ortaya çıkarır. Çinko eksikliği, T hücrelerinin yüzdesinde ve natürel killer (NK) hücrelerinin litik aktivitesinde bir azalmaya neden olur. ZIP14 KO farelerinde (ZIP14 geni baskılanmış) IL-6 seviyesinin önemli ölçüde düştüğü gösterilmiştir. Çinko taşıyıcı proteinlerin iki ailesi vardır: ZIP ve ZnT. ZIP protein ailesi, çinkoyu hücre dışı alandan ve hücre içi bölmelerden sitozole taşır. ZnT ise çinkoyu sitozolden hücre içi bölümlere ve hücre dışı alana taşır. Çinko, canlılar için bir mikro besindir ve hücrenin canlılığında rol oynar. Organizma için ne kadar önemli olursa olsun, çinko hücrede fazla bulunduğunda toksik etkiler yaratır. Bu toksik etkilerin gelişmesini önlemek için çinko ya hücreden atılır ya da hücre içindeki çeşitli keseciklerde depolanır ya da belirli proteinlerle birleştirilir ve toksik etkileri ortadan kaldırılır. Bu proteinler metallothioneinler olarak bilinir.

Çinko içeren akson terminalleri tüm telensefalon üzerinde bulunur. Beyindeki çinko konsantrasyonu 10 nM ile 10 µM arasında değişmektedir. Çinko, özellikle neokorteks, hipokampus, striatum ve amigdalada bol miktarda bulunur. Hipokampus ve amigdala beraber çalışarak duygusal hafızanın oluşumuna hizmet eder. Çinko, presinaptik alandaki veziküllere ZnT3 aracılığıyla taşınır ve bir sinyalle sinaptik alana aktarılır. Aktarılan çinko miktarı, sinyalin derecesine ve frekansına bağlıdır. Çinko salınımı, sodyuma bağlı bir aksiyon potansiyeli ve hücre dışı kalsiyum varlığında gerçekleşir. Sinaptik olarak salınan çinko, hipokampusun CA3 bölgesinin postsinaptik alanındaki çinkoya duyarlı reseptörleri seçici olarak aktive eder. Çinkoya duyarlı reseptörlerin aktivasyonu, hücre dışı regülasyon kinaz ve kalsiyum/kalmodulin kinaz II'nin fosforilasyonunu ve ayrıca kalsiyumun hücre içi salınımını indükler. Postsinaptik nöronlarda çinko, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, kalsiyum geçirgen AMPA/kainat reseptörleri ve voltaja bağlı kalsiyum kanalları yoluyla taşınabilir.

Veziküler çinko içeren nöronlar glutamaterjik, glisinerjik veya γ-aminobütirik asit (GABA)-erjiktir. Veziküler çinko içeren GABA-erjik nöronlar omurilik ve beyincikte bulunur; veziküler çinko içeren glisinerjik nöronlar büyük ölçüde omurilikte bulunur. Veziküler çinko içeren glutamaterjik nöronlara çinkoerjik

nöronlar da denir. Talamus, beyin sapı veya omuriliğin sinirsel innervasyonu çinkoerjik değildir, kortikokortikal, kortikolimbik veya limbik-kortikal nöronlar çoğunlukla çinkoerjiktir. Çinkonun bilişle ilişkisi iki şekilde açıklanır: Çinkoerjik nöronlardaki çinko ve glutamat, presinaptik veziküllerden sinaptik alana birlikte hareket ettirildikten sonra, glutamat postsinaptik sinirdeki kanalı açar ve çinko, kognisyona hizmet etmek üzere açılan kanal aracılığıyla postsinaptik alana girer. Çinkoerjik olmayan nöronlarda veziküllerden sinapsa sadece glutamat taşınır ve postsinaptik alana giderek kanalları açar. Daha önce sinaptik boşlukta bulunan çinko, postsinaptik alana girer ve bilişin gelişiminde rol oynar.

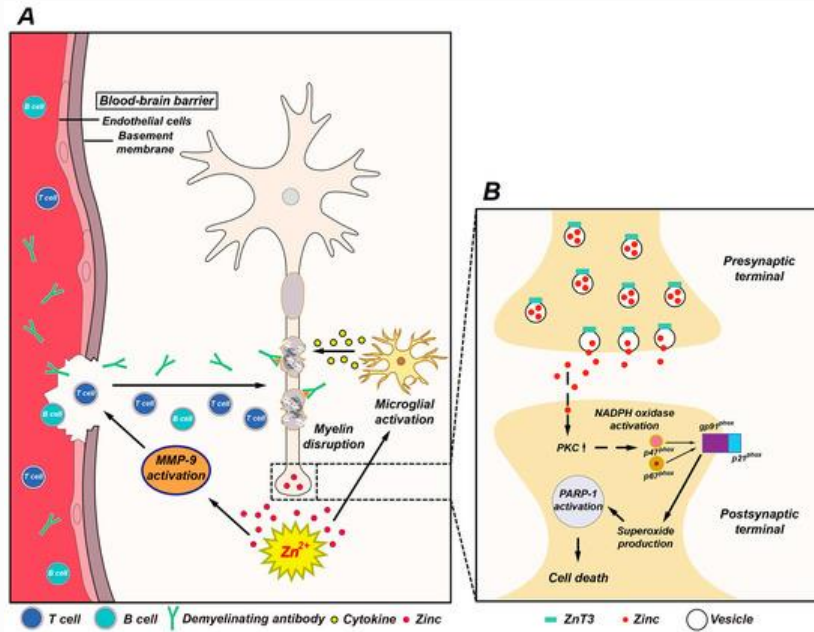
Çinko, oksidan üretimi ve metallerin neden olduğu oksidatif stresin düzenlenmesinde görev yapar. Çinko içeren moleküllerden biri nitrik oksit sentaz (NOS)'dır. NOS yapısındaki çinko sepsis, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon ve ateroskleroz sırasında üretilen peroksinitrit (ONOO^-) tarafından salınır ve bu da süperoksit anyonlarında artışa neden olur. Hücre dışı çinkodaki azalma, NMDA reseptörünün aktivasyonu yoluyla nöronal oksidanlarda bir artışa yol açar, bu da kalsiyum emilimine ve protein kinaz C/NADPH oksidaz ve NOS'un kalsiyuma bağımlı aktivasyonuna neden olur. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofin (NT)-4/5, NADPH oksidasyon seviyesini yükseltir. NADPH oksidaz inhibitörü, 4-(2-aminoetil) benzensülfonil florür (AEBSF), serbest oksijen radikallerindeki artışı azaltır. Sonuç olarak, NADPH oksidaz, serbest oksijen türlerindeki artışa aracılık eder. Sadece çinkodaki azalma değil, aşırı artış da reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve hücre içi çinko birbiriyle ilişkilidir. ROS, çinko bağlayıcı proteinlerin oksidasyonunu kolaylaştırır ve sitoplazmik bölmelerde çinko salınımına neden olur, sitoplazmada fazladan çinko artışı ise ROS'un yükselmesine neden olur. ZnO nanoparçacıklarının lizozomların asidik bölmesindeki kararsızlığı nedeniyle nanoparçacıklardan Zn^+ iyonlarının salınması da ROS oluşumunu artırır. Bu şekilde, etki kademeli olarak artar.

Çinko eksikliğinde bağışıklık sistemi bozuklukları gelişir. Çinko homeostazının bozulması, lenfositlerin yetersiz gelişimi, aktivasyonu ve olgunlaşması, artmış inflamasyon riski ve hatta ölümle sonuçlanır. Zn eksikliği, hem doğal hem de adaptif bağışıklıkta yer alan hücrelerin hayatta kalma, çoğalma ve

olgunlaşma seviyelerini de etkiler. Bu hücreler monositleri, polimorfonükleer, doğal öldürücü, T ve B hücrelerini içerir. T hücresi işlevleri ve farklı T yardımcı hücre alt kümeleri arasındaki denge, Zn durumundaki değişikliklere özellikle duyarlıdır. Akut Zn eksikliği doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklığın azalmasına neden olurken, kronik eksiklik inflamasyonu artırır. Çinko bir antioksidandır ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir. İnflamatuar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ateroskleroz, yaşlanma, kanser ve diğer kronik hastalıklarla ilişkilidir. Çinko takviyesinin etkileri ise hücreye özgüdür. Çinko eksikliği olan hücrelerle karşılaştırıldığında, HL-60 hücrelerine çinko takviyesi, A20 ve A20 tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 1 kompleksini arttırdığı ve IKK- α /NF- κ B sinyal yolunu, oksidatif stres belirteçlerini, inflammatuar sitokinleri ve malondialdehiti azalttığı gösterilmiştir. Bir sitoplazmik çinko parmak proteini A20, nükleer faktör (NF-KB) aktivitesini ve TNF'ün aracılık ettiği programlanmış hücre ölümünü inhibe eder. A20, TNF- α ve IL-1 β 'nin down regülasyonuna katkıda bulunur. TNF- α tarafından indüklenen apoptozu inhibe etmek için A20'nin cIAP1/2'ye (hücrel apoptoz inhibitörü) ihtiyacı vardır. A20'nin cIAP1/2'ye bağlanması için yedinci çinko parmak proteini gereklidir. In vitro çalışmalar çinkonun NF- κ B aktivasyonunu ve TNF- α ve IL-1 β gibi hedef genlerini azalttığını ve anti-inflamatuar özelliklere sahip iki çinko parmak proteini olan A20 ve PPAR-a'nın gen ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Yüksek çinko konsantrasyonu (100 μ M), IL-1 tarafından uyarılan IL-1 reseptör kinaz (IRAK) aktivasyonunu inhibe ederken, düşük çinko seviyesi T hücre fonksiyonunun bozulmasına yol açar. IL-2 ile indüklenen ERK sinyali ve T hücrelerinin proliferasyonu için sitoplazmik serbest çinko artışı gereklidir. HUT-78 (T helper O (ThO) hücre hattı) hücrelerinde çinko eksikliği, NF- κ B'nin aktivasyonunun azalması nedeniyle interlökin-2 ve interlökin-2 reseptörü a'nın gen ekspresyonunda bir düşüşe yol açar. HUT-78 hücrelerinde çinko eksikliğinin neden olduğu azaltılmış NF-KB aktivasyonu (aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir geliştiricisi), NF-KB'nin DNA'ya bağlanmasının azalmasından, NF-KB mRNA'sındaki düşüşten, κ B inhibitör proteininin fosforilasyonunun azalmasından ve IKK'nın azalmasından kaynaklanmıştır. (54)

1.2.1.Çinkonun MS'de Olası Yeri

Anormal veziküler çinko salınımı ve hücre içi çinko birikimi, matris metalopeptidaz-9 (MMP-9) aktivasyonu, KBB bozulması ve ardından periferik sistemlerden immün hücre infiltrasyonu gibi EAE patofizyolojik sürecinin birkaç adımına aracılık edebilir. Bir çinko şelatörünün oral yoldan verilmesi, KBB bozulmasını, immün hücre infiltrasyonunu ve spinal beyaz cevher miyelin yıkımını azaltmıştır. Bu nedenle, MS ilerlemesi sırasında hücre dışı boşluğa salınan çinkonun, omurilik beyaz maddesindeki miyelin kılıfının tahrip edilmesinde ve motor kusurların oluşmasında rol oynadığı varsayılmaktadır. (55) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Çinkonun multipl skleroz (MS) patogenezi ile olası ilişkisi. (A) Bu şematik çizim çinkonun MS patogenezi etkileyebileceği birkaç yolu göstermektedir. Salınan çinko, matris metalopeptidaz-9'a (MMP-9) bağımlı kan-beyin bariyeri (KBB) bozulmasını indükleyebilir. Bu durum, hücre dışı matris makro moleküllerini bozarak otoreaktif bağışıklık hücrelerinin ve demiyelinizan antikörlerin göçünü daha da artırabilir. Ek olarak, salınan çinko mikrogliya'yı aktive edebilir ve ardından aktive mikrogliya tarafından salınan proinflamatuvar sitokinler miyelin kılıfına zarar verir. (B) MS'de çinko kaynaklı nöronal hasarın mekanizması. Sinaptik olarak salınan çinkonun sitoplazmik akışı, protein kinaz C'yi (PKC), NADPH oksidazları ve süperoksit üreten enzimi uyarır. Süperoksit üretimi, çekirdekte poli(ADP-riboz) polimeraz-1'i (PARP-1) aktive ederek hücre ölümüne yol açar. (56)

Yapılan bir çalışmada çinko yokluğunun EAE'nin neden olduğu beyaz cevher hasarı ve motor eksiklikleri üzerinde koruyucu etkiler gösterip göstermediğini test etmek için ZnT3 KO fareleri ile bir çinko şelatör olan clioquinol (CQ) kullanılmış. ZnT3 gen silinmesi veya CQ tedavisinin, EAE'nin günlük klinik skorunu büyük ölçüde azalttığı gözlenmiştir. EAE'nin klinik seyrinde ZnT3 gen delesyonu veya CQ aracılı inhibisyon, omurilikte inflamasyonun ve demiyelinizasyonun azalması ile sonuçlanmıştır. EAE ile ilişkili motor defisite eşlik eden nöropatolojik değişiklikler, ZnT3 KO veya CQ ile tedavi edilen farelerde daha az şiddetli olarak gözlenmiştir. Motor defisitteki bu azalmaya, omurilikte başkalaşım kümesi (CD4+ T hücreleri, CD8+ T hücreleri, CD20+ B hücreleri) ve F4/80+ mikrogliya hücreleri dahil olmak üzere demiyelinizasyon ve ensefalitojenik bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunda azalma eşlik etmiştir. Bu sonuçlar, ZnT3 gen silinmesinin, EAE ile ilişkili klinik özellikleri ve nöropatolojik değişiklikleri engellediğini göstermektedir. ZnT3 gen delesyonu veya CQ tedavisi ayrıca EAE ile ilişkili anormal sinaptik çinko yamalarının oluşumunu, MMP-9 aktivasyonunu ve KBB bozulmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. (56)

Hücre içi çinko salınımı, MS'in ana patolojik özelliği olan demiyelinizasyona yol açan birincil oligodendrosit ölümünde rol oynayabilir. Oligodendrositler, MSS'de miyelin kılıflarını oluşturan bir glia türüdür ve MS lezyonlarında hasarlandığı bulunmuştur. (57) Oligodendrositler duyarlıdır ve bu nedenle oksidatif strese karşı savunmasızdır. Oligodendrosit zarında AMPA/kainat ve NMDA reseptörleri bulunur. Özellikle, bir GluR2 alt birimi olmayan AMPA reseptörleri, Ca^{2+} akışına karşı dayanıksız olmaları nedeniyle, oligodendrositlerin glutamat eksitotoksitesine karşı duyarlılığına katkıda bulunur. (58) Birkaç kanıt dizisi, MS'de oligodendrogliya ölümüne yol açan olası bir olay olarak hücre içi çinko salınımının rolü olabileceğini öne sürmüştür. Mato ve arkadaşları hücre içi çinko salınımının, oligodendrositlerde glutamat ile indüklenen eksitotoksik hasarın önemli bir aracısı olduğunu bildirdi. (59) AMPA reseptör aktivasyonuna bağlı olarak postsinaptik nöronda Ca^{2+} birikiminin, hücre içi çinko salınımını indüklediği gösterilmiştir. (60) Ayrıca, Zn^{2+} 'nın salındığı hücre içi kaynak oligodendrositlerde de nöronlardakiyle aynı olduğu tanımlandı: mitokondri ve metalloprotein (MT). Zn^{2+} 'nın bu nedenle mitokondriyal depolarizasyon ve ROS üretimini indüklediği, ardından MAPK yolu ve nihayetinde PARP-1 apoptotik yol gibi aşağı

akışlı biyokimyasal kaskadları izlediği rapor edilmiştir. (61) Sonuç olarak çinkonun, oksidatif stres ve PARP-1 aracılı hücre ölümünü indükleyerek AMPA aracılı oligodendrosit ölümüne katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. Ek olarak, birkaç kanıt dizisi, hücre içi çinko salınımının aracılık ettiği peroksinitrit toksisitesinin, MS'de oligodendroglia ölümüne aracılık eden başka bir aday olduğunu öne sürdü. (56) Peroksinitrit, nitrik oksit (NO) ve süperoksidin reaksiyonu ile üretilir. Nitrik oksit ve peroksinitritin MS üzerindeki klinik önemi, indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) artan ekspresyonu olarak öne sürülmüştür ve bu, MS lezyonlarında gösterilmiştir. (62) MS hastalarının, peroksinitrit oluşumunu gösteren belirteçler olan iNOS ve nitrotirozin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. (63) Peroksinitritin MT ve mitokondri gibi hücre içi depolardan çinko saldığı ve çinkonun sırayla hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2), 12-lipoksijenaz (12-LOX) ve ROS üretimini aktive ederek oligodendroglia ölümüne yol açtığı raporlanmıştır. Oligodendrositlerde peroksinitrit kaynaklı toksite, çinko şelatör TPEN (N, N, N', N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamin) tedavi edildiğinde hafiflemiştir, bu da çinkonun mekanizmasında önemli bir faktör olduğunu gösterir. (64) . Peroksinitrit toksisitesinin ayrıca PKC'nin aracılık ettiği rapor edilmiştir. PKC'nin çinko kaynaklı nörotoksositeye aracılık etmesi çinko kaynaklı oligodendroglia ölümünün yolunu da aydınlatılabilir. (65)

1.2.2.ZnT3 Protein

Özel çinko taşıma proteinleri insanlarda iki aileden oluşur. Birincisi 14 üyeli Zrt, Irt-benzeri protein (ZIP) ailesi olup, büyük oranda çinkonun sitozole alınmasında yer alır. Diğeri ise 10 üyesi bulunan çinko taşıyıcı (ZnT) protein ailesidir. ZnT proteinleri, sitozolik çinkonun hücre dışına veya hücre içi bölmelere ekstrüde edilmesinden sorumludur. Hücreden çinkonun ekstrüde edilmesi, genel olarak eksprese edilen ZnT1'in işlevidir. Bu protein normal hücresel fonksiyon için hayati önem taşır; kaybı embriyonik ölümle sonuçlanır. Beyinde ZnT1, postsinaptik zarlarda yoğunlaşır, burada NMDA reseptörlerinin GluN2A alt birimine bağlanır ve dentritik omurga boyutunu etkiler. Çinkonun hücre içi bölmelere taşınması, diğer ZnT'ler tarafından sağlanmaktadır. Örnekler arasında çinkoyu endozomlara, lizozomlara ve salgı keseciklerine taşıyan ZnT2, ZnT3 ve ZnT4 ve çinkoyu Golgi aygıtına ve trans- Golgi ağına taşıyan ZnT5, ZnT6 ve ZnT7 sayılabilir. 1990'ların

ortasından sonuna kadar Richard Palmiter ve arkadaşları veziküler çinko havuzunun sorumluluğunun Znt3'e bağlı olduğunu göstermiştir. Kromozom 5 üzerinde bulunan fare ZnT3 geni (insanlarda kromozom 2), başlangıçta sıçan ZnT2 ile homologisi sayesinde tanımlanmıştır. Tanımlandıktan ve klonlandıktan sonra, beyinde ve testislerde ZnT3 mRNA tespit edildi. (66) ZnT3 protein ekspresyonunun en yoğun alanı hipokampal yosunsu liflerdir. ZnT3, aynı zamanda serbest çinko içeren berrak yuvarlak sinaptik veziküllerin zarlarında bulunan yosunsu liflerin akson terminallerine lokalizedir. Veziküler çinkonun ZnT3'ün işleviyle ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğuna dair son kanıt, çinkoyu depolamak için farklı bir mekanizmaya dayanan koroid pleksus dışında, ZnT3 KO farelerinin beyinlerinde histokimyasal olarak reaktif çinko bulunmadığının gösterilmesiydi. (67) Veziküler çinkonun eliminasyonu ve dolayısıyla aktiviteye bağlı çinko salınımı, ZnT3 KO fareleri veziküler çinkonun sinyal rollerini incelemek için yararlı bir araç haline getirmiştir. Son birkaç yılda, yeni araçların geliştirilmesi ve daha sonra ZnT3 KO farelerine uygulanması, Znt3'e bağımlı veziküler çinko salınımının çeşitli reseptörler yoluyla nöronal fonksiyonu etkileyebileceğine dair düşünceleri desteklemektedir. Çinko dishomeostazı, hücre ölümü ve nörodejenerasyonuna nasıl katkıda bulunabileceği üzerine çok fazla araştırma yapılmış olsa da ZnT3 fonksiyonunun bozulmasının veya çinko sinyallemesinin nörodejeneratif bozukluklarda rol oynadığına dair çok az veri bulunmaktadır. (68) Multipl sklerozun bir fare modelinde , ZnT3 KO farelerde daha iyi motor fonksiyon, daha az demiyelinizasyon, azalmış KBB bozulması ve omuriliğe daha az immün hücre infiltrasyonu gösterilmiştir. Çinko veya ZnT3 eksikliği, retina veya optik sinir hasarını takiben hücre ölümüne karşı da koruyucudur. (69) Veziküler çinko salınımı ayrıca, normal koşullar altında zararlı olmasa da, beyin hasarının ardından sıklığı artan ve muhtemelen nöronal hasara katkıda bulunan bir nöronal ve glial depolarizasyon dalgası olan yayılan depresyon fenomeninde yer almıştır. Oksijen-glikoz yoksunluğu, yayılan depresyonun ortaya çıkmasıyla çakışan hücre dışı çinko konsantrasyonunda bir artışa yol açar, ancak bu artış ZnT3 KO farelerinde gözlenmez. (70) Hücre içi çinko birikiminin nöronal hasara katkıda bulunması mümkündür, ancak çinko birikiminin iskemik ön koşullanmaya katkıda bulunarak yararlı etkileri olabilir. (71)

