



**MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA WNT
SİNYAL YOLAĞINDA GÖREV ALAN miRNA
EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

EZGİ YAŞAR
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Ü. Eda BALKAN

Doktora Tezi-2019

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA WNT SİNYAL
YOLAĞINDA GÖREV ALAN miRNA EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Ezgi YAŞAR

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Ü. Eda BALKAN**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA WNT SİNYAL YOLAĞINDA
GÖREV ALAN miRNA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Ezgi YAŞAR

Tez Savunma Tarihi : 06.08.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Eda BALKAN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan DOĞAN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Nuray BİLGE (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ
(Erzurum Teknik Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN
(Erzurum Teknik Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Multiple Skleroz	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçesi.....	3
2.1.3. MS'in Epidemiyolojisi ve Etyopatogenezi	4
2.1.4. MS ve Genetik	6
2.1.5. MS'in Klinik Belirti ve Bulguları.....	7
2.1.6. MS'in Klinik Tipleri	8
2.1.6.1. Klinik İzole Sendrom.....	9
2.1.6.2. Relapsing-Remitting MS (RRMS).....	9
2.1.6.3. Primer Progresif MS (PPMS)	10
2.1.6.4. Sekonder Progresif MS (SPMS)	10
2.1.6.5. Progresif Tekrarlayan MS (PTMS).....	10
2.1.7. MS'in Tanısı	10
2.1.8. MS'in Tedavisi	12
2.2. miRNA'lar	12
2.2.1. Tanım	12

2.2.2. miRNA'ların Tarihçesi	13
2.2.3. miRNA Biyogenezi.....	14
2.2.4 miRNA ve Epigenetik:.....	15
2.2.5. miRNA'ların Tıpta Kullanım Alanları	16
2.2.6. miRNA ve MS	17
2.3. WNT Sinyal Yolağı	18
2.3.1. WNT Sinyal Yolağı ve MS.....	19
2.4. Real