1.2.3.ZnT4 Protein

Çinko taşıyıcı protein ailesi hücre içi çinko seviyelerinin sabit kalmasında görev almaktadır. Znt4 protein de bu görevde yer alan bir çinko taşıyıcı proteindir. Znt4 Znt2 ile beraber sitozolik çinkonun organellere taşınımında görev almaktadır. Znt3 ve Znt4 protein özellikle MSS'de hücre içi çinkonun düzenlenmesinde görev almaktadırlar. (72) Birkaç miRNA'nın, beyin endotel hücrelerinde kanalları ve taşıyıcıları hedefleyerek KBB bütünlüğünü düzenlediği gösterilmiştir. miRNA-30a, endotel hücrelerinde hücre içi serbest çinkonun azalmasına ve iskemik inmenin hem hücresel hem de hayvan modellerinde KBB geçirgenliğinde bir artışa yol açan çinko taşıyıcı ZnT4'ü hedeflediği bildirilmiştir. (73) Znt4 protein ile ilgili özellikle nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı için yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. ZnT-4, lizozomal/endozomal bölmelerde lokalizedir ve artan protein seviyeleri, Zn konsantrasyonlarının artmasına neden olabilir ve bu da A β agregasyonunun indüklenmesine yol açabilir. A β 'nin agregasyonu, lizozomal membran bütünlüğünün kaybına yol açabilir, bu da aktif hidrolitik enzimlerin sitozol içine salınmasına yol açabilir ve apoptozu indükleyebilir. Yapılan çalışmada yaş uyumlu kontrollerle karşılaştırıldığında, EAE'de ZnT-4 ve ZnT-6'da önemli bir artış olduğu görülmektedir. (74)

1.2.4.Çinko Parmak Proteinleri

NRIF (nörotropin reseptörü etkileşim faktörü), nörotrofin reseptörü p75(NTR) ile etkileşime giren Krüppel ailesinin tüm hücrelerde eksprese edilen bir çinko parmak proteindir. (75) Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile multipl skleroz (MS) araştırması için yapılan bir çalışmada Kromozom 19 üzerinde genom çapında anlamlı bir bağlantı sinyali belirlenmiş. Bu bağlantı bölgesindeki çoğu gen, 32 genin transkripsiyonel düzenleyiciler olduğu öne sürülen çinko parmak (ZNF) proteinleri olarak tanınmıştır. Bu bölgedeki yedi gen (ZNF134, ZNF135, ZNF154, ZNF549, ZNF606, ZNF671 ve ZSCAN1), ZNF genlerinin Krüppel ailesine aittir. Bu bölgede sadece birkaç ZNF geni bilinen omurgalı homologlarına sahiptir ve bir dizi primat spesifik KRAB-ZNF genini içerir. İnsanlarda KRAB-ZNF genleri yaklaşık 400'dür ve tipik olarak düşük seviyelerde eksprese edilen ve hücreye özgü susturmada ve farklı hücre soylarını yönlendirmede rol oynayan en büyük C2H2 transkripsiyon faktörleri grubunu oluşturur Histon modifikasyonu ve DNA

metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar, çinko parmak genleri dahil olmak üzere birçok spesifik transkripsiyon faktörünün susturulmasından sorumludur. ZNF274 ayrıca p75NTR ile etkileşime girer ve gelişim sırasında programlanmış hücre ölümünde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Bu alandaki genlerin bir kısmı, daha önceki kök hücrelere kıyasla farklılaşmış insan nöral hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edilir (ZNF549, ZNF324, ZNF548, ZNF264, ZNF671, ZSCAN1 ve ZSCAN18 , A kümesinin üyeleridir.) ZNF genlerinin ekspresyonu, fetal beyinde yaygın olarak saptanır ve bunların sinir sisteminin gelişiminde rol oynadığı tahmin edilir, kromozom 8 üzerindeki bir KRAB çinko parmak kümesinin de MSS gelişiminin düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür. Yukarıda bahsedildiği gibi, bu bölgedeki C2H2 çinko parmak genlerinin çoğu, miyelinasyon için gerekli genlerin susturulmasıyla tutarlı bir profile sahiptir. Bu genlerin demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonda ve ayrıca MSS gelişim durumlarında birlikte düzenlenip düzenlenmediğini incelemek için daha fazla analiz yapılması gerekir. Ne yazık ki, birçok KRAB-ZNF geninin türe özgüllüğü ve bu bölgede genlerin kemirgen homologlarının bulunmaması nedeniyle, insan dışı demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon modellerinden elde edilen veriler yararlı olmayabilir. (76) Reseptör tirozin kinaz (RTK)'lerin nörotrofin reseptör ailesi, sırasıyla sinir büyüme faktörüne (NGF), BDNF'e ve nörotrofin3'e (NT3) yanıt veren tirozin kinaz A, B ve C (TrkA, TrkB ve TrkC) reseptörlerini içerir. Öncelikle sinir sistemlerinde proliferatif ve migrasyon etkileri ile ilişkilidirler. Olgun nörotrofinler TrkA, TrkB ve TrkC yoluyla nöroprotektif roller sergilerken, nörotrofinlerin pro-formları, NTR (p75 nörotrofin reseptörü)-sortilin sinyalleşme kaskadlarını tetikleyerek nöronların apoptotik hücre ölümünü indükleyebilen tamamen farklı biyolojik etkiler gösterir. NGF reseptörü, bir p75NTR ve bir TrkA alt birimini kapsar. Apoptozdan TrkA aracılı kurtarma, MAPK aktivasyonu ile ilişkilidir. Eşzamanlı olarak, oligodendrositlerde TrkA'nın aktivasyonu, p75 tarafından başlatılan c-jun kinaz aktivitesinin baskılanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu nedenle TrkA aracılı kurtarma, yalnızca hayatta kalma sinyallerinin aktivasyonunu değil, aynı zamanda bir ölüm sinyalinin p75 tarafından eşzamanlı olarak bastırılmasını da içerir. Bir hayvan çalışmasında, kronik aktif MS lezyonlarının kenarında, seçici NGFRp75'in reaktif astrositlerde belirgin olduğunu, lezyon boyunca NGFRp75'in mikrogliya/makrofajlarda eksprese edildiğini ve olgun veya öncü oligodendrositlerin büyük çoğunluğunun NGFRp75'i eksprese etmediğini gösterilmiştir. Sonuç olarak, aktif MS lezyonlarında NGF reseptörlerinin

ekspresyonu, hem immün hem de glial hücre seviyelerinde otoimmün yanıtı düzenlemede NGF için kritik bir role işaret etmektedir. (77)

ZF proteinlerinin NZF/MyT ailesi, küçük ama kritik derecede önemli bir protein ailesidir. ZF'ler. Üç üye tanımlanmıştır: Miyelin transkripsiyon faktörü 1 (MyT1 veya NZF2), nöral çinko parmak faktörü-1 (NZF-1 veya MyT1 benzeri veya png-1) ve tümörjenisite 18 (ST18 veya NZF-3). Bu proteinler birden fazla ZF içerir. NZF-1'den farklı olarak, MyT1 ağırlıklı olarak miyelin oluşturan PLP ekspresyonunu aktive ettiği oligodendrositlerde bulunur. *Xenopus leavis*'te MyT1'in hem retinal hem de nöral farklılaşmada gerekli olduğu gösterilmiştir. Nöronlarda, MyT1, bir baskılayıcı olarak hareket ederek büyümeyi destekler. Spesifik olarak, MyT1, transkripsiyonu kontrol etmek için histonların lizinlerini demetile eden Lisine özgü demetilaz 1 (LSD1), LSD1 ile birlikte baskılayıcı olarak görev yapan CoREST ve Histon Deasetilaz 1/2 (HDAC1/2) ile bir kompleksin parçasıdır. 6 histonun lizinlerini deasetilleyerek transkripsiyonu kontrol eder. Bu kompleks, hücre proliferasyonunu azaltmaktan sorumlu bir protein olan Pten'in ekspresyonunu negatif olarak düzenler. Bu negatif düzenleme, Pten'in etkisini ortadan kaldırır ve nöronal büyümeyi artırır. PLP, oligodendrositlerde biriktikçe, MyT1, muhtemelen aktivitesini söndürmek için bir araç olarak sitoplazmaya taşınır ve bu proteinin seviyeleri sonunda tespit edilemez hale gelir. Sitoplazmada mevcut olduğunda, NZF-1 ve MyT1, muhtemelen bu proteinleri inaktif hale getirmek için sitoplazmada tutan plazma membran proteini Lingo-1 ile etkileşime girebilir. Son zamanlarda, Lingo-1 ekspresyonu, potansiyel olarak MyT1 aktivitesini zararlı bir şekilde düzenleyerek miyelinasyonun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. MyT1'in up-regülasyonu, remiyelinizasyon ile ilişkili multipl skleroz lezyonlarının olduğu alanlarda gözlemlenmiştir. (78)

1.3. MS Hastalarında Remiyelinizasyon Süreci

MSS'de gelişimsel miyelinasyon, OPC'lerden türetilen oligodendrositler tarafından gerçekleştirilir. OPC'ler yetişkinlerde kalıcıdır ve tüm MSS hücrelerinin %5-8'ini oluşturur. Soy takipli deneysel modeller, demiyelinizasyondan sonra, OPC'lerden üretilen yeni oluşturulmuş oligodendrositler tarafından yeni miyelinin sentezlendiğini, hücre bölünmesine ihtiyaç duymadan kılavuz ipuçlarıyla lezyon bölgesine çekilebildiğini belirlemiştir. Çalışmalar, nöral kök hücrelerden progenitörler tarafından remiyelinizasyonun, OPC'lerden türetilenlerden daha kalın

ve daha işlevsel olan miyelin kılıfları ürettiğini ileri sürmüştür. Demiyelinizasyonun hayvan modellerinde remiyelinizasyonun var olduğuna dair kanıtlar tartışılmaz olsa da, insanlarda sürecin tanımlanması hayvan modellerinden daha karmaşıktır. İnsan ölüm sonrası beyinde varsayılan remiyelinli lezyonlar, Luxol hızlı mavi histolojik boyalarda daha soluk, gölge plakları olarak sağlıklı beyaz cevherden ayırt edilebilen daha ince miyelin kılıflarının varlığına göre tanımlanır. Remiyelinizasyonla ilgili mekanizmalar hakkındaki bilgilerimiz çoğunlukla , demiyelinizan lezyonların genellikle bir miyelinotoksik ajan (lizofosfatidilkolin veya etidyum bromür) tarafından indüklendiği ve cuprizon modelinde olduğu gibi odak demiyelinizasyon alanları veya daha yaygın miyelin değişikliği ile sonuçlanan deneysel çalışmalardan elde edilir. Klasik remiyelinizasyon mekanizması çoğunlukla OPC proliferasyonu, artan motilite, migrasyon ve güçlendirme, oligodendrositlere olgunlaşma ve son olarak miyelinin kaplanması ile gelişmeyi yeniden özetlemektedir. Başarılı remiyelinizasyonun ön koşullarından biri, geri dönüşümsüz hasarı olmayan aksonların varlığıdır. Diğerleri ise yeterli sayıda remiyelinizan hücredir. Multipl sklerozdaki demiyelinize lezyonlar, oligodendroglial içeriklerine göre önemli ölçüde farklılık gösterirken, olgunlaşmamış oligodendrositler içeren bazı lezyonlar belki de miyelin oluşumuna giremez veya henüz katılmazken, diğerleri neredeyse oligodendroglial kök hücrelerinden yoksundur. Bu nedenle başarılı remiyelinizasyon elde etmek için gereken adımlar lezyon tipine bağlı olarak farklılık gösterebilir. OPC olgunlaşma sürecini destekleyen veya engelleyen ipuçlarının ve yolların belirlenmesinde de büyük ilerleme kaydedilmiştir. OPC olgunlaşmasının inhibitörleri arasında Notch sinyal yolu, LINGO-1, Wnt yolu, muskarinik reseptör sinyali, hyaluronan, kondroitin sülfat, proteoglikan ve fibrinojen bulunmaktadır. Mekano-responsif iyon kanalı Piezo1, OPC'lerin yaşa bağlı fonksiyon kaybında potansiyel bir rolü olan bir olgunlaşma inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Buna karşılık, OPC'lerde retinoid X reseptörünün γ aktivasyonu, tiroid hormonu ve D vitamini gibi faktörler oligodendroglial olgunlaşmayı destekler . Farklı mikroRNA'ların ekspresyonunun, oligodendroglial olgunlaşma sürecini düzenlediği gösterilmiştir. (79)

1.3.1.NOGO-A Ve NOGO Reseptör (Ngr)

Son zamanlarda, Nogo aksonal rejenerasyon için miyelinle ilişkili bir inhibitör olarak tanımlanmıştır. Nogo geni, alternatif ekleme ve promotör kullanımı

ile türetilen Nogo-A, -B ve -C adlı üç farklı izoformu kodlar. Bunların tümü, retikülön protein ailesinin üyelerine homolog olan C-terminal bölgesinde, Nogo-66 adlı iki farazi transmembran alanı arasında yer alan 66 amino asit kalıntısından oluşan küçük bir segmenti paylaşır. En büyük izoform olan Nogo-A, ağırlıklı olarak oligodendrositlerde ve en içteki aksonal ve en dıştaki miyelin membranlarında yer alan süreçleri üzerinde eksprese edilir. Nogo-A, nöronal büyümeyi inhibe edici aktivitelere sahip en az iki ayrı bölgeye sahiptir: biri, nörit büyümesini kısıtlayan 544-725 amino asitlerini kapsayan Nogo-A'ya özgü bölgede bulunur; diğeri, Nogo-66, büyüme konisi çökmesini indüklemek kapasitesine sahiptir. Nogo-66 bir glikoprotein olan yüksek afiniteli bir reseptör NgR'ye bağlanır. Nogo-A'nın aksine, NgR, oligodendrositlerde tanımlanmaz, ancak yapısal olarak bir nöron alt kümesinde ve serebral kortikal piramidal nöronlar ve serebellar Purkinje hücreleri de dahil olmak üzere aksonlarında eksprese edilir. NgR'nin aracılık ettiğı sinyal transdüksiyonu, aynı zamanda Trk nörotrofin reseptörleri ailesi için bir koreseptör görevi gören düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü p75^{NTR} ile ilişkisine bağlıdır. Son çalışmalar, sadece Nogo-66'nın değil, aynı zamanda miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) ve oligodendrosit-miyelin glikoprotein (OMgp) NgR'ye bağlandığını ve RhoA'yı aktive ederek ve Rac1'i inhibe ederek NTR yoluyla nörit büyümesini inhibe edici sinyalleri ilettiğini göstermiştir. Anti-Nogo-A antikorlarının, NgR rekabetçi antagonistik peptitleri veya NgR'yi nötralize ederek, NgR ve ligandları arasındaki etkileşimin in vivo blokajı, uzun mesafeli aksonal rejenerasyonu, telafi edici filizlenmeyi ve büyüme ile ilişkili genlerin up-regülasyonunu indüklediğı, buna MSS'de hasardan sonra fonksiyonel iyileşmenin artmasının eşlik ettiğı gösterilmiştir. Bir çalışmada, relapsing remitting MS hastalarının serum ve beyin omurilik sıvısında anti-Nogo-A otoantikorunu tanımlanarak, kalıcı demiyelinizasyon ve aksonal hasara karşı koruyucu bir yanıt olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, Nogo-A, MAG ve OMgp'nin MS'in demiyelinizan lezyonlarının bölgesinde aksonal rejenerasyona müdahale etmede aktif bir rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir. Önceki çalışmalar, yetişkin kemirgen MSS'ndeki Nogo-A'nın aksonal plastisiteyi düzenlediğini ve anormal lif bağlantılarının oluşumunu önlemek için ana miyelinli yolları stabilize ettiğini ileri sürmüştür. MSS'nin gelişimi ve olgunlaşmasında Nogo-A'nın fizyolojik bir fonksiyonunu araştırmak için, Nogo-A nakavt farelerle yapılan bir çalışmada beklenmedik bir şekilde, bu farelerin tümü ne belirgin nöroanatomik kusurlar ne de

nörolojik semptomlar göstermiştir; bu, Nogo-A'nın en azından hasar yokluğunda aksonal yolların gelişimi ve bakımı için çok önemli olmadığını göstermektedir. Omurilik yaralanmasının ardından, bazı Nogo-A eksikliği olan fareler, kortikospinal yol liflerinin aksonal rejenerasyonunda artış göstermiştir. Önemli olarak, bir MS hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelitten etkilenen Nogo-A eksikliği olan farelerde inflamatuvar demiyelinizasyon ve aksonal hasar daha az şiddetli olarak gösterilmiş. Ayrıca, NgR-eksikliği olan fareler, beyinde iskemik inmeden sonra gelişmiş bir aksonal plastisite sergilemiştir ve buna, gelişmiş fonksiyonel iyileşme eşlik etmiştir. Bu gözlemler, Nogo-A ve NgR etkileşiminin, MSS'deki patolojik koşullar altında aksonal rejenerasyonun inhibisyonunda merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. (80)

1.4. MS Hastaları Ve miRNA Ekspresyonları

MikroRNA'lar (miRNA'lar), düzenleyici işlevlere sahip küçük (~ 22 bp) RNA fragmanlarıdır. Son zamanlarda, MS ve onun hayvan modellerinde miRNA ekspresyonu hakkında yeni bilgiler ortaya çıkarılmış ve bu miRNA'ların işlevleri tanımlanmıştır. Tüm memeli genlerinin üçte birinden fazlasının ifadesi miRNA'lar tarafından düzenlenebilir ve bu nedenle terapötik hedefler olarak hizmet edebilirler. (81)

Son birkaç yılda, sayısız miRNA nöronal gelişim, farklılaşma ve nörodejenerasyonda anahtar düzenleyiciler olarak tanımlanmıştır bu nedenle bunların nörojenез veya nörodejenerasyondaki rolleri göz önünde bulundurulmalıdır. Mikrodizi analizini kullanan yeni bir çalışma, miRNA-300 ve miRNA-450b-5p dahil olmak üzere MS'nin arkasındaki düzenleyici mekanizmalara katkıda bulunan 18 miRNA'nın düzensizliğini ortaya çıkarmıştır.

1.4.1.miRNA 300

Aslında, miRNA-300'ün nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi hakkında şu anda çok az şey bilinmektedir. Bir çalışmada tüm MS hastalarında, özellikle SPMS hastalarında miRNA-300'ün önemli ölçüde down-regülasyonu gözlenmiştir ancak MS alt gruplarında miRNA-300 seviyelerindeki değişimin klinik progresyonu yansıtmadığı sonucuna erişilmiştir. Aynı çalışmada miRNA-450b-5p'nin, SPMS

hastalarında RRMS hastalarına kıyasla daha düşük ekspresyon gösterdiği ve tüm MS hastalarında önemli ölçüde down-regüle edildiğini göstermiştir.

ROCK2, aksonal dejenerasyon ve nöronal ölümün hayati bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmada ayrıca, SPMS hastalarında RRMS hastalarına göre daha belirgin bir artış ile tüm MS hastalarında belirgin bir yükselme ortaya koyan farklı MS dönemlerinde serum ROCK2 izoformu düzeyleri gösterilmiştir. RhoA-ROCK yolunun aktivasyonu, nöritin yönlü büyümesini engelleyerek nörit geri çekilmesine ve büyüme konisi çökmesine aracılık edebilir. (82)

1.4.2.miRNA 450b-5p

Yakın tarihli bir mikrodizi analizi, sınıflandırılmamış MS hastalarında miRNA-450b-5p'nin down-regülasyonunu göstermiştir. Yazarlar, miRNA-450b-5p'nin, hastalığın relapsing-remiting fazında, onu nöron farklılaşması, nöron projeksiyon gelişimi ve nöroenezin pozitif düzenlenmesini içeren nöroloji ile ilgili farklı gen ontolojisi terimlerine bağlayarak özellikle önemli olabileceğini öne sürdüler. (83) Bu varsayım, RRMS hastalarında SPMS hastalarından daha yüksek gözlemlenen miRNA-450b-5p ekspresyonu ile uyumludur. RRMS hastalarına kıyasla SPMS hastalarında remiyelinizasyonun çoğunlukla başarısız olduğu bilinmektedir. (84)

Çalışmada, miRNA 300 ve 450b-5p'den farklı olarak, ROCK2 seviyesi hastalık süresi ve EDSS ile pozitif korelasyon gösterirken, her iki miRNA da hastalık süresi ve EDSS ile negatif korelasyon göstermiştir. Bu bulgular, ROCK2 ve miRNA-300 seviyelerindeki değişikliğin MS ilerlemesi ve ciddiyeti ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir. miRNA-450b-5p ile hastalık süresi arasındaki negatif korelasyon, MS'in relapsing-remiting fazında miRNA-450b-5p'nin varsayılan rolü ile uyumlu düşünülmüştür. Bulgular, ROCK2'nin MS progresyonu için iyi bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini, buna karşın her iki miRNA'nın da hastalık ilerlemesi için çok iyi biyobelirteçler olduğunu ve miRNA-450b-5p'nin SPMS hastalarını ayırt etmek için en güçlü prognostik biyobelirteç olduğunu göstermiştir. (82)

1.5.Sestrin

Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD), amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve MS gibi birkaç farklı nörodejeneratif hastalığın (NDD'ler) patogeneğinde önemli bir rol oynar. Özellikle, son araştırmalar, oksidatif stres, inflamasyon, proteostaz bozukluğu, mitokondriyal disfonksiyon ve diğer nörodejeneratif olaylar arasındaki çeşitli etkileşim biçimlerinin, nörodejeneratif hastalıkların başlangıcında veya ilerlemesi sırasında meydana geldiğini göstermektedir. Bu bağlamda, hücre, organizma ve hayvan modellerindeki bulgular ve ayrıca insanlarda biyobelirteç çalışmaları, nörodejeneratif süreçlerde redoks durum düzenlemesi ile nöroproteksiyon arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, antioksidan özelliklere sahip nöroprotektif moleküller, NDD'ler için terapötik ve önleyici müdahaleler açısından artan bir ilgi görmüştür.

NDD'lerdeki birçok çalışmanın sestrin2 (SESN2)'ye odaklandığı, ancak sestrin1 ve sestrin3 dahil olmak üzere diğer sestrinlerin sinir sistemindeki rollerine ilişkin bilgilerin hala sınırlı olduğunu bildirilmiştir. Özellikle, SESN2'nin otofajiyi veya daha spesifik olarak mitofajiyi arttırmak için mTOR'u düzenleyerek oksidatif strese dolaylı olarak karşı koyabileceğini vurgulanmıştır. SESN2'nin, agregre proteinleri uzaklaştırmak için dolaylı antioksidan aktivite ve otofaji teşviki açısından çoklu biyolojik işlevi, AD, PD, HD ve ALS gibi yanlış katlanmış protein toksisitesinin neden olduğu NDD'lerin tedavisi için yeni fırsatlar sunacağı düşünülmektedir. (85) SESN2 proteinin MS de antioksidan mekanizmaya katkısının ve potansiyel terapötik hedef olabilirliği açısından yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.6.Klotho Protein

Klotho, Kuro-o ve arkadaşları tarafından bir transgenik fare üretirken yanlışlıkla keşfedilen bir yaşlanma karşıtı proteindir. (86) Her ikisi de esas olarak böbreklerde ve beyinde üretilen ve salgılanan iki Klotho formu vardır. Klotho'nun BOS'da salgılanan formu beyin koroid pleksusunda üretilirken, serumda salgılanan Klotho ise esas olarak böbrekler tarafından üretilip kan dolaşımına salınmaktadır. Klotho'nun transmembran formu, FGF23 olarak adlandırılan fibroblast büyüme faktörü (FGF) süper ailesinin bir üyesi ile birlikte kalsiyum, fosfat ve D vitamini

metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar. Öte yandan, önceki çalışmalar, Klotho'nun salgılanan formunun oksidatif stresin modülasyonunda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, son araştırmalar Klotho'nun OPC'leri ayırt etme yeteneği ile bir büyüme faktörü olarak hareket edebileceğini ortaya koymuştur. Günümüzde Klotho, kronik böbrek hastalığı ve nörolojik bozukluklar, özellikle Alzheimer ve MS gibi bazı karmaşık ve multifaktöriyel bozukluklar için terapötik hedef olarak kabul edilmektedir. (87) Bir çalışmada RRMS'li hastaların BOS'unda salgılanan Klotho formunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı gösterilmiş. (88) Aynı çalışma ekibinin diğer bir çalışmasında ise RRMS vakalarında özellikle uzun süreli hastalarda serum Klotho konsantrasyonunun daha yüksek olma eğiliminde olduğu bulunmuş. Bu bulgunun, MS hastalarının immünomodülatör ilaçlarla tedavisine veya MSS rejenerasyonunu ve/veya D vitamini biyosentezini arttırmaya yönelik telafi edici bir yanıtla bağlı olabileceği düşünülmüştür. Birkaç çalışma, MS patogenezinde katkıda bulunan ana faktörler olarak oksidatif stres ve inflamatuvar koşulların Klotho ekspresyonunu azaltabildiğini göstermiştir. Öte yandan, önceki çalışmalar Klotho ekspresyonunun bazı geleneksel ilaçlarla artırılabilceğini göstermiştir. Buna göre, immünomodülatör ilaçlarla tedavi gören kronik MS hastalarında Klotho konsantrasyonunun artması beklenebilir. (87) Başka bir çalışmada hemodiyaliz hastalarında D vitamini takviyesinin serum Klotho konsantrasyonunu azalttığını bulmuşlardır. Bu çalışma, MS hastalığı olan bireylerde yaygın bir anormallik olan D vitamini eksikliği/yetersizliği nedeniyle MS hastalarında serum Klotho konsantrasyonunun artabileceği hipotezini desteklemektedir. (89) Ek olarak, son çalışmalar Klotho'nun salgılanan formunun sinir hücreleri ve oligodendrositler için rejeneratif bir büyüme faktörü olarak hareket edebildiğini ortaya koymuştur. (90) Bu gerçeğe göre, kronik MS hastalığında daha uzun süreli bir etki ile rejeneratif yolların aktif hale getirilmesi bu nedenle telafi edici bir mekanizma olarak serum Klotho konsantrasyonunda bir artış görmek mantıklı olabilir. (87) Başka bir çalışmada cuprizon ile demiyelinizasyon modeli oluşturulan klotho'nun transmembran formunu aşırı eksprese eden transgenik fareler (KL-OE) ile vahşi tip fareler karşılaştırılmış ve KL-OE farelerde remiyelinizasyon seviyesinin 2 kat arttığı gösterilmiş. Bu nedenle, Klotho ekspresyonunun arttırılması, multipl sklerozlu bireylerin beyinlerinde remiyelinizasyonun arttırılması için bir tedavi hedefi olarak düşünülebilir. (91)

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneysel aşamaları Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (SÜDAM), analiz aşamaları ise Selçuk Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Fizyoloji Laboratuvarında yapıldı. Çalışma etiği 2021-17 karar sayısı ile SÜDAM deney hayvanları etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

2.1.Deney Hayvanları

Deneyde 46 adet wistar cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar SÜDAM'dan temin edildi. Hayvanlar sürekli negatif basınçlı havalandırma sistemi ve sabit oda sıcaklığının (22-25 °C) bulunduğu bir ortamda 12 saat ışık altında 12 saat karanlıkta olacak şekilde izlendi. Sirkadiyen ritmi bozmamak için tüm çalışmalar 09.00-13.00 saatlerinde yapıldı. Sıçanlar kafeslere 5'erli gruplar halinde ayrıldı. Kontrol grubunda 6 sıçan bulunuyordu. Hayvanların beslenmelerinde çinko eksik yem ve standart sıçan yemi kullanıldı. Çinko eksik yem Arden Araştırma ve Deney (Ankara) Firmasına hazırlanmış olup yemdeki kontrol edilemeyen çinko oranı 50 µg/kg düzeyindeydi.

2.2.Cuprizon İle MS Modelinin Oluşturulması

Literatürde sıçanlarda MS oluşturmak için çeşitli cuprizon dozları önerilmektedir. Cuprizon uygulaması hayvanların standart yemine % 0.5, %1, %2 oranlarında karıştırılmak suretiyle yapılmaktadır (92). Bu çalışmada MS oluşturmak için ortalama doz olan %1 cuprizon uygulaması tercih edildi. Kullanılan cuprizon Sigma Aldrich firmasından [Bis(cyclohexanone) oxaldihydrazone (Supelco-14690)] temin edildi. Cuprizon uygulaması cuprizonun hayvanların günlük yemine karıştırmak yerine ağızdan gavajla vermek suretiyle gerçekleştirildi. Cuprizon dozu sıçanların günlük ortalama yem tüketimleri baz alınarak hesaplandı. Sıçanların 300 gram ağırlığı başına 20 g yem tüketmelerinden yola çıkılarak günlük yem tüketim miktarının %1'ine karşılık gelen miktarda cuprizon ağızdan gavajla verildi. (Hayvanların canlı ağırlık başına günlük yem tüketimleri yaklaşık 66 ± 6 gr/kg olarak hesaplanmıştır). Bunun % 1'i olan $0,66 \pm 6$ gr/kg cuprizon miktarı hayvanların canlı ağırlık başına günlük cuprizon dozuna karşılık gelmektedir. Cuprizon daha önceden hazırlanmış olan %1 lik dolgu maddesi Karboksi-metil-selüloz (KMS) çözeltisi içerisinde hazırlandıktan sonra ağızdan gavajla her gün, her

gruba aynı oran ve sürelerde uygulandı. KMS saf su ile %1'lik derişimde hazırlandıktan sonra +4 °C de muhafaza edildi. KMS stok solüsyonu haftalık olarak hazırlandı ve KMS-cuprizon karışımı ise gavaj uygulamasından hemen önce hazırlanıp uygulama yapıldı. Cuprizon KMS ile herhangi bir tepkimeye girmeyen bir maddedir ve KMS içinde cuprizon ilave edildikten sonra vortekste karıştırılarak homojen bir KMS-cuprizon süspansiyonu elde edildi. Gavaj yapılacak hayvanların kilosunda %10 ve üzeri düşüş olduğunda normal aralıkta kiloya ulaşılan kadar cuprizon uygulamasına ara verilmesi planlandı.

2.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Grup 1: Kontrol: (n:6) Bu grubu oluşturan sıçanlar bir kafeste 8 hafta boyunca standart yem ile beslendi. Düzenli bir şekilde ağırlık takipleri yapıldı.

Grup 2: Sham-Multipl Skleroz: (n:10) Bu grubu oluşturan sıçanlar 5'erli gruplar halinde iki kafeste izlendi. Cuprizon'nun içinde çözöldüğü Karboksi-metil-seluloz (KMS) çözeltisi (saf su ile %1'lik derişimde hazırlanan) günlük yem tüketiminin %1 ($0,66 \pm 6$ gr/kg)'i oranında 8 hafta boyunca günlük olarak gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın bitimine kadar hayvanlar standart yem ile beslendi. Düzenli bir şekilde ağırlık takipleri yapıldı.

Grup 3: Multipl Skleroz: (n:10) Bu grubu oluşturan sıçanlar 5'erli gruplar halinde iki kafeste izlendi. 8 hafta boyunca günlük yem tüketiminin %1 ($0,66 \pm 6$ gr/kg)'i oranında cuprizon, saf su ile %1'lik derişimde hazırlandıktan sonra KMS solüsyonu içerisinde gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın bitimine kadar hayvanlar standart yem ile beslendi. Düzenli bir şekilde ağırlık takipleri yapıldı.

Grup 4: Multipl Skleroz - Çinko Eksik Diyet: (n:10) Bu grubu oluşturan sıçanlar 5'erli gruplar halinde iki kafeste izlendi. 8 hafta boyunca günlük yem tüketiminin %1 ($0,66 \pm 6$ gr/kg)'i oranında cuprizon, saf su ile %1'lik derişimde hazırlandıktan sonra KMS solüsyonu içerisinde gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın bitimine kadar hayvanlar çinko eksik (50 µg/kg çinko) diyetle beslendi. Düzenli bir şekilde ağırlık takipleri yapıldı.

Grup 5: Multipl Skleroz - Çinko takviyesi: (n:10) Bu grubu oluşturan sıçanlar 5'erli gruplar halinde iki kafeste izlendi. 8 hafta boyunca günlük yem tüketiminin %1 ($0,66 \pm 6$ gr/kg)'i oranında cuprizon, saf su ile %1'lik derişimde hazırlandıktan sonra

KMS solusyonu içerisinde gavaj yoluyla verildi. Bu gruptaki hayvanlara çalışmanın bitimine kadar günlük intraperitoneal (i.p.) çinko sülfat (5 mg/kg/gün) takviyesi verildi. Düzenli bir şekilde ağırlık takipleri yapıldı.

2.4.Rotarod Performans Testi Uygulaması

Bu çalışmada, motor koordinasyon ve dengeyi değerlendirmek için otomatik hızlanan May rotarod cihazı (Commat Ltd, Ankara/Türkiye) kullanıldı. Aparat, kavrama sağlamak için uygun şekilde işlenmiş 7 cm çapında, 30 cm yüksekliğinde bir merdane ve merdaneyi döndürmek için bir güç kaynağından oluşmaktadır. Beş dairesel ayırıcı, çubuğu eşit büyüklükteki 4 bölmeye (her biri 7 cm uzunluğunda) ayırmaktadır. Sıçanlara değerlendirme gününden 3 gün önce rotarod cihazını keşfetmeleri ve alışmaları için alıştırmaya eğitimleri verildi. Her gün öncelikle dakikada 4 dönüşle (rpm) başlanarak ve maksimum 20 rpm olacak şekilde hızlandırılarak deneme başına maksimum 300 sn olacak şekilde cihaz üzerinde kalmalarına izin verildi. Erken düşmeleri halinde maksimum 3 kez tekrar cihaza yerleştirildiler ve her seferinde hızlandırma 4 rpm olarak başlatıldı. Her hayvanın 3 kez başarısız olmasına izin verildi. Başarılı olanların 300 sn tamamlamasının ardından alıştırmaya denemeleri sonlandırıldı. Alıştırma denemelerinden sonra 4. güne denk gelen aynı zamanda cuprizon uygulamasının son gününde hayvanların rotarod performansları kaydedildi. 4 rpm den başlayan hızla hayvanların maksimum ulaşabildiği rpm değeri süreye bakılmaksızın kaydedildi.

2.5. Sıçanların Sakrifikasyonu Ve Dokuların Alınması

8 hafta boyunca günlük olarak takip edilen ve uygulamaları tamamlanan hayvanlar son gün uygulamalarından 24 saat sonra ketamin (75mg/kg) ve xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında sakrifiye edildiler. Sakrifikasyon sonrası sıçanların beyinleri hızla çıkarıldı ve kuru buz üzerinde donduruldu. Dondurulan beyin dokusu epandorf tüplere alındı ve örnekler çalışılncaya kadar -80 °C de muhafaza edildi.

2.6.Corpus Callosum Dokusundan RNA İzolasyonu

ZNT3, ZNT4, SESN2, KLOTHO, NZF2B, NOGOA ve NOGO reseptör genlerinin Real-Time-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle ifadesinin

belirlenmesi için hazır ticari kit (Bio Basic; Kanada) kullanılarak total RNA izole edildi.

Her bir hayvana ait doku 1 ml lizis tamponu (miRNAExtractor) içerisinde homojenizatör (SONOPULSmini20, BANDELİN; Almanya) yardımıyla parçalandı ve oda sıcaklığında 5-10 dk kadar bekletildi. Ardından 30 saniye süre ile karıştırıcıda karıştırılarak homojenat üzerine 0.2 ml kloroform eklendi. Bu işlemin ardından 4 °C'de 10 dakika boyunca 12.000×g'de santrifüj edildi. Santrifüjleme sonunda süpernatant temiz bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 1.5 hacimde %100 etanol ilave edildi ve pipetleyerek iyice karıştırması sağlandı. Elde edilen çözelti TRNA Spin Kolonuna alınarak 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonun aşağısına akan sıvı atıldı. Üzerine 0,5 ml RPE Solüsyonu eklendi, 30 saniye boyunca 12,000×g'de santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez tekrar edildi. Ardından yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne kolon yerleştirildi. Üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika süre ile bekletildi. Ardından 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA'ların nanodrop (SMA 1000, Merinton,China) cihazı ile miktarı ve saflığını belirlendi. OD260/280 oranı 1.9 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

miRNA-300-5p ve miRNA-450b-5p genlerinin eldesi için her bir hayvana ait doku 1 ml lizis tamponu (miRNAExtractor) içerisinde homojenizatör (SONOPULSmini20, BANDELİN; Almanya) yardımıyla parçalandı ve oda sıcaklığında 5-10 dk kadar bekletildi. Ardından 30 saniye süre ile karıştırıcıda karıştırılarak homojenat üzerine 0.2 ml kloroform eklendi. Bu işlemin ardından 4 °C'de 10 dakika boyunca 12.000×g'de santrifüj edildi. Santrifüjleme sonunda süpernatant temiz bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 1.5 hacimde %100 etanol ilave edildi ve pipetleyerek iyice karıştırması sağlandı. miRNA Spin Kolonuna alınarak 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonun aşağısına akan sıvı atıldı. Üzerine 0,5 ml RPE Solüsyonu eklendi, 30 saniye boyunca 12,000×g'de santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez tekrar edildi. Ardından yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne kolon yerleştirildi. Üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika süre ile bekletildi. Ardından 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA'ların nanodrop (SMA 1000, Merinton,China) cihazı ile miktarı ve saflığını belirlendi. OD260/280 oranı 1.9 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

2.7.cDNA'ların Elde Edilmesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için iScript cDNA sentez kit (BioRad; ABD) kullanıldı ve her bir örnekten eşit miktarda RNA kullanılarak karışım hazırlandı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan karışım

Bileşim	Miktar
Total RNA	1 µg
5X iScript Reaksiyon karışımı	4 µl
iScript reverse transkriptaz	1 µl
RNAse içermeyen su	2,5 µl

Her bir tüp dikkatlice karıştırıldıktan sonra Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazı ile revers transkripsiyon programı çalıştırıldı. Bu program öncelikle 25°C'de 5 dakika, ardından 46°C'de 20 dakika ve 95°C'de 1 dakika, son olarak +4°C'de bekleme basamağını içermektedir.

Elde edilen cDNA nanodrop (SMA 1000, Merinton, China) cihazı ile miktarı ve saflığını belirlendi. OD260/280 oranı 1.8 civarında olanlar çalışmada kullanıldı. Daha sonra Real time PCR gerçekleştirene kadar -20°C'de saklandı.

2.8.Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Real-Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir uygulama yapılmayan (Kontrol grubu) dokulardan elde edilen cDNA örneğinden 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı. Real-Time PCR gerçekleştirilerek standart eğriler çizildi. Ayrıca primerin

uygun sıcaklıkta bağlanabilmesi için sıcaklık aralıkları denenerek standardizyon yapıldı.

Hedef genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primerler üretici firmada (Oligomer, Türkiye) sentezi yaptırılarak elde edildi. Çalışmada kullanılan primerlerden her bir reaksiyonda yaklaşık 50 ng olacak şekilde kullanıldı (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi (5'-3')	Fonksiyonu
ZNT3 ileri	ACCACCTTCCTCTTCTCTATCT	Hedef gen
ZNT3 geri	TCCCTTACAGGCTCAAATTCC	Hedef gen
ZNT4 ileri	CTGACCTTAGTGCCATCATACTC	Hedef gen
ZNT4 geri	CAGAACCTCTAGGCGATGAAAT	Hedef gen
SESN2 ileri	TAGCCTACAGCCTCACCTATAA	Hedef gen
SESN2 geri	CCAAAGACGCAGTGGATGTA	Hedef gen
KLOTHO ileri	GGCGACTACCCAAAGAGTATG	Hedef gen
KLOTHO geri	CCGAAGGAGAGAGCAAAGAAG	Hedef gen
NZF2b/7ZFMyt1 ileri	GCAGACCTCAGTTGTCCTACC	Hedef gen
NZF2b/7ZFMyt1geri	CTTGGATAACCAGGTGCTCAG	Hedef gen
NOGOA ileri	TCAAAGGTGACTGAGGCAGC	Hedef gen
NOGOA geri	ACTGGGCTGCACTACAGA	Hedef gen
NOGO RESEPTÖR ileri	ATCTTCCTGCACGGCAACCGAAT	Hedef gen
NOGO RESEPTÖR geri	AGAGGTTGTTGGCAAACAGGTAG	Hedef gen
MBP ileri	CTTCAAAGACAGGCCCTCAG	Hedef gen
MBP geri	CCTGTCACCGCTAAAGAAGC	Hedef gen
GAPDH ileri	GGGCCAAAAGGGTCATCATC	Referans gen
GAPDH geri	AACCTGGTCCTCAGTGTAGC	Referans gen
miRNA-300-5p Universal Primer	MP-r00213 (ABM; Applied Biological Materials, Kanada)	Hedef gen
miRNA-450b-5p Universal Primer	MPR00705 (ABM; Applied Biological Materials, Kanada)	Hedef gen
U6-2 Universal Primer	MPH00001 (ABM; Applied Biological Materials, Kanada)	Referans gen

PCR reaksiyonları için hazır ticari kit (FastStart Essential DNA Green Master, İsviçre) kullanıldı. Reaksiyonlar toplamda 20 µl hacimde uygulandı. Reaksiyon içeriği 10 µl Master mix karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 1 µl

cDNA, 1 µl ileri ve 1 µl geri primerler (10 pmol/µl) ve 7 µl RNase içermeyen su şeklinde hazırlandı.

Primerlerin optimizasyonu sonrası PCR şartları; ilk denatürasyon, 95°C’de 10 dakika, denatürasyon 95°C’de 10 saniye, bağlanma 60°C’de 10 saniye ve polimerizasyon 70°C’de 10 saniye olarak gerçekleştirildi ve döngü sayısı 45 olarak yapıldı. Melting curve analizi, 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 10 saniye, 95°C’de 10 saniye olmak üzere 1 döngü şeklinde yapıldı. Tüm reaksiyonlar CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazında gerçekleştirildi.

2.9.İstatiksel Analiz

qPCR analizi Livak ve Schmittgen (2001)’in geliştirmiş oldukları $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Bulguların istatistiksel açıdan yorumlanması SPSS 26.0 bilgisayar paket programı ile yapılmış, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla “Shapiro-Wilk” testi yapıldı ve verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. Gruplar arasındaki farkın tespitinde “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” testi, farklılıklarının hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için ise çoklu karşılaştırma testlerinden olan “Duncan” testi kullanıldı. $P<0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1.Hayvanlarında Deneysel MS Modelinin Gerçekleştirdiğini Belirlemek İçin Ölçümü Yapılan Parametreler

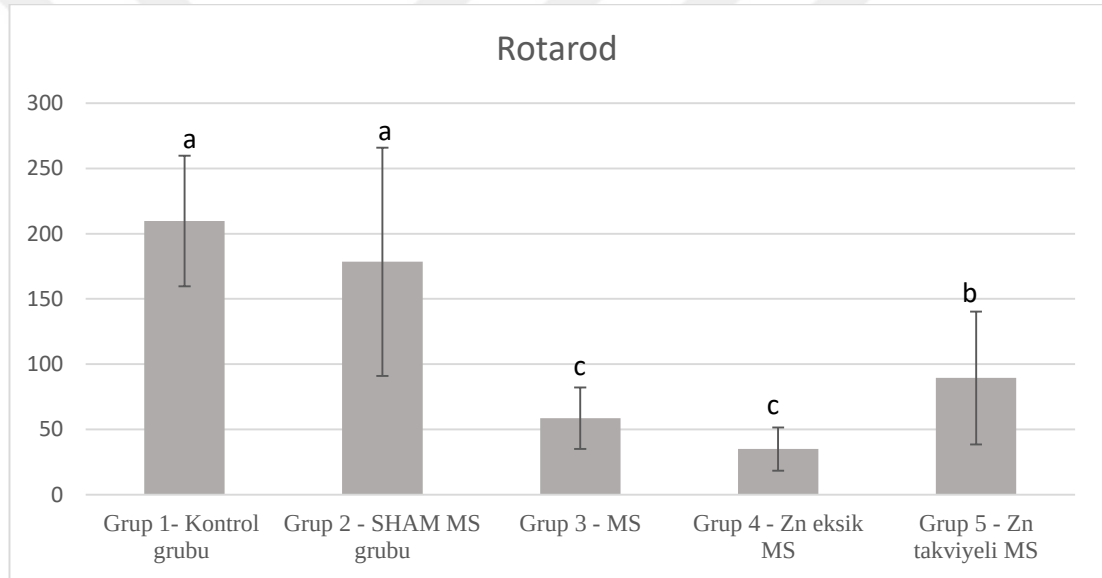
3.1.1.Rotarod Testi

Rotarod testi, farelerin hızlandırılmış çubuk üzerinde kalma ve koşma yeteneklerini ölçerek hayvanların motor koordinasyonunu ve öğrenme becerilerini araştırmak için kullanılan standart bir duyu-motor testidir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çubuk üzerine kalma süresi yönünden hayvanlar değerlendirildiğinde; MS (grup 3) ve çinko eksik diyetle beslenen MS grubundaki (grup 4) hayvanlar diğer gruplara oranla çubuk üzerinden daha kısa sürede düştüler ($p<0.05$). Çinko desteği alan MS grubundaki (grup 5) hayvanlar, standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu ile (grup 3) çinko eksik diyetle beslenen MS grubundaki (grup 4) hayvanlara oranla çubuk üzerine daha uzun süre kaldılar ($p<0.05$). Kontrol (grup 1) ve sham kontrol (grup 2) hayvanları diğer grupların tamamından daha uzun süre çubuk üzerinde kaldılar ($p<0.05$) (Tablo 3.1.1.).

Tablo 3.1.1. Rotarod performans testi bulguları

Gruplar	N	Rotarod ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	209,66±50,06a
Grup 2- Sham MS grubu	10	178,50±87,44a
Grup 3- MS	10	58,60±23,66c
Grup 4- Zn eksik MS	10	35,00±16,61c
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	89,40±50,83b

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.1.1. Rotarod performans testi bulguları

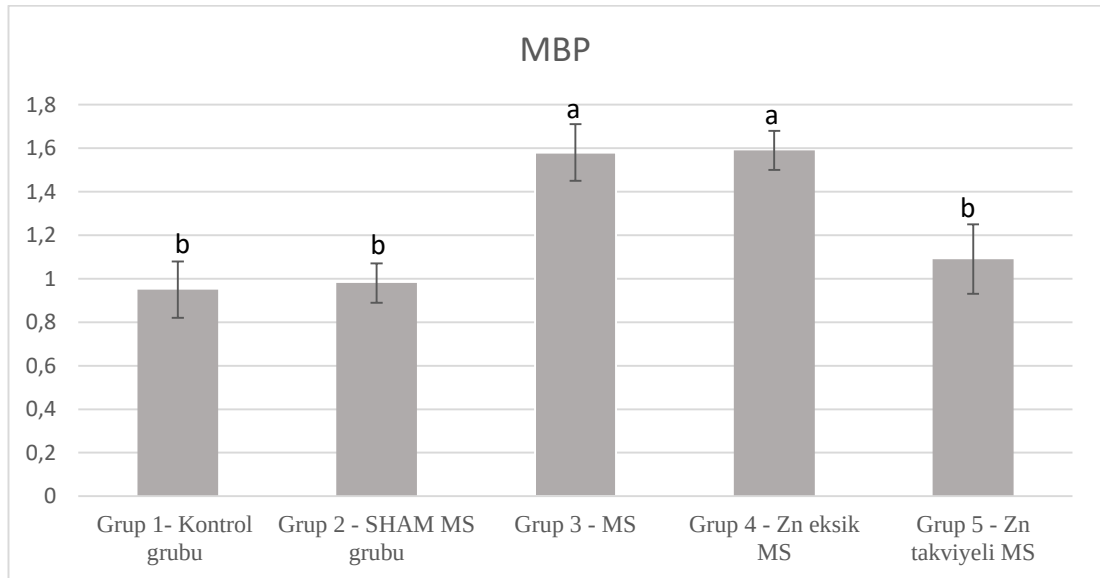
3.1.2.Miyelin Basic Protein Gen Ekspresyon Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada corpus callosum'daki en yüksek miyelin basic protein (MBP) gen ekspresyon düzeyleri standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3) ile çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($p<0.05$). Çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) miyelin basic protein gen ekspresyon düzeyleri grup 3 ve 4'den düşük ($p<0.05$), grup 1 (kontrol) ve grup 2 (Sham)'den farklı değildi (Tablo 3.1.2.).

Tablo 3.1.2. Miyelin basic protein gen ekspresyon bulguları

Gruplar	N	MBP ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	0,95±0,13b
Grup 2- Sham MS grubu	10	0,98±0,09b
Grup 3- MS	10	1,58±0,13a
Grup 4- Zn eksik MS	10	1,59±0,09a
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,09±0,16b

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.1.2. Miyelin basic protein gen ekspresyon düzeyi

3.2. Corpus Callosum Dokusundaki Nogo-A Ve NgR Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada corpus callosum'daki en yüksek Nogo A ve NgR gen ekspresyon düzeyi çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($p<0.05$). Standart sıçan yemiyle beslenen MS grubunun (grup 3) aynı parametresi grup 4'den düşük, diğer grupların tamamından yüksekti ($p<0.05$). Çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) Nogo A ve NgR gen ekspresyon düzeyi grup 1 (kontrol) ve grup 2 (Sham)'den farklı değildi (Tablo 3.2.1. ve Tablo 3.2.2.).

Tablo 3.2.1. Corpus callosum dokusundaki Nogo-A gen ekspresyon düzeyi

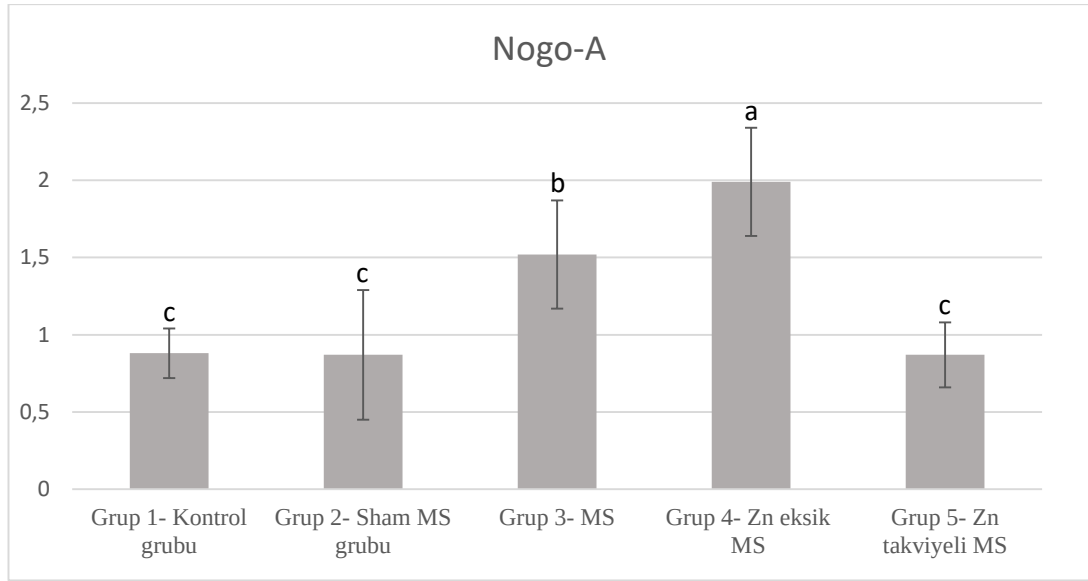
Gruplar	N	Nogo-A ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	0,88±0,16c
Grup 2- Sham MS grubu	10	0,87±0,42c
Grup 3- MS	10	1,52±0,35b
Grup 4- Zn eksik MS	10	1,99±0,35a
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	0,87±0,21c

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).

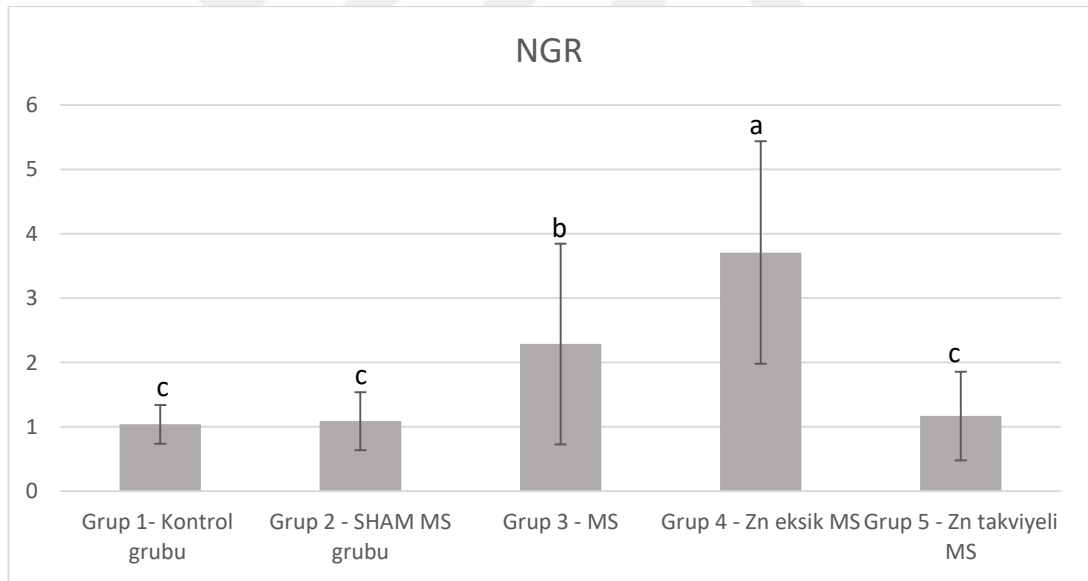
Tablo 3.2.2. Corpus callosum dokusundaki NgR gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	NgR ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,04±0,30c
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,09±0,45c
Grup 3- MS	10	2,29±1,56b
Grup 4- Zn eksik MS	10	3,71±1,73a
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,17±0,69c

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.2.1. Nogo-A'nın corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi



Şekil 3.2.2. NgR' nün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

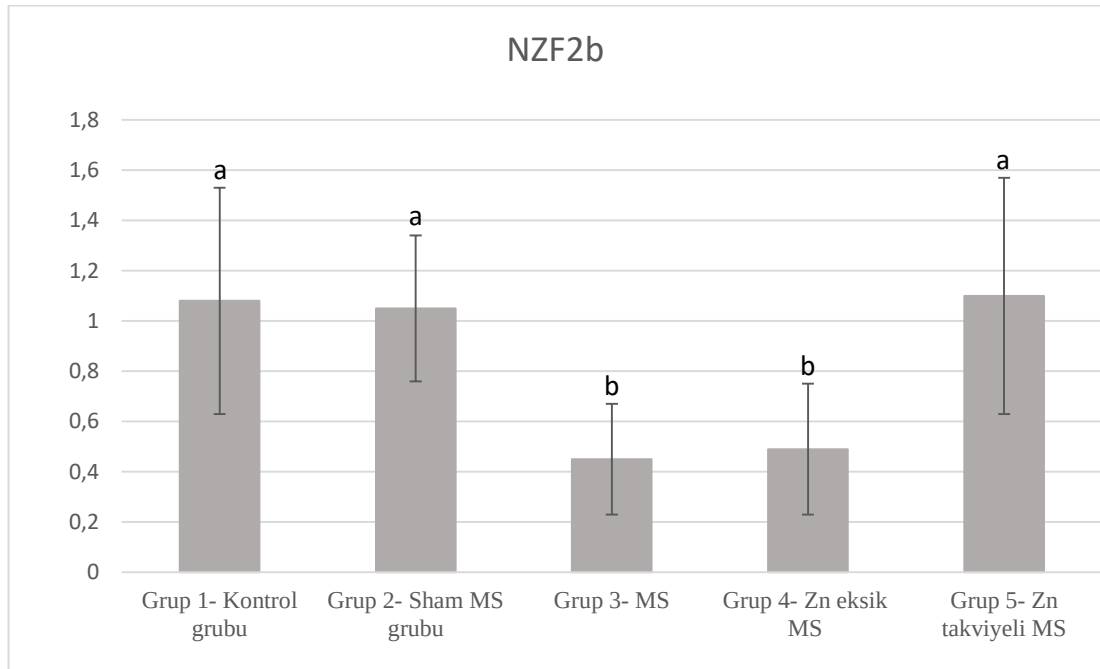
3.3. Corpus Callosum Dokusundaki NZF2b Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada bir çinko parmak proteini olan NZF2b gen ekspresyonunun corpus callosumdaki en düşük düzeyleri hem standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3), hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($p<0.05$). Çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) corpus callosumdaki NZF2b gen ekspresyon düzeyleri ile kontrol gruplarının (grup 1 ve 2) aynı değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Corpus callosum dokusundaki NZF2b gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	NZF2b ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,08±0,45a
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,05±0,29a
Grup 3- MS	10	0,45±0,22b
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,49±0,26b
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,10±0,47a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.3. NZF2b'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

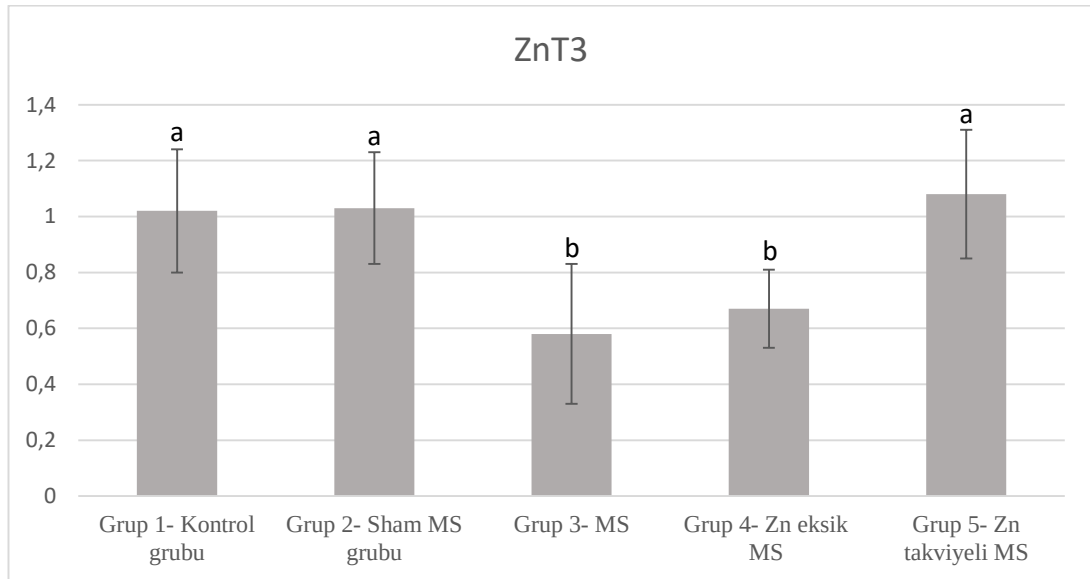
3.4. Corpus Callosum Dokusundaki ZnT3 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada bir çinko taşıyıcı protein olan ZnT3 gen ekspresyonunun corpus callosumdaki en düşük düzeyleri hem standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3), hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($p<0.05$). Çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) corpus callosumdaki ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri ile kontrol gruplarının (grup 1 ve 2) aynı değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Corpus callosum dokusundaki ZnT3 gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	ZnT3 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,02±0,22a
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,03±0,20a
Grup 3- MS	10	0,58±0,25b
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,67±0,14b
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,08±0,23a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.4. ZnT3'ün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

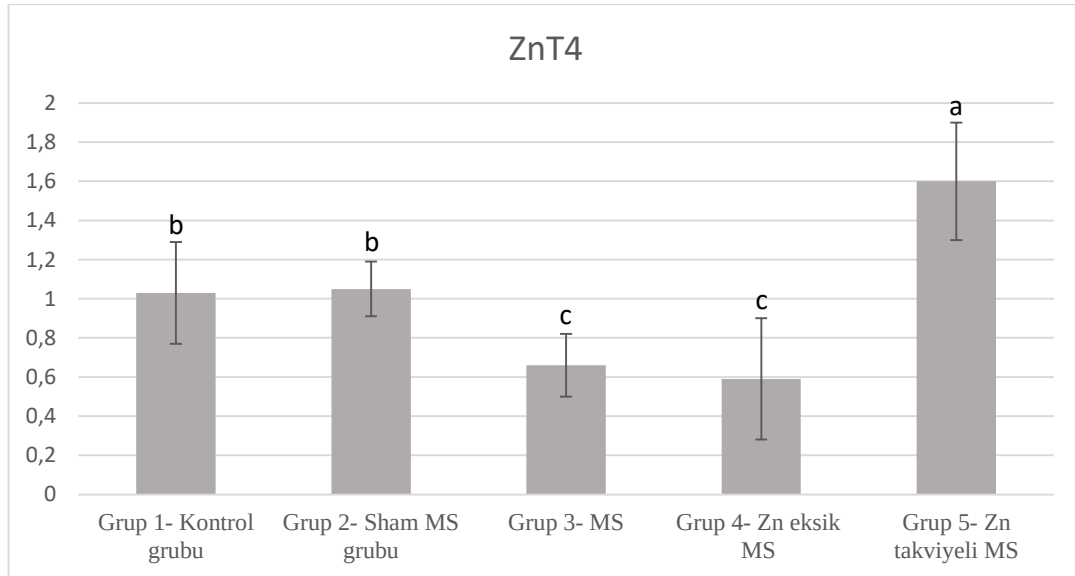
3.5. Corpus Callosum Dokusundaki ZnT4 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada bir çinko transport proteini olan ZnT4'ün corpus callosumdaki gen ekspresyonu mukayese edildiğinde en düşük ZnT4 gen ekspresyonu standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3) ile çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($p<0.05$). En yüksek ZnT4 gen ekspresyon düzeyi çinko desteği alan MS grubunda (grup 5) elde edildi ($p<0.05$). Kontrol gruplarının (grup 1 ve 2) aynı değerleri ise grup 3 ve 4'den yüksek, grup 5'den ise önemli şekilde düşüktü ($p<0.05$, Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Corpus callosum dokusundaki ZnT4 gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	ZnT4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,03±0,26 b
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,05±0,14 b
Grup 3- MS	10	0,66±0,16 c
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,59±0,31 c
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,60±0,30 a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.5. ZnT4'ün corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

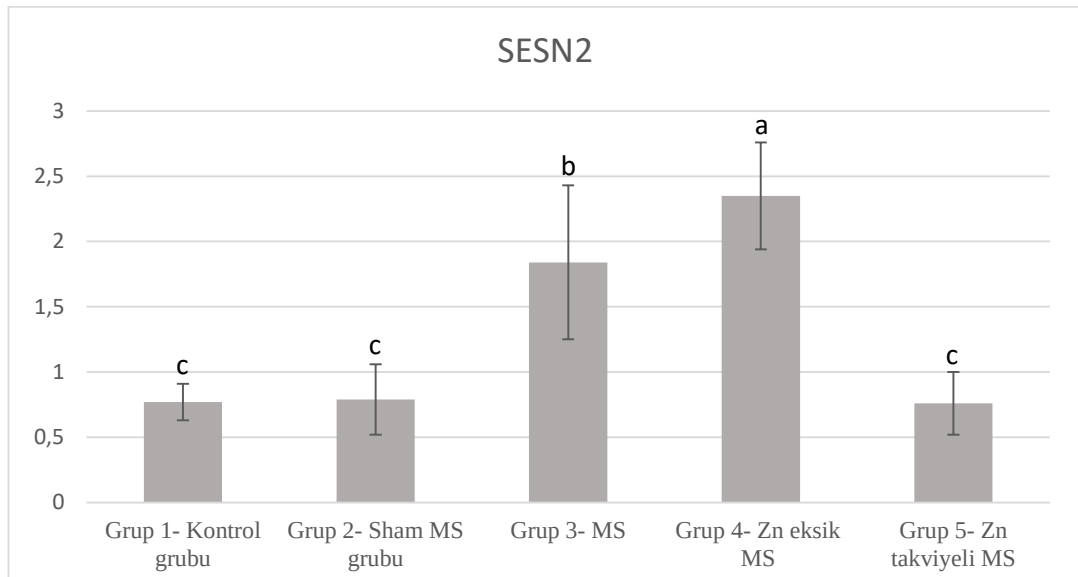
3.6. Corpus Callosum Dokusundaki Sestrin-2 Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Mevcut çalışmada corpus callosum'daki en yüksek SESN2 gen ekspresyonu çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi ($P<0,05$). Standart sıçan diyetiyle beslenen MS grubunun aynı parametresi grup 4'den düşük ($P<0,05$), diğer grupların tamamından yüksekti ($P<0,05$). Çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) SESN2 gen ekspresyon seviyeleri kontrol gruplarından (grup 1 ve grup 2) farklı değildi (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Corpus callosum dokusundaki SESN2 gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	SESN2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	0,77±0,14c
Grup 2- Sham MS grubu	10	0,79±0,27c
Grup 3- MS	10	1,84±0,59b
Grup 4- Zn eksik MS	10	2,35±0,41a
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	0,76±0,24c

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.6. SESN2'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

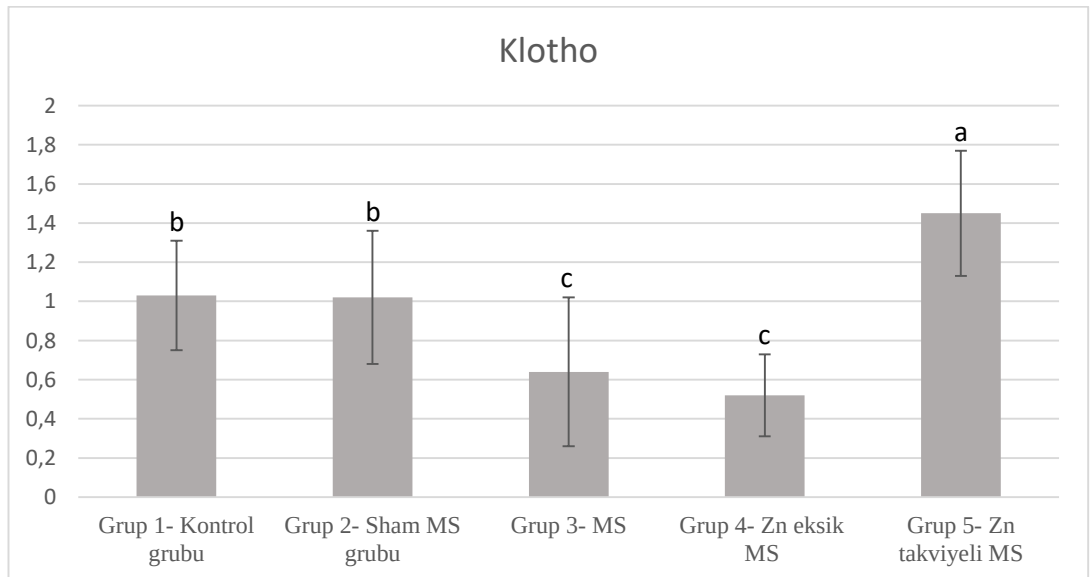
3.7. Corpus Callosum Dokusundaki Klotho Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada hem standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3) hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubu (grup 4) gruplarının corpus callosum'daki Klotho protein gen ekspresyon düzeyleri diğer grupların tamamından önemli ölçüde düşük bulundu ($P<0,05$). Buna karşın en yüksek Klotho protein gen ekspresyon düzeylerini çinko desteği alan MS grubunda (grup 5) elde ettik ($P<0,05$, Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Corpus callosum dokusundaki Klotho gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	Klotho ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,03±0,28 b
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,02±0,34 b
Grup 3- MS	10	0,64±0,38 c
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,52±0,21 c
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,45±0,32 a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.7. Klotho'nun corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

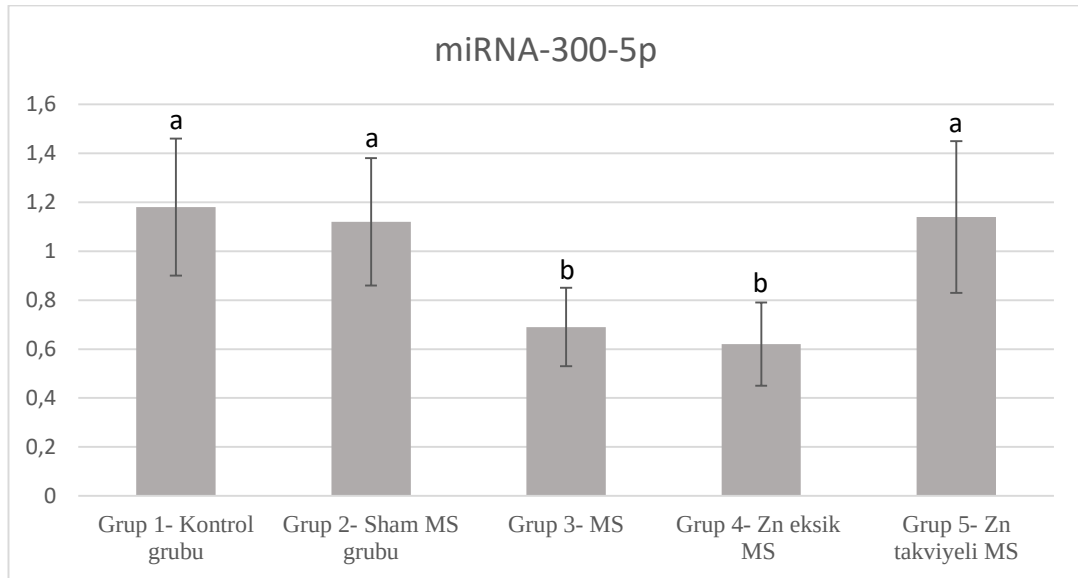
3.8. Corpus Callosum Dokusundaki miRNA-300-5p'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Corpus callosumdaki en düşük miRNA-300-5p gen ekspresyon düzeyleri standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3) ve çinko eksik diyetle beslenen MS grubu (grup 4) gruplarında elde edildi ($P<0,05$). İntaperitoneal çinko takviyesi yapılan MS (grup 5) grubunun miRNA-300-5p'nin gen ekspresyon düzeyleri çinko desteğiyle kontrol grubunun değerlerine (grup 1 ve grup 2) ulaştı (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. Corpus callosum dokusundaki miRNA-300-5p'nin gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	miRNA-300-5p ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,18±0,28a
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,12±0,26a
Grup 3- MS	10	0,69±0,16b
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,62±0,17b
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,14±0,31a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.8. miRNA-300-5p'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

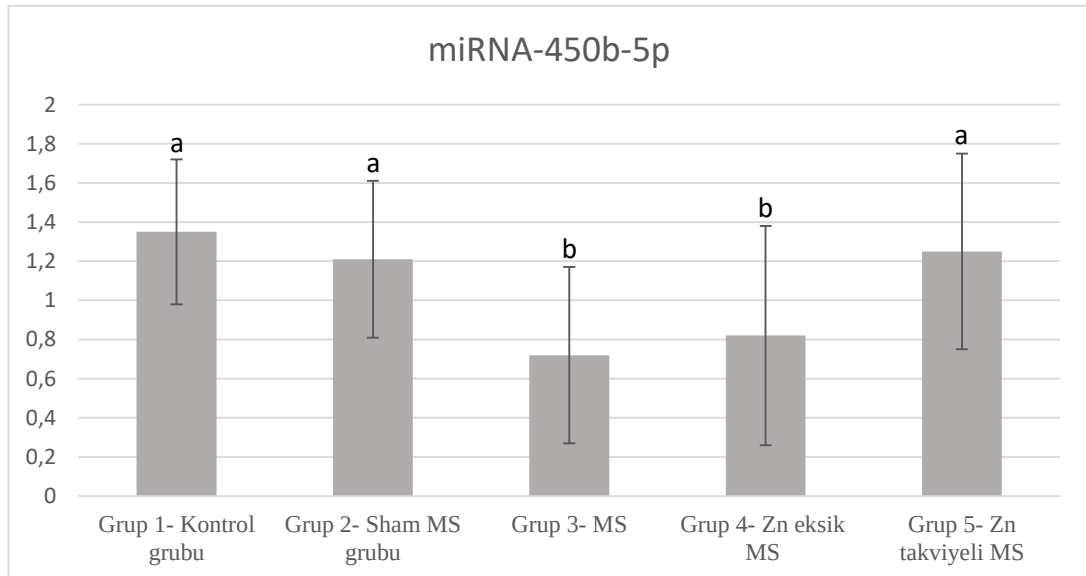
3.9. Corpus Callosum Dokusundaki miRNA-450b-5p'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Corpus callosumdaki en düşük miRNA-450b-5p gen ekspresyon düzeyleri standart sıçan yemiyle beslenen MS (grup 3) ve çinko eksik diyetle beslenen MS (grup 4) gruplarında elde edildi ($P<0,05$). İntaperitoneal çinko takviyesi yapılan MS (grup 5) grubunun miRNA-450b-5p gen ekspresyon düzeyleri çinko desteğiyle kontrol değerlerine (grup 1 ve grup 2) ulaştı (Tablo 3.9.).

Tablo 3.9. Corpus callosum dokusundaki miRNA-450b-5p'nin gen ekspresyon düzeyi

Gruplar	N	miRNA-450b-5p ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Grup 1- Kontrol grubu	6	1,35±0,37a
Grup 2- Sham MS grubu	10	1,21±0,40a
Grup 3- MS	10	0,72±0,45b
Grup 4- Zn eksik MS	10	0,82±0,56b
Grup 5- Zn takviyeli MS	10	1,25±0,50a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.9. miRNA-450b-5p'nin corpus callosum dokusundaki ifade düzeyi

4.TARTIŞMA

4.1.Rotarod Test Bulgularının Tartışılması

Rotarod testi, farelerin hızlandırılmış çubuk üzerinde kalma ve koşma yeteneklerini ölçerek hayvanların motor koordinasyonunu ve öğrenme becerilerini araştırmak için kullanılan standart bir duyu-motor testidir (93). Kemirgenlerde motor koordinasyonun ölçülmesinde rotarod testi ilk olarak 1957 yılında kullanılmıştır (94). Daha sonra bu testler çeşitli maddelerle tedavi edilen sıçan deneysel modellerinde hem motor performans, hem de öğrenme becerilerini ölçmek için kullanılmışlardır (95). Rotarod testi günümüzde en sık kullanılan motor ve bilişsel fonksiyon testlerinden biri haline gelmiştir (93, 95).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çubuk üzerinde kalma süresi yönünden hayvanlar değerlendirildiğinde; MS (grup 3) ve çinko eksik diyetle beslenen MS grubundaki (grup 4) hayvanlar diğer gruplara oranla çubuk üzerinden daha kısa sürede düştüler. Bu bulgu deneysel MS modeli oluşturulan grup 3 ve grup 4 hayvanlarının, çinko takviyesi alan grup 5 ile kontrol grubu hayvanlarına göre daha zayıf motor koordinasyona sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda çinko eksik diyetle beslenen MS grubundaki (grup 4) hayvanların rotarod performans testi rakamsal olarak cuprizonla indüklenmiş MS grubuna (grup 3) oranla daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum muhtemelen hayvanların rotarod testlerindeki bireysel farklılıklarından kaynaklanmış gibi görünmektedir.

Cuprizonla indüklenmiş sıçan MS modellerinde motor fonksiyon bozukluklarını göstermek için rotarod testi sıklıkla kullanılır (95). Han ve ark.'ı Cuprizonla uyarılan demiyelinizasyon fare modelinde motor fonksiyon kaybını belirlemek için rotarod testi uygulamışlar ve tedavi almayan cuprizonlu hayvanların çubuk üzerinde kısa sürede düşerek motor fonksiyonlarda bozukluk sergilediklerini göstermişlerdir (96). Cuprizonla indüklenmiş fare MS modelinde zenginleştirilmiş ortamın MS üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada zenginleştirilmiş ortama alınmayan hayvanların rotarod performanslarının daha zayıf olduğu yani çubuk üzerinde daha kısa sürede düştükleri gösterilmiştir (97). Sonuç olarak deneysel MS modellerinde rotarod performansı motor fonksiyonların belirlenmesinde güvenilir bir test olarak uygulanmaktadır (98, 99). Mevcut çalışmada cuprizonla indüklenmiş

sıçan MS modelinde çinko takviyesi almayan grupların (grup 3 ve 4) rotarod performanslarının diğer gruplara oranla önemli ölçüde azalması motor fonksiyonlarındaki bozulmayı göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgu cuprizonla indüklenmiş MS modelinde sıçanlarda MS oluştuğunun delilidir.

Çalışmamızdaki bu parametreyle ilgili en önemli bulgu çinko takviyesi alan MS'li grup 5 hayvanlarının rotarod performanslarının takviye almayan MS'li gruplardan (grup 3 ve 4) daha iyi olmasıdır. Çinko desteğiyle ilgili elde ettiğimiz bu bulgu çinkonun MS hastalığında ortaya çıkan motor fonksiyonlardaki bozulmayı önleyebileceğini göstermektedir. Yaptığımız Med-Line taramalarda diyet çinko durumunun MS hastalığında motor fonksiyonları nasıl etkilediğini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Cuprizonla indüklenmiş sıçan MS modelinde çinko desteğinin motor fonksiyonlardaki bozulmayı önleyebileceğini gösteren bulgumuz gelecekte MS ve çinko ilişkisini araştırarak çalışmalar için yol gösterici olabilir.

4.2. Corpus Callosum Dokusundaki MBP Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tartışılması

MS, beyin, omurilik ve optik sinirler dahil olmak üzere merkezi sinir sistemini etkileyen otoimmün bir hastalıktır. MS durumunda, bağışıklık sistemi sinir lifini koruyan miyelin kılıfına saldırarak demiyelinizasyona yol açar (100). Oligodendrositlerin miyelin kılıf yüzeylerinin en dış tabakasında bol miktarda bulunan MBP bağışıklık reaksiyonunu destekleyen kritik oto-antijenlerden bir tanesi olarak önerilmiştir (101). MS hastalarında hastalık aktivitesi sırasında yüksek MBP ekspresyonu tanımlanmıştır (102). MBP ekspresyonundaki artışın MS hastalığında güvenilir bir belirteç olabileceğine bu nedenle dikkat çekilmiştir (102). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada corpus callosumdaki en yüksek MBP gen ekspresyon düzeyleri standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (grup 3) ile çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (grup 4) elde edildi. Tian ve ark'ı (103) gerçekleştirdikleri çalışmalarında BOS ve serumdaki MBP düzeylerinin her ikisinin de MS hastalarında kontrollerle karşılaştırıldığında önemli şekilde arttığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar bahsedilen çalışmalarında BOS ve serum MBP düzeylerinin değerlendirilmesinin MS hastalığının doğru tanısına olanak sağlayabileceğini de ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle hem BOS hem de serum MBP düzeylerinin kombinasyonunun MS tanısı için hassas bir indeks görevi görebileceğini önermişlerdir (103). Benzer şekilde Agliardi ve ark.'da MS hastalarında MBP

düzeylerinin yüksek olduğundan yola çıkarak MBP konsantrasyonunu ölçen minimal invaziv bir kan testinin MS teşhisini kolaylaştırabilecek umut verici bir araç olabileceğini bildirmişlerdir (104).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çinko desteği almayan MS gruplarında (grup 3 ve 4) corpus callosumdaki artmış MBP gen ekspresyon seviyeleri “yukarıda raporları sunulan araştırmacıların bulgularıyla birlikte düşünüldüğünde” cuprizon uygulamasının sıçanlarda MS’e yol açığının bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Aynı zamanda mevcut çalışmamızda çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) MBP gen ekspresyon düzeylerini tedavi almayan MS grupları olan grup 3 ve 4’den düşük bulduk. Yine çinko desteği alan MS grubunun (grup 5) MBP gen ekspresyon düzeyleri ise grup 1 (kontrol) ve grup 2 (Sham)’den farklı değildi. Elde ettiğimiz bu bulgu oldukça kritik bir bulgudur. Zira MS hastalığında diyet çinko durumunun corpus callosumdaki MBP gen ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini araştıran hiçbir çalışma yoktur. Mevcut çalışma diyet çinko durumunun MS hastalığında MBP gen ekspresyon düzeyleriyle ilişkisini ortaya koyan ilk araştırmadır.

4.3. Corpus Callosum Dokusundaki Nogo A Ve Nogo R Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Multipl Skleroz başta olmak üzere Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisindeki zorluklar bu alandaki deneysel çalışmalara olan ilgiyi artırmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklara yol açan faktörler arasında genetik ve hücresel düzeydeki değişikliklerin anormal şekilde yanlış katlanmış proteinlerin üretimine yol açmasının da bulunabileceği gösterilmiştir (105). MS’de yürütülen mevcut tedaviler içinde rejenerasyonu, miyelin onarımını veya bakımını destekleyen hiçbir terapi mevcut değildir. Miyelinle ilişkili inhibitör protein nörit büyüme inhibitörü-A (Nogo-A)’nın miyelinasyonun negatif düzenleyicisi olması, remiyelinizasyon ve rejenerasyonu indüklemek için umut verici bir hedef olabileceğini düşündürmüştür. (106). Nogo-A, başlıca oligodendrositler tarafından eksprese edilen bir transmembran proteindir (107). Nogo-A, aktin hücre iskeletinin dengesizleşmesine ve dendritik omurga yoğunluğunun azalmasına yol açan faktörleri uyararak sinaps oluşumunu inhibe eder (108). Nogo-A’nın, MS’te aksonal ve sinaptik fonksiyon bozukluklarının geriye çevrilmesinde ve nötralize

edilmesindeki kritik önemi, umut verici bir hedef olarak ortaya çıkmasında başlıca faktördür (107). Esp rito-Santo ve arkadaşları Nogo-A sinyalinin astrosit sinaptogenezi düzenleyebileceğini göstermiştir (109). Aynı araştırıcılar bu hücrelerde Nogo-A yolunun modülasyonunun MS'in devre değişikliklerini yönlendiren yeni bir mekanizma olduğunu bildirmişlerdir (110).

Cuprizon uygulamasıyla oluşturulan demiyelinizasyon gibi MS hayvan modellerinde hastalığın henüz başlangıç safhalarında bile ortaya çıkan sinaptik değişiklikler MS'in ayırt edici özelliklerindendir ve bunlar doğrudan nörolojik engellilik ile ilişkilidir (110). Bizde  alışmamızda MS sıçan modelini cuprizonun 8 hafta süren gavaj uygulamasıyla gerçekleştirdik.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada standart sıçan yemiyle beslenen MS grubunda (G3) artan corpus callosumdaki Nogo-A ve Nogo R gen ekspresyon seviyeleri, çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) daha da şiddetli bir artış gösterdi. Çinko takviyesi yapılan MS grubunda (G5) ise çinko desteği diğer MS gruplarında artan Nogo-A ve Nogo R gen ekspresyon seviyelerini tersine çevirerek kontrol değerlerine yaklaştırdı.

Nogo-A'nın reseptörü olan Ng-R ile sinyal iletiminin engellenmesinin, hayvan çalışmalarında mikrogliyal hücre fonksiyonunu ve aktivitesini düzenleyebileceği rapor edilmiştir (111). Zaten sıçan MS modellerinde iyileşmeyi gösterebilmek için Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonunu baskılayabilecek yöntemlere odaklanılmaktadır (110). Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonunun baskılanması MS hayvan modellerinde; hastalığın ilerlemesinde yavaşlama, klinik iyileşme, azalmış demiyelinizasyon ve azalmış aksonal hasar gibi kritik pozitif sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (107, 110).

Yaptığımız Med-line taramalarda MS hayvan modellerinde diyetteki çinko durumu ile Nogo-A/Ng-R ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak sıçan Alzheimer modelinde diyet çinko durumunun hipokampal Nogo-A gen ekspresyonunu değiştirdiği, Alzheimer oluşturulan sıçanlarda artan hipokampal Nogo-A gen ekspresyonunun, çinko eksikliğinde daha da şiddetlendiği oysa çinko takviyesi yapılan Alzheimer'lı sıçanlarda çinko desteğinin Nogo-A reseptör gen

ekspresyonunu azaltarak kontrol değerlerine yaklaştırdığı Gümüş ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (112).

Mevcut çalışmanın Nogo-A/Ng-R gen ekspresyon bulgularıyla ilgili bu bölümde sonuç olarak diyet çinko durumunun MS sıçan modelinde corpus callosumdaki Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonuyla ilişkili olduğu söylenebilir. MS sıçan modelinde artan Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonunun çinko eksikliğinde daha da şiddetlenmesi orijinal bir bulgudur. Ancak MS sıçan modelinde çinko desteğinin Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonunu baskılayarak kontrol değerlerine ulaştırması çok daha orijinal ve kritik bir bulgudur. Zira sıçan MS modellerinde iyileşmeyi gösterebilmek için Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonunu baskılayabilecek yöntemlere odaklanıldığı (110) göz önüne alındığında çinko burada önemli bir molekül olarak ortaya çıkmaktadır. MS sıçan modelinde Nogo-A/Ng-R gen ekspresyonu ve diyet çinko durumu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışma Med-line taramalardan yola çıkarak bu konuda yapılmış ilk araştırma olarak takdim edilebilir.

4.4. Corpus Callosum Dokusundaki ZnT3 Ve ZnT4 Bulgularının Tartışılması

Vücutta demir gibi spesifik bir depo yeri bulunmayan çinko ihtiyacı diyetle karşılanır. Çinkoya duyulan ihtiyaç diyetle karşılanamadığında günler içerisinde eksikliği ortaya çıkar (113). Çinko eksikliği büyüme döneminde büyüme bozukluklarının yanı sıra çocuklarda öğrenme ve bellek performansında baskılanmaya yol açar (114). Çinko eksikliğinin beyin gelişimi ve fonksiyonlarında da bozukluklara yol açtığı bilinmektedir (115). Bu bilgiler diyetle çinko alımının önemini gösterir. Beyindeki çinko dengesi güçlü bir regülasyona sahiptir. Bu regülasyonun bozulması sonucu hem çinko eksikliği hem de fazlalığı nekrotik, apoptotik veya otofajik yollarla hücre ölümüne yol açabilir (116). MS hastalarında çinko regülasyonunun bozulduğuna dair kanıtlar vardır (117). MS hastalarından toplanan otopsi örneklerinde Synchrontron X-ışını floresans görüntüleme tekniğiyle yapılan analizler total çinko içeriğinin beyaz cevher lezyonunda miyelin kaybına paralel olarak azaldığını göstermektedir (118). Miyelin bütünlüğünün oluşumu ve sürdürülmesinde kritik rol oynayan çinko miyelin homeostazında önemli fonksiyonel rollere sahip olan birkaç ana miyelin proteininin de bir bileşenidir (117, 119-121). Buna paralel olarak MS hayvan modellerinde bozulan çinko dengesinin restorasyonunun miyelin onarımını destekleyebileceği gösterilmiştir (55). MS hem

demiyelinizasyon hem de remiyelinizasyonu içeren karmaşık aşamalara sahip bir hastalıktır. Bu nedenle hem çinko eksikliğinin hem de çinko fazlalığının MS’de rol oynaması anlaşılır görünmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada beyin çinko regülasyonunda kritik önemde olan ZnT3 gen ekspresyonunun corpus callosumdaki en düşük düzeyleri hem standart sıçan yemi ile beslenen MS grubu (G3), hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) elde edildi. Çinko desteği MS grubunun (G5) corpus callosumdaki ZnT3 gen ekspresyon düzeyini kontrol gruplarının (G1 ve G2) değerlerine ulaştırdı.

Bazı araştırmacılar yukarıdaki bilgilerin aksine MS’te çinko toksisitesine odaklandılar. Bu araştırmacılar MS hastalığının ilerlemesi sırasında hücre dışı boşluğa salınan çinkonun omurilik beyaz maddesindeki miyelin kılıfının tahrip edilmesinde ve motor kayıpların oluşmasında rol oynayabileceğini düşündüler. Bu noktadan yola çıkarak vesiküler çinko tükenmesinin multipl skleroz kaynaklı beyaz cevher hasarı ve motor eksiklikler üzerinde koruyucu etkiler gösterip göstermediğini test etmek için ZnT3 geninden yoksun MS fare modelinde omurilik enflamasyonu ve demiyelinizasyonunda önemli iyileşme gösterdiler (56). Bu sonuçlara bağlı olarak da ZnT3 gen delesyonunun, MS’le ilişkili nöropatolojik değişiklikleri engelleyebileceğini önerdiler (56, 69). Bu raporlara benzer şekilde bir çinko şelatörü olan 1H10’un MS fare modelinde hayvanlara uygulanmasının çinko toksisitesini azaltarak çinko kaynaklı nöronal ölümü önlediği bildirilmiştir (122). Yukarıda sunulan araştırmacıların raporlarıyla bizim mevcut çalışmamızda MS ve çinko eksik MS gruplarında elde ettiğimiz corpus callosumdaki baskılanmış ZnT3 düzeyleri oldukça çelişkilidir. Öncelikle yukarıda raporları sunulan çalışmalarda remiyelinizasyon fazı ile oligodendrosit sağkalımı ve farklılaşması üzerindeki etkiler ele alınmamıştır. Ancak şurası da önemlidir ki fazla çinkonun oligodendrositler için toksik olması muhtemel olsa da, sonraki remiyelinizasyon fazı sırasında remiyelinizasyonun devam etmesi için çinko akışına ihtiyaç vardır. Bu nedenle de lokal çinko eksikliğinin remiyelinizasyon başarısızlığında rol oynayabileceğini göz önünde tutmak kritiktir.

Mevcut çalışmamızda cuprizonla indüklenmiş MS sıçan modelinde diyet çinko durumu ile corpus callosumdaki ZnT3 ilişkisine odaklandık. Çalışmamız 8

hafta süreyle cuprizonla indüklenmiş MS sıçan modelinde gerçekleştirilmiştir. MS süresinin de mevcut bulgularda etkisinin olabileceği açıktır. Çalışmamızın sonuçları diyet çinko durumu ile corpus callosumdaki ZnT3 gen ekspresyonu arasında kritik bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Sonuçlarımız 8 hafta süreyle cuprizonla indüklenmiş MS sıçan modelinde çinko desteğinin corpus callosumdaki ZnT3 gen ekspresyonu üzerinde modüle edici etkisini gösterir. Hem çinko eksikliğinin hem de çinko fazlalığının MS’de rol oynadığı dikkate alındığında gerçekleştirdiğimiz çalışmada fizyolojik dozda çinko desteğinin MS sıçan modelinde corpus callosumdaki ZnT3 gen ekspresyonu üzerinde modüle edici etkiye sahip olabileceğini göstermemiz kritik bir bulgudur. Ancak yine de çalışmamızı bire bir karşılaştırabileceğimiz benzer bir çalışmaya med-line taramalarda rastlayamadık. Bu yönüyle mevcut çalışmanın ZnT3’le ilgili bulguları çinkonun ZnT3 gen ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkisine dikkat çeken ilk çalışmadır.

Çinko taşıyıcı proteinlerden olan ZnT4 ilk olarak süt faresinde kalıtsal çinko eksikliğinden sorumlu gen olarak izole edilmiş ve daha sonra beyin, meme bezi ve bağırsak epitelindeki ekspresyonu tarif edilmiştir (123). Bununla birlikte, ZnT4’ün nörolojik hastalıklardaki ifadesi ve önemi çok fazla araştırılmamıştır. Flurotil kaynaklı tekrarlayan yenidoğan nöbetlerinin ardından sıçan serebral korteksinde ZnT4, kaspaz-3 ve PRG-3’ün bozulmuş ekspresyonundan yola çıkılarak bu moleküllerin tekrarlayan neonatal nöbet kaynaklı akut ve uzun süreli beyin hasarının patofizyolojisinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (123). Buna paralel olarak serebral iskemiye bağlı kan beyin bariyeri bozulmasının ZnT4 aktivasyonu ile önlenilebileceği bildirilmiştir (73). Az sayıda çalışmayla gösterilmiş olsa da ZnT4 Alzheimer ve epilepsi başta olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir (124).

Çalışmamızda ZnT4’ün corpus callosumdaki gen ekspresyonu mukayese edildiğinde en düşük ZnT4 gen ekspresyonu standart sıçan yemi ile beslenen MS grubu (G3) ile çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) elde edildi. Çinko desteği alan MS grubunun (G5) ZnT4 gen ekspresyon düzeyleri kontrol grupları da (G1 ve G2) dahil olmak üzere diğer grupların tamamından daha yüksekti. Nörodejeneratif hastalıklarda gen ekspresyonu değişen ZnT4 (124, 125)’ün MS’le ilişkisini bildiren hiçbir yayın yoktur. Bu çalışmada corpus callosum ZnT4 gen

ekspresyonunu araştırma düşüncesi bu taşıyıcı proteinin nörodejeneratif hastalıklardaki ekspresyonunun değiştiğini bildiren raporlardan doğdu (123-125). Mevcut çalışmanın verileri cuprizonla indüklenmiş sıçan MS modelinde ve çinko eksik diyetle beslenen sıçan MS modelinde ZnT4 gen ekspresyonunda önemli baskılanma olduğunu göstermektedir. Ancak burada diyetteki çinko eksikliği standart diyetle beslenen MS grubuyla mukayese edildiğinde ZnT4 ekspresyonunda ilave bir baskılanma meydana getirmedir. Buna karşın MS oluşturulmuş sıçanlara 8 hafta süren çinko desteği ZnT4 gen ekspresyonunu kontrol gruplarından da (G1 ve G2) daha yüksek bir seviyeye çıkarttı. Çalışmamızın bulguları deneysel MS modeliyle ZnT4 gen ekspresyonu arasında önemli bir ilişkiye işaret eder. Çinko desteği deneysel MS modelinde baskılanan ZnT4 gen ekspresyonunu iyileştirir.

4.5. Corpus Callosum Dokusundaki Klotho Bulgularının Tartışılması

Yakın zamanda keşfedilen Klotho proteini yaşam süresiyle ilişkilendirilmiştir (126). Farelerde Klotho eksikliği veya Klotho geninin yokluğu yaşlanmayı hızlandırarak ömür süresini kısaltırken, klotho'nun aşırı ekspresyonu farelerde yaşam süresinin uzamasıyla sonuçlanmıştır (127). Kalsiyum, fosfatlar ve D vitamininin renal metabolizmasında yer alan Klotho proteininin en yüksek konsantrasyonları böbrek ve beyinde tespit edilmiştir (126). Muhtemelen böbrek distal tübüler hücrelerde iyon taşınmasının bir modülatörü olarak görev yapar (128). Beyinde ise klotho, hem lateral ventriküllerin hem de üçüncü ventrikülün koroid pleksuslarındaki ependimal hücrelerin apikal plazma zarında eksprese edilir (128). Klotho'nun düşük seviyeleri D vitaminin toksisitesini ortaya çıkarırken, Klotho gen ekspresyonundaki artışın böbrek proksimal tübül hücrelerinde 1- α hidroksilazı inhibe ederek D vitaminin sentezini sınırlandırarak toksisiteyi azaltmıştır (128, 129)

MS tedavisinde kullanılan ilaçlar aktif bağışıklık tepkisini hedef alır. Ayrıca remiyelinizasyon, MS için yeni terapötik bir potansiyel hedeftir (126). Klotho'nun nörodejeneratif hastalıkların tedavi edilmesindeki terapötik potansiyelini bildiren raporların sayısında da dikkat çekici bir artış vardır (130). Transgenik farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada Klotho'nun gen ekspresyonundaki artışın cuprizon kaynaklı demiyelinizasyonu takiben remiyelinizasyonu artırıp artıramayacağı ve deneysel otoimmün ensefalomyelitte klinik sonucu iyileştirici etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır (131). Çalışmanın sonucunda araştırmacılar artan Klotho

gen ekspresyonundaki artışın multipl sklerozlu bireylerin beyinlerinde remiyelinizasyonu arttırmaya yönelik bir terapi aracı olabileceği sonucuna varmışlardır (131).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada hem standart sıçan yemiyle beslenen MS (G3) hem de çinko eksik diyetle beslenen MS (G4) gruplarının corpus callosum'daki Klotho protein gen ekspresyon düzeyleri diğer grupların tamamından önemli ölçüde düşük bulundu. Buna karşın en yüksek Klotho protein gen ekspresyon düzeylerini çinko desteği alan MS grubunda (G5) elde ettik.

Klotho gen ekspresyonundaki artışın cuprizon aracılı MS fare modelinde remiyelinizasyonu hızlandırdığını gösteren Zeldich ve arkadaşlarının (131) raporu Klotho'nun nörodejenerasyondaki kritik rolünü göstermesinin yanı sıra, yeniden miyelinizasyonu destekleyen ve/veya miyelin onarımını uyarayan MS tedavilerinin geliştirilmesinde de umut vaat eden bir bulgu olarak ortaya çıkmıştır (130).

Bu noktadan hareketle Klotho aktivitesi ve gen ekspresyonunu uyaraabilecek moleküler yollarının araştırılması bilim insanları için MS tedavisinde cazip edici bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmaktadır. Klotho'nun aktivitesinde ve gen ekspresyonundaki artış MS'te remiyelinizasyonu destekleyerek ve/veya miyelin onarımını uyararak tedavide kritik bir noktaya gelinmesini sağlayabilir. Mevcut çalışma yaşlanmayı geciktirici bir molekül olan Klotho'nun hem MS hem de çinko eksik diyetle beslenen MS sıçan modellerinde gen ekspresyonunun önemli şekilde baskılandığını göstermektedir. Cuprizonla indüklenmiş MS sıçan modelinde çinko desteği ise Klotho gen ekspresyonunda kontrol gruplarından da daha yüksek bir oranda artışa yol açmıştır. Bu bulgu MS'te endojen Klotho gen ekspresyonunu indüklemeyi yönelik çalışmalarda kritik bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Çinko bir Klotho gen ekspresyon indükleyicisi olabilir.

4.6. Corpus Callosum Dokusundaki NZF2b Bulgularının Tartışılması

Yaşlanmayı geciktirerek yaşamı uzattığı bilinen Klotho proteini bellek performansı üzerinde de iyileştirici etkilere sahiptir (132, 133). Klotho proteini antioksidan ve pro-miyelinizan etkileri de içermesi nedeniyle nöroprotektif bir moleküldür. Klotho proteini ile çinko ve çinko parmak proteinleri arasında önemli bir ilişki vardır (132, 133). Çinko Parmak Proteinleri (ZFP'ler), DNA bağlayıcı

proteinler sınıfına aittir. DNA'ya, sistein ve histidin kalıntılarının bir kombinasyonuna koordine edilmiş çinko iyonları tarafından stabilize edilen parmak şeklindeki bir kıvrım yoluyla bağlanırlar. ZFP'lerin tasarım ve mühendisliğindeki gelişmeler, onları çeşitli terapötik amaçlarla diğer işlevsel alanlarla birleştirerek genom hedeflemesine yol açmıştır (132). NZF2b/7ZFMyt1 (brain-specific neural-zinc-finger transcription factor-2b) merkezi sinir sisteminde ifade edilen ve çinko bağlayan spesifik bir transkripsiyon faktör gen ailesinin üyesidir (134). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada NZF2b gen ekspresyonunun corpus callosumdaki en düşük düzeyleri hem standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (G3), hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) elde edildi. Çinko desteği alan MS grubunun (G5) corpus callosumdaki NZF2b gen ekspresyon düzeyleri ise kontrol gruplarından (G1 ve G2) farklı değildi.

Yaşlanma sürecinde azalma eğilimi gösteren Klotho'nun çinko parmak proteinleri aracılığıyla gen ekspresyonunun artırılabilceği rapor edilmiştir (132). Çinko parmak transkripsiyon faktörlerinin bir üyesi olan NZF2b embriyonik fare sinir sisteminde, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemindeki yeni farklılaşmış nöronlarda 2000'li yılların başında izole edilmiştir (135). Chen ve arkadaşları (132) ZFP'leri kullanarak Klotho gen ekspresyonunu önemli ölçüde artıran bir yöntem tanımladı. Bu nedenle klotho proteini ile çinko parmak proteinleri arasında kritik bir ilişki vardır. NZF2b'nin baskın bir form olması nedeniyle (135) bu çalışmada MS sıçan modelinde klotho proteini ve NZF2b arasındaki ilişkiye odaklandık. Çalışmamızda hem standart sıçan yemiyle beslenen MS grubu (G3), hem de çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) baskılanan NZF2b gen ekspresyonunun çinko desteğiyle kontrol değerlerine ulaştığının ortaya konulması oldukça kritik bir bulgudur. Klotho gen ekspresyonunun çinko parmak proteinleri aracılığıyla artırılabilceğinin rapor edilmesi (132), mevcut çalışmada çinko desteğiyle elde ettiğimiz NZF2b gen ekspresyonundaki artışı daha da önemli kılar. MS sıçan modelinde baskılanan NZF2b gen ekspresyonunda çinko desteğiyle sağlanan artışın Klotho gen ekspresyonu artırmaya yönelik arayışlarda teröpatik bir faktör olabileceği önerilebilir. Med-line taramalarda MS, Klotho, NZF2b ve çinko ilişkisini konu alan bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak çalışmamızın bu bölümündeki bulgulardan yola çıkarak çinkonun klotho gen ekspresyonunda artışa yol açan etkisinin NZF2b aracılığıyla ortaya çıkabileceği söylenebilir.

4.7. Corpus Callosum Dokusundaki Sestrin-2 Bulgularının Tartışılması

Sestrin ailesinin bir üyesi olan SESN2, çeşitli zararlı uyaranlara karşı hücreleri koruma yeteneğine sahip, stresle indüklenen bir proteindir (136). SESN2 ekspresyonunun hipoksi, iskemi, yüksek glukoz ve endoplazmik retikulum tarafından indüklenebileceği bildirilmektedir (137). SESN2 böbrek, akciğerler, lökositler, karaciğer, gastrointestinal sistem ve beyinde yüksek oranda eksprese edilir (138). SESN2, hücrel antioksidan savunmayı güçlendiren güçlü bir antioksidan protein olarak önerilmektedir (139). Son çalışmalar, SESN2'nin Parkinson hastalığı ve iskemik inme dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda nöroprotektif bir işlev uyguladığını göstermektedir (137, 140).

Mevcut çalışmada corpus callosum'daki en yüksek SESN2 gen ekspresyonu çinko eksik diyetle beslenen MS grubunda (G4) elde edildi. Standart sıçan diyetiyle beslenen MS grubunun aynı parametresi grup 4'den düşük, diğer grupların tamamından yüksek bulundu. Çinko desteği MS grubunda (G5) artan SESN2 gen ekspresyon seviyelerini regüle ederek kontrol gruplarındaki (G1 ve G2) değerlere getirdi.

Sestrin moleküllerinin nörolojik hastalıklarda rol oynayabileceğinden yola çıkarak MS hastalarında SESN2 ve MS arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma ortalama 7.5 yıldır MS tedavisi gören 40 hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hastaların serum örneklerinde SESN2 düzeylerinin kontrollere göre önemli şekilde düşük bulunduğu bildirilmiştir (141). Hatta araştırmacılar bahsedilen çalışmalarında MS hastalarında kontrollere göre azalmış SESN2 düzeylerinin MS hastalarında bir belirteç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (141).

Yukarıda sunulan araştırmacıların bulguları mevcut çalışmada MS sıçan modelinde elde edilen yüksek SESN2 gen ekspresyonuyla zıtlık göstermektedir. Ancak Odabas ve arkadaşlarının (141) çalışmalarındaki tayini yapılan hastalar ortalama 7.5 yıldır MS tedavisi gören hastalardan oluşmaktaydı. Yani yapılan serum SESN2 ölçümleri yeni MS tanısı almış hastalarda değil ortalama 7.5 yıldır MS tedavisi gören ve kontrol amaçlı hastaneye başvuran bireylerden gerçekleştirilmişti.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada sıçanlarda MS modeli 8 hafta boyunca cuprizonun günlük gavaj uygulamalarıyla gerçekleştirildi. Sekiz haftalık

uygulamanın bitiminde de hayvanlar sakrifiye edilerek corpus callosumdaki SESN2 gen ekspresyonları tayin edildi. Çalışmamızın bulguları MS sıçan modelinde ekspresyonu önemli ölçüde artan SESN2 düzeylerindeki artışın çinko eksikliğinde daha da şiddetlendiğini göstermektedir. Çeşitli zararlı uyaranlara karşı hücreleri koruma yeteneğine sahip ve stresle indüklenen bir protein (136) olan SESN2'nin mevcut çalışmada MS sıçan modelinde artan gen ekspresyonunun daha önceki bölümlerde tartışılan parametrelerle birlikte düşünüldüğünde MS'li sıçanlarda oluşan nörodejeneratif parametrelerdeki bozulmayı önleyemediğini göstermektedir. Mevcut çalışmada MS sıçan modelinde artan gen ekspresyonunun çinko eksik diyetle beslenen MS'li sıçanlarda daha da şiddetlenmesi MS'te diyet çinko durumu ile SESN2 gen ekspresyonu arasında önemli bir ilişkinin varlığını gösterir. Biz yine mevcut çalışmamızda çinko desteği alan MS grubunun SESN2 gen ekspresyon seviyelerinin kontrol değerlerine döndüğünü gösterdik. Elde ettiğimiz bu bulgu çinko desteğinin corpus callosumdaki SESN2 gen ekspresyonu üzerinde modüle edici bir etkiye sahip olabileceğini düşündürür. Elde ettiğimiz bu bulgu MS sıçan modelinde çinko ve SESN2 ilişkisinin daha ileri düzeyde araştırılmasını teşvik edecek bir bulgudur. Çalışmamızda araştırılan MS-diyet çinko durumu-corpus callosumdaki SESN2 gen ekspresyon ilişkisi konuyla ilgili gerçekleştirilen ilk çalışmadır.

4.8. Corpus callosum dokusundaki miRNA-300-5p ve miRNA-450b-5p'nin bulgularının tartışılması

Moleküler yolların araştırılmasında elde edilen başarılarla rağmen, MS'in patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar yani miRNA (MicroRNA'lar)'ların MS gelişiminin moleküler mekanizmalarındaki rolünün araştırılmasında artan bir ilgi vardır (142). miRNA-300 mekanizmaları henüz aydınlatılmamakla beraber çeşitli nörolojik ve enflamatuar bozukluklarda fonksiyonel bir rol oynayabilir. miRNA-300'ün glioblastoma dokularında bir tümör baskılayıcı olabileceği öngörülmüştür (143). miRNA300 ve miRNA 450'nin nöron farklılaşması, nöron gelişimi ve nörogenezin pozitif düzenlemesiyle bağlantılı olabileceği de rapor edilmiştir (83). Aynı zamanda bu miRNA'lar (miRNA 300 ve miRNA450) MS'de önemli bir role de sahip olabilirler (83).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada Corpus callosumdaki en düşük miRNA300 ve miRNA450 gen ekspresyon düzeylerini standart sıçan yemiyle beslenen MS (G3) ve

Çinko eksik diyetle beslenen MS (G4) gruplarında elde ettik. Diyetteki inko eksikliği miRNA300 ve miRNA450 gen ekspresyon düzeylerinde ilave bir baskılanma meydana getirmedi. Buna karşın MS ve çinko eksik MS gruplarında önemli şekilde baskılanan miRNA300 ve miRNA450 gen ekspresyon düzeyleri çinko desteğiyle kontrol değerlerine ulaştı.

MS ilerlemesini ngren olası prognostik biyobelirteçler olarak miRNA'lar 300 ve 450'nin klinik önemi henüz araştırılmadığından yola çıkan Ibrahim ve arkadaşları (82) gerçekleştirdikleri çalışmalarında tekrarlayan ve sekonder progressif MS hastalarının serumunda sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha düşük miRNA300 ve miRNA450 seviyeleri bildirmiştir (82). Sonuç olarak yazarlar bahsedilen çalışmalarında miRNA-300 ve miRNA450 nin MS hastalarında bu biyobelirteçlerin MS hastalarının takibi için kullanılabileceğini önermişlerdir.

Çalışmamızda MS ve çinko eksik MS gruplarında elde ettiğimiz corpus callosumdaki baskılanmış miRNA300 ve miRNA450 gen ekspresyon düzeyleri yukarıda bahsedilen Ibrahim ve arkadaşlarının çalışmasının (82) bulgularıyla güçlü bir uyum gösterir. Ayrıca alışmamızda MS sıçan modelinde diyetle çinko ilavesinin MS hastalığının biyobelirteçlerinden olan miRNAr300 ve miRNA450 gen ekspresyon düzeylerindeki baskılanmayı ortadan kaldırması kritik bir bulgudur. Çinko MS'in biyobelirteçlerinden olan miRNA300 ve miRNA450 gen ekspresyonunun bir aktivatörü olabilir. Çinko MS için gerçekleştirilen deneysel ve klinik araştırmalarında yeni bir çalışma alanı olarak umut vaat edebilir.

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak düşünüldüğünde çinko desteği almayan MS gruplarında (G3 ve 4) gözlenen motor fonksiyon kaybı, corpus callosumdaki baskılanan ZnT3, ZnT4, Klotho, NZF2b, Mir300 ve Mir450 gen ifadeleri ile artan MBP, Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ifadelerindeki değişiklikler çinko desteğiyle ortadan kaldırılmıştır.

Bu çalışmanın bulguları çinkonun deneysel MS modellerinde corpus callosumda önemli bir molekül olabileceğine işaret etmektedir.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

1.Çalışmamızda sıçanlarda deneysel MS modelinin gerçekleşip-gerçekleşmediğinin belirlenmesinde rotarod testi ve corpus callosumdaki MBP gen ifadesi analizi uygulanmıştır. Çinko takviyesi almayan MS gruplarının (G3 ve 4) rotarod performansları önemli ölçüde baskılanırken; yine takviye almayan MS gruplarının (G3 ve 4) corpus callosumdaki MBP gen ekspresyonları diğer grupların tamamından daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular çalışmamızda cuprizonla indüklenmiş MS modelinin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

2.Çinko desteği (G5), takviye almayan gruplarda düşen (G3 ve 4) motor fonksiyonu kontrol değerlerine yaklaştırırken, yine çinko desteği (G5) takviye almayan gruplarda (G3 ve 4) corpus callosumdaki artan MBP gen ekspresyonlarını kontrol değerlerine ulaştırmıştır.

3.Takviye almayan MS grubunda (G3) artan corpus callosumdaki Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ekspresyon seviyeleri, takviye almayan çinko eksik MS grubunda (G4) daha da şiddetli bir artış gösterdi. Çinko desteği (G5) takviye almayan MS gruplarında artan Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ekspresyon seviyelerini tersine çevirerek kontrol grubu ile benzer değerlere ulaştırdı.

4.Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, Mir300 ve Mir450 gen ekspresyonlarının corpus callosumdaki en düşük düzeyleri takviye almayan MS gruplarında (G3 ve 4) elde edildi. Çinko desteğinin (G5) bu değişiklikleri kontrol grubu değerlerine ulaştırdığı sonucuna vardık.

Çalışmamızda sonuç olarak takviye almayan MS gruplarında (G3 ve 4) gözlenen motor fonksiyon kaybı, corpus callosumda baskılanan ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, Mir300 ve Mir450 gen ifadeleri ile artan MBP, Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ifadelerindeki değişiklikler çinko desteğiyle ortadan kaldırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları çinkonun deneysel MS modellerinde önemli bir molekül olabileceğine işaret etmektedir.

5.Gelecekteki çalışmalarda deneysel MS modellerinde hastalığın daha uzun sürelerde ve değişik çinko dozlarıyla (çinko eksik ve takviye) ilişkisinin araştırılmasının yanı sıra, bu ilişkilerin sadece gen düzeyinde değil histopatolojik değişikliklerle de desteklenmesi önemli bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J, Group MS, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;23(8):1123-36.
2. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(3):a028936.
3. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-4.
4. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. Expert review of neurotherapeutics. 2013;13(sup2):3-9.
5. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Annals of neurology*. 2018;83(1):13-26.
6. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(7):1900-13.
7. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2006;253(1):98-108.
8. Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the neurological sciences*. 2009;277:S3-S8.
9. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020;26(14):1816-21.
10. Munk Nielsen N, Corn G, Frisch M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Wohlfahrt J, et al. Multiple sclerosis among first-and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study. *Brain*. 2019;142(6):1587-97.
11. Forouhari A, Taheri G, Mehri S, Mahmood M, Etemadifar M. Multiple sclerosis epidemiology in Asia and Oceania; A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2021:103119.
12. Baranzini SE, Oksenberg JR. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. *Trends in genetics*. 2017;33(12):960-70.
13. Thompson CC, Potter GB. Thyroid hormone action in neural development. *Cerebral cortex*. 2000;10(10):939-45.
14. Zhang M, Zhan XL, Ma ZY, Chen XS, Cai QY, Yao ZX. Thyroid hormone alleviates demyelination induced by cuprizone through its role in remyelination during the remission period. *Experimental Biology and Medicine*. 2015;240(9):1183-96.
15. Silvestroff L, Bartucci S, Pasquini J, Franco P. Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination. *Experimental neurology*. 2012;235(1):357-67.
16. Zhang M, Ma Z, Qin H, Yao Z. Thyroid hormone potentially benefits multiple sclerosis via facilitating remyelination. *Molecular neurobiology*. 2016;53(7):4406-16.
17. Fernandez M, Giuliani A, Pirondi S, D'Intino G, Giardino L, Aloe L, et al. Thyroid hormone administration enhances remyelination in chronic demyelinating inflammatory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(46):16363-8.
18. Farsetti A, Mitsuhashi T, Desvergne B, Robbins J, Nikodem VM. Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(34):23226-32.

19. Vitales-Noyola M, Ramos-Levi AM, Martínez-Hernández R, Serrano-Somavilla A, Sampedro-Nuñez M, González-Amaro R, et al. Pathogenic Th17 and Th22 cells are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. *Endocrine*. 2017;57(3):409-17.
20. Esfahanian F, Ghelich R, Rashidian H, Jadali Z. Increased levels of serum interleukin-17 in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2017;21(4):551.
21. Payghani C, Khani F, Zadeh AR, Reisi P, Alaei H, Rashidi B. The effect of levothyroxine on serum levels of interleukin 10 and interferon-gamma in rat model of multiple sclerosis. *Advanced biomedical research*. 2017;6.
22. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang Y, Xiao B, Kivisakk P, Fredrikson S, et al. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-b-1b treatment. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(5):554.
23. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*. 2006;296(23):2832-8.
24. Munger KL, Zhang S, O'reilly E, Hernan M, Olek M, Willett W, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62(1):60-5.
25. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2008;14(9):1220-4.
26. Shahbeigi S, Pakdaman H, Fereshtehnejad S-M, Nikraves E, Mirabi N, Jalilzadeh G. Vitamin d3 concentration correlates with the severity of multiple sclerosis. *International journal of preventive medicine*. 2013;4(5):585.
27. Thouvenot E, Orsini M, Daures JP, Camu W. Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing–remitting multiple sclerosis. *European journal of neurology*. 2015;22(3):564-9.
28. Oliveira SR, Simão AN, Alfieri DF, Flauzino T, Kallaur AP, Mezzaroba L, et al. Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *Journal of the neurological sciences*. 2017;381:213-9.
29. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr K-M, Aksnes L, Mørk SJ, Bø L. Dietary vitamin D3 supplements reduce demyelination in the cuprizone model. *PloS one*. 2011;6(10):e26262.
30. de la Fuente AG, Errea O, van Wijngaarden P, Gonzalez GA, Kerninon C, Jarjour AA, et al. Vitamin D receptor–retinoid X receptor heterodimer signaling regulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *Journal of Cell Biology*. 2015;211(5):975-85.
31. Khoo A-L, Chai LY, Koenen HJ, Oosting M, Steinmeyer A, Zuegel U, et al. Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to Mycobacterium tuberculosis through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. *Cytokine*. 2011;55(2):294-300.
32. Barrera D, Díaz L, Noyola-Martínez N, Halhali A. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies. *Nutrients*. 2015;7(8):6465-90.
33. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. *European journal of immunology*. 2008;38(8):2210-8.
34. Lysandropoulos AP, Jaquiéry E, Jilek S, Pantaleo G, Schluep M, Du Pasquier RA. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early

multiple sclerosis and healthy control subjects. *Journal of neuroimmunology*. 2011;233(1-2):240-4.

35. Hayes CE, Hubler SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE. Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2015;6:100.

36. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1146-60.

37. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Tervaert JW, Damoiseaux J, et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2009;4(8):e6635.

38. Tobore TO. Towards a comprehensive etiopathogenetic and pathophysiological theory of multiple sclerosis. *International journal of neuroscience*. 2020;130(3):279-300.

39. Røsjø E, Lossius A, Abdelmagid N, Lindstrøm JC, Kampman MT, Jørgensen L, et al. Effect of high-dose vitamin D3 supplementation on antibody responses against Epstein–Barr virus in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;23(3):395-402.

40. Rolf L, Muris A-H, Mathias A, Du Pasquier R, Konecny I, Disanto G, et al. Exploring the effect of vitamin D3 supplementation on the anti-EBV antibody response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018;24(10):1280-7.

41. Mikirova NA, Hunninghake R. Effect of high dose vitamin C on Epstein-Barr viral infection. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2014;20:725.

42. Ferrè L, Filippi M, Esposito F. Involvement of Genetic Factors in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020;14:409.

43. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2017;19(1):1.

44. Peterson LK, Fujinami RS. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184(1-2):37-44.

45. Hunter SF. Overview and diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016;22(6 Suppl):s141-s50.

46. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handbook of clinical neurology*. 2014;122:269-90.

47. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *European neurology*. 2014;72(Suppl. 1):1-5.

48. Ömerhoca S, Akkaş SY, İçen NK. Multiple sclerosis: diagnosis and differential diagnosis. *Archives of Neuropsychiatry*. 2018;55(Suppl 1):S1.

49. Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, Banwell B, de Stefano N, Enzinger C, et al. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2021.

50. Gholamzad M, Ebtekar M, Ardestani MS, Azimi M, Mahmodi Z, Mousavi MJ, et al. A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflammation Research*. 2019;68(1):25-38.

51. Arrambide G, Iacobaeus E, Amato MP, Derfuss T, Vukusic S, Hemmer B, et al. Aggressive multiple sclerosis (2): Treatment. *Mult Scler*. 2020;26(9):1352458520924595.

52. Hauser SL, Cree BA. Treatment of multiple sclerosis: a review. *The American Journal of Medicine*. 2020.

53. Inojosa H, Schriefer D, Ziemssen T. Clinical outcome measures in multiple sclerosis: a review. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(5):102512.
54. Baltaci AK, Yuce K, Mogulkoc R. Zinc metabolism and metallothioneins. *Biological trace element research*. 2018;183(1):22-31.
55. Choi BY, Jang BG, Kim JH, Seo J-N, Wu G, Sohn M, et al. Copper/zinc chelation by clioquinol reduces spinal cord white matter damage and behavioral deficits in a murine MOG-induced multiple sclerosis model. *Neurobiology of Disease*. 2013;54:382-91.
56. Choi BY, Jung JW, Suh SW. The emerging role of zinc in the pathogenesis of multiple sclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(10):2070.
57. Coles A. Alastair Compston, Alasdair Coles. *Lancet*. 2008;372:1502-17.
58. Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *Journal of Neuroscience*. 1997;17(3):1055-63.
59. Mato S, Sánchez-Gómez MV, Bernal-Chico A, Matute C. Cytosolic zinc accumulation contributes to excitotoxic oligodendroglial death. *Glia*. 2013;61(5):750-64.
60. Kiedrowski L. Cytosolic acidification and intracellular zinc release in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*. 2012;121(3):438-50.
61. Domercq M, Mato S, Soria FN, Sánchez-gómez MV, Alberdi E, Matute C. Zn²⁺-induced ERK activation mediates PARP-1-dependent ischemic-reoxygenation damage to oligodendrocytes. *Glia*. 2013;61(3):383-93.
62. Liu JS-H, Zhao M-L, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *The American journal of pathology*. 2001;158(6):2057-66.
63. Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, et al. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *Journal of neuroscience research*. 2002;70(4):580-7.
64. Zhang Y, Wang H, Li J, Dong L, Xu P, Chen W, et al. Intracellular zinc release and ERK phosphorylation are required upstream of 12-lipoxygenase activation in peroxynitrite toxicity to mature rat oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(14):9460-70.
65. Li S, Lin W, Tchantchou F, Lai R, Wen J, Zhang Y. Protein kinase C mediates peroxynitrite toxicity to oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2011;48(1):62-71.
66. Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(25):14934-9.
67. Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1999;96(4):1716-21.
68. McAllister BB, Dyck RH. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017;80:329-50.
69. Choi BY, Kim IY, Kim JH, Kho AR, Lee SH, Lee BE, et al. Zinc transporter 3 (ZnT3) gene deletion reduces spinal cord white matter damage and motor deficits in a murine MOG-induced multiple sclerosis model. *Neurobiology of disease*. 2016;94:205-12.

70. Carter RE, Aiba I, Dietz RM, Sheline CT, Shuttleworth CW. Spreading depression and related events are significant sources of neuronal Zn²⁺ release and accumulation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011;31(4):1073-84.
71. Lee J-Y, Kim Y-J, Kim T-Y, Koh J-Y, Kim Y-H. Essential role for zinc-triggered p75^{NTR} activation in preconditioning neuroprotection. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(43):10919-27.
72. Anderson JG, Erikson KM. The importance of trace elements for neurological function. *Handbook of behavior, food and nutrition*: Springer; 2011. p. 423-39.
73. Wang P, Pan R, Weaver J, Jia M, Yang X, Yang T, et al. MicroRNA-30a regulates acute cerebral ischemia-induced blood–brain barrier damage through ZnT4/zinc pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2021;41(3):641-55.
74. Smith J, Xiong S, Markesbery W, Lovell M. Altered expression of zinc transporters-4 and-6 in mild cognitive impairment, early and late Alzheimer’s disease brain. *Neuroscience*. 2006;140(3):879-88.
75. Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo j*. 1999;18(21):6050-61.
76. Lin R, Charlesworth J, Stankovich J, Perreau VM, Brown MA, Consortium A, et al. Identity-by-descent mapping to detect rare variants conferring susceptibility to multiple sclerosis. *PloS one*. 2013;8(3):e56379.
77. Mirshafiey A, Ghalamfarsa G, Asghari B, Azizi G. Receptor tyrosine kinase and tyrosine kinase inhibitors: new hope for success in multiple sclerosis therapy. *Innovations in clinical neuroscience*. 2014;11(7-8):23.
78. Besold AN. New Vistas in Zinc Finger Biochemistry: Examining the Metal-Mediated DNA Recognition of the Neural Zinc Finger Factor/Myelin Transcription Factor Family of Non-Classical Zinc Finger Proteins and Creating Catalytic Moieties from Zinc Finger Scaffolds 2014.
79. Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *The Lancet Neurology*. 2020;19(8):678-88.
80. Satoh J-I, Onoue H, Arima K, Yamamura T. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2005;64(2):129-38.
81. Lescher J, Paap F, Schultz V, Redenbach L, Scheidt U, Rosewich H, et al. MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology*. 2012;246(1-2):27-33.
82. Ibrahim SH, El-Mehdawy KM, Seleem M, El-Sawalhi MM, Shaheen AA. Serum ROCK2, miR-300 and miR-450b-5p levels in two different clinical phenotypes of multiple sclerosis: Relation to patient disability and disease progression. *Journal of neuroimmunology*. 2020;347:577356.
83. Freiesleben S, Hecker M, Zettl UK, Fuellen G, Taher L. Analysis of microRNA and gene expression profiles in multiple sclerosis: integrating interaction data to uncover regulatory mechanisms. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-14.
84. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*. 2006;129(12):3165-72.

85. Tarozzi A. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From preclinical studies to clinical applications. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020. p. 1223.
86. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *nature*. 1997;390(6655):45-51.
87. Ahmadi M, Aleagha MSE, Harirchian MH, Yarani R, Tavakoli F, Siroos B. Multiple sclerosis influences on the augmentation of serum *Klotho* concentration. *Journal of the neurological sciences*. 2016;362:69-72.
88. Aleagha MSE, Siroos B, Ahmadi M, Balood M, Palangi A, Haghighi AN, et al. Decreased concentration of *Klotho* in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2015;281:5-8.
89. Hryszko T, Rydzewska-Rosolowska A, Gozdzikiewicz J, Brzóska S, Koc-Zorawska E, Zelazowska-Rutkowska B. Cholecalciferol supplementation reduces soluble *Klotho* concentration in hemodialysis patients. *Pol Arch Med Wewn*. 2013;123(6):277-81.
90. Chen C-D, Li H, Liang J, Hixson K, Zeldich E, Abraham CR. The anti-aging and tumor suppressor protein *klotho* enhances differentiation of a human oligodendrocytic hybrid cell line. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015;55(1):76-90.
91. Zeldich E, Chen C-D, Avila R, Medicetty S, Abraham CR. The anti-aging protein *Klotho* enhances remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015;57(2):185-96.
92. Plastini MJ, Desu HL, Brambilla R. Dynamic Responses of Microglia in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:269.
93. Tashakori A, Hassanpour S, Vazir B. Protective effect of crocin on cuprizone-induced model of multiple sclerosis in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023;1-13.
94. Dunham N, Miya T. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice** College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed)*. 1957;46(3):208-9.
95. Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor behavioral deficits in the cuprizone model: Validity of the rotarod test paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(19):11342.
96. Han SR, Kang YH, Jeon H, Lee S, Park S-J, Song D-Y, et al. Differential expression of miRNAs and behavioral change in the cuprizone-induced demyelination mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2):646.
97. Mohamed A, Al-Kafaji G, Almahroos A, Almosawi Z, Alalwan H, Abdulla R, et al. Effects of enhanced environment and induced depression on cuprizone mouse model of demyelination. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019;18(1):566-72.
98. Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology letters*. 2007;169(3):205-13.
99. Moore SM, Khalaj AJ, Kumar S, Winchester Z, Yoon J, Yoo T, et al. Multiple functional therapeutic effects of the estrogen receptor β agonist indazole-Cl in a mouse model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(50):18061-6.
100. Ganesan A, Muralidharan P. The Fulcrum of Demyelination in Multiple Sclerosis. *Current Protein & Peptide Science*. 2023.

101. Gutiérrez-Fernández M, de la Cuesta F, Tallón A, Cuesta I, Fernández-Fournier M, Laso-García F, et al. Potential roles of extracellular vesicles as biomarkers and a novel treatment approach in multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):9011.
102. Torres Iglesias G, Fernández-Fournier M, Botella L, Piniella D, Laso-García F, Carmen Gómez-de Frutos M, et al. Brain and immune system-derived extracellular vesicles mediate regulation of complement system, extracellular matrix remodeling, brain repair and antigen tolerance in Multiple sclerosis. 2023.
103. Tian Z, Zhao X, Li Z, Zhang F, Cao F, Li S, et al. Evaluation of myelin basic protein levels with receiver operating characteristic curves for diagnosis of multiple sclerosis. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2009;29(2):250-2.
104. Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, Bolognesi E, Picciolini S, Caputo D, et al. Myelin basic protein in oligodendrocyte-derived extracellular vesicles as a diagnostic and prognostic biomarker in multiple sclerosis: a pilot study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):894.
105. Dave BP, Shah KC, Shah MB, Chorawala MR, Patel VN, Shah PA, et al. Unveiling the modulation of Nogo Receptor in Neuroregeneration and plasticity: Novel aspects and future horizon in a new frontier. *Biochemical Pharmacology*. 2023:115461.
106. Kalafatakis I, Papagianni F, Theodorakis K, Karagogeos D. Nogo-A and LINGO-1: Two Important Targets for Remyelination and Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4479.
107. Ineichen BV, Plattner PS, Good N, Martin R, Linnebank M, Schwab ME. Nogo-A antibodies for progressive multiple sclerosis. *CNS drugs*. 2017;31(3):187-98.
108. Kellner Y, Fricke S, Kramer S, Iobbi C, Wierenga CJ, Schwab ME, et al. Nogo-A controls structural plasticity at dendritic spines by rapidly modulating actin dynamics. *Hippocampus*. 2016;26(6):816-31.
109. Espírito-Santo S, Coutinho VG, Dezone RS, Stipursky J, dos Santos-Rodrigues A, Batista C, et al. Astrocytes as a target for Nogo-a and implications for synapse formation in vitro and in a model of acute demyelination. *Glia*. 2021;69(6):1429-43.
110. Espírito-Santo S, Coutinho VG, Gomes FCA. Synaptic pathology in multiple sclerosis: a role for Nogo-A signaling in astrocytes? *Neural Regeneration Research*. 2023;18(1):127.
111. Nheu D, Ellen O, Ye S, Ozturk E, Pagnin M, Kertadjaja S, et al. Modulation of the Microglial Nogo-A/NgR Signaling Pathway as a Therapeutic Target for Multiple Sclerosis. *Cells*. 2022;11(23):3768.
112. Gumus H, Baltaci SB, Unal O, Gulbahce-Mutlu E, Mogulkoc R, Baltaci AK. Zinc Ameliorates Nogo-A Receptor and Osteocalcin Gene Expression in Memory-Sensitive Rat Hippocampus Impaired by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin. *Biological Trace Element Research*. 2022:1-6.
113. Baltaci AK, Mogulkoc R. Leptin and zinc relation: in regulation of food intake and immunity. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(Suppl 3):S611-S6.
114. King JC, Brown KH, Gibson RS, Krebs NF, Lowe NM, Siekmann JH, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—zinc review. *The Journal of nutrition*. 2015;146(4):858S-85S.
115. Sun R, Wang J, Feng J, Cao B. Zinc in cognitive impairment and aging. *Biomolecules*. 2022;12(7):1000.
116. Levaot N, Hershfinkel M. How cellular Zn²⁺ signaling drives physiological functions. *Cell Calcium*. 2018;75:53-63.

117. Elitt CM, Fahrni CJ, Rosenberg PA. Zinc homeostasis and zinc signaling in white matter development and injury. *Neuroscience Letters*. 2019;707:134247.
118. Popescu BF, Frischer JM, Webb SM, Tham M, Adiele RC, Robinson CA, et al. Pathogenic implications of distinct patterns of iron and zinc in chronic MS lesions. *Acta neuropathologica*. 2017;134:45-64.
119. Earl C, Chantry A, Mohammad N, Glynn P. Zinc ions stabilise the association of basic protein with brain myelin membranes. *Journal of neurochemistry*. 1988;51(3):718-24.
120. Riccio P, Giovannelli S, Bobba A, Romito E, Fasano A, Bleve-Zacheo T, et al. Specificity of zinc binding to myelin basic protein. *Neurochemical research*. 1995;20:1107-13.
121. Tsang D, Tsang Y, Ho W, Wong R. Myelin basic protein is a zinc-binding protein in brain: possible role in myelin compaction. *Neurochemical research*. 1997;22:811-9.
122. Choi BY, Jeong JH, Eom J-W, Koh J-Y, Kim Y-H, Suh SW. A Novel Zinc Chelator, 1H10, Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating Zinc Toxicity and AMPK Activation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):3375.
123. Ni H, Feng X, Xiao Z-j, Tao L-y, Jin M-f. Dynamic pattern of gene expression of ZnT-4, caspase-3, LC3, and PRG-3 in rat cerebral cortex following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures. *Biological trace element research*. 2011;143:1607-15.
124. Braidy N, Poljak A, Marjo C, Rutledge H, Rich A, Jugder B-E, et al. Identification of cerebral metal ion imbalance in the brain of aging Octodon degus. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9:66.
125. Ni H, Zhang LL, Ren SY, Sun BL. Long-term expression of zinc transporters in hippocampus following penicillin-induced developmental seizures and its regulation by E-64d. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(1):208-14.
126. Torbus-Paluszczak M, Bartman W, Adamczyk-Sowa M. Klotho protein in neurodegenerative disorders. *Neurological Sciences*. 2018;39:1677-82.
127. Abraham CR, Chen C, Cuny GD, Glicksman MA, Zeldich E. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future medicinal chemistry*. 2012;4(13):1671-9.
128. Torres P-U, Prie D, Molina-Bletry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney international*. 2007;71(8):730-7.
129. Buchanan S, Combet E, Stenvinkel P, Shiels PG. Klotho, aging, and the failing kidney. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:560.
130. Moos WH, Faller DV, Glavas IP, Harpp DN, Kanara I, Mavrikakis AN, et al. Klotho pathways, myelination disorders, neurodegenerative diseases, and epigenetic drugs. *BioResearch open access*. 2020;9(1):94-105.
131. Zeldich E, Chen C-D, Avila R, Medicetty S, Abraham CR. The anti-aging protein Klotho enhances remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015;57:185-96.
132. Chen C-D, Rudy MA, Zeldich E, Abraham CR. A method to specifically activate the Klotho promoter by using zinc finger proteins constructed from modular building blocks and from naturally engineered Egr1 transcription factor backbone. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020;34(6):7234.

133. Toan NK, Tai NC, Kim SA, Ahn SG. Soluble Klotho regulates bone differentiation by upregulating expression of the transcription factor EGR-1. *FEBS letters*. 2020;594(2):290-300.
134. Chandrasekar V, Dreyer J-L. The brain-specific Neural Zinc Finger transcription factor 2b (NZF-2b/7ZFMyt1) causes suppression of cocaine-induced locomotor activity. *Neurobiology of Disease*. 2010;37(1):86-98.
135. Matsushita F, Kameyama T, Marunouchi T. NZF-2b is a novel predominant form of mouse NZF-2/MyT1, expressed in differentiated neurons especially at higher levels in newly generated ones. *Mechanisms of development*. 2002;118(1-2):209-13.
136. Chen Y, Huang T, Yu Z, Yu Q, Wang Y, Hu Ja, et al. The functions and roles of sestrins in regulating human diseases. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2022;27(1):1-24.
137. Liu X, Li M, Zhu J, Huang W, Song J. Sestrin2 protects against traumatic brain injury by reinforcing the activation of Nrf2 signaling. *Human & Experimental Toxicology*. 2021;40(7):1095-111.
138. Kumar A, Dhiman D, Shaha C. Sestrins: Darkhorse in the regulation of mitochondrial health and metabolism. *Molecular Biology Reports*. 2020;47:8049-60.
139. Sun W, Wang Y, Zheng Y, Quan N. The emerging role of sestrin2 in cell metabolism, and cardiovascular and age-related diseases. *Aging and disease*. 2020;11(1):154.
140. Wang P, Zhao Y, Li Y, Wu J, Yu S, Zhu J, et al. Sestrin2 overexpression attenuates focal cerebral ischemic injury in rat by increasing Nrf2/HO-1 pathway-mediated angiogenesis. *Neuroscience*. 2019;410:140-9.
141. Odabas FO, Uca AU, Akdag T, Demirdögen F, Altas M, Tokgoz OS. Possible roles of sestrin2 in multiple sclerosis and its relationships with clinical outcomes. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2022;80:399-404.
142. Baulina N, Kiselev I, Kozin M, Kabaeva A, Boyko A, Favorova O. Male-specific coordinated changes in expression of miRNA genes, but not other genes within the DLK1-DIO3 locus in multiple sclerosis. *Gene*. 2022;836:146676.
143. Chang Y, Zhou C, Fan L, Qiu G, Wang G, Wei G, et al. Upregulation of microRNA-300 induces the proliferation of liver cancer by downregulating transcription factor FOXO1. *Oncology reports*. 2018;40(6):3561-72.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Cuprizonla İndüklenmiş Sıçan Multipl Skleroz Modelinde Çinko Eksikliği Ve Desteğinin Corpus Callosum Dokusundaki Moleküler Fonksiyonlar Üzerine Etkileri

Dr. Süeda Ecem Yılmaz
Nöroloji Anabilim Dalı

Danışman
Prof. Dr. Haluk GÜMÜŞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ/KONYA-2023

Bu çalışmanın amacı, cuprizonla indüklenmiş sıçan Multipl Skleroz (MS) modelinde çinko eksikliği ve desteğinin corpus callosum dokusundaki moleküler fonksiyonlar üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma Wistar cinsi 46 adet erişkin erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan hayvanlar 5 gruba (G) ayrıldı (Kontrol 6, diğer gruplar 10). G1, Kontrol. G2, Sham-MS: Sıçanlara Cuprizon'nun içinde çözöldüğü Karboksi-metil-seluloz (KMS) çözeltisi günlük yem tüketiminin %1'i oranında 8 hafta boyunca günlük olarak gavaj yoluyla verildi. G3, 4 ve 5'teki hayvanlara 8 hafta boyunca günlük olarak yem tüketiminin %1'i oranında cuprizon, KMS solusyonu içerisinde gavaj yoluyla verilerek MS oluşturuldu. G4 çinko eksik (50 µg/kg çinko) diyetle beslendi. G5'e intraperitoneal (ip) çinko sülfat (5 mg/kg/gün) takviyesi yapıldı. Hayvanlarda MS oluşumu Rotarod testleri ve Myelin Basic Protein (MBP) gen ekspresyon analiziyle belirlendi. Uygulamaların bitiminde sakrifiye edilen hayvanların corpus callosum doku örneklerinde MBP, Nogo-A, NgR, NZF2b, ZnT3, ZnT4, SESN2, Klotho, MiRNA300 ve MiRNA450 Real-Time-PCR yöntemi ile tayin edildi.

Tedavi almayan MS grubunda (G3) artan corpus callosumdaki Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ekspresyon seviyeleri ($P<0,05$), tedavi almayan çinko eksik MS grubunda (G4) daha da şiddetli bir artış gösterdi ($P<0,05$). Çinko desteği (G5) bu değişiklikleri tersine çevirdi ($P<0,05$). ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, MiRNA300 ve MiRNA450 gen ekspresyonlarının corpus callosumdaki en düşük düzeyleri tedavi almayan MS gruplarında elde edildi ($P<0,05$). Çinko desteği (G5) bu değişiklikleri ortadan kaldırdı ($P<0,05$).

Sonuç olarak mevcut çalışmada çinko desteği, MS gruplarında (G3 ve 4) corpus callosumda ortaya çıkan ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, Mi300, MiRNA450, MBP, Nogo-A, Nogo R ve SESN2 gen ifadelerindeki değişiklikleri ortadan kaldırmıştır.

Bu çalışmanın bulguları çinkonun deneysel MS modellerinde önemli bir molekül olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cuprizon, Multipl Skleroz, Corpus Callosum, Çinko, Sıçan.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELCUK UNIVERSITY
MEDICAL FACULTY

Effects of Zinc Deficiency and Supplementation on Molecular Functions in Corpus Callosum Tissue in a Cuprizone-Induced Rat Multiple Sclerosis Model

Dr. Süeda Ecem Yılmaz
Department Of Neurology

Thesis Advisor
Prof. Dr. Haluk GÜMÜŞ

MEDICAL SPECIALTY THESIS /KONYA-2023

The aim of this study was to investigate the effects of zinc deficiency and supplementation on the molecular functions of the corpus callosum tissue in a cuprizone-induced rat Multiple Sclerosis (MS) model.

The study was carried out on 46 adult male rats of the genus Wistar. The animals used in the study were divided into 5 groups (G) (Control 6, other groups 10). G1, Control. G2, Sham-MS: Carboxy-methyl-cellulose (KMS) solution in which Cuprizone was dissolved was given to rats by gavage daily for 8 weeks at the rate of 1% of daily feed consumption. MS was formed by giving 1% of the daily feed consumption cuprizone in KMS solution by gavage to the animals in G3, 4 and 5 for 8 weeks. G4 was fed with a zinc deficient (50 µg/kg zinc) diet. G5 was given intraperitoneal (ip) zinc sulfate (5 mg/kg/day) supplementation. MS formation in animals was determined by Rotarod tests and Myelin Basic Protein (MBP) gene expression analysis. MBP, Nogo-A, NgR, NZF2b, ZnT3, ZnT4, SESN2, Klotho, MiRNA300 and MiRNA450 were determined by Real-Time-PCR method in corpus callosum tissue samples of sacrificed animals at the end of the treatments.

Nogo-A, Nogo R, and SESN2 gene expression levels in the corpus callosum, which were increased in the untreated MS group (G3) ($P<0.05$), were even more severely increased in the untreated zinc-deficient MS group (G4) ($P<0.05$). Zinc supplementation (G5) reversed these changes ($P<0.05$). The lowest levels of ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, MiRNA300 and MiRNA450 gene expressions in the corpus callosum were obtained in the untreated MS groups ($P<0.05$). Zinc supplementation (G5) abolished these changes ($P<0.05$).

As a result, in the present study, zinc supplementation abolished the changes in ZnT3, ZnT4, Klotho NZF2b, MiRNA300, MiRNA450, MBP, Nogo-A, Nogo R and SESN2 gene expressions in the corpus callosum in MS groups (G3 and 4).

The findings of this study indicate that zinc may be an important molecule in experimental MS models.

Keywords: Cuprizone, Multiple Sclerosis, Corpus Callosum, Zinc, Rat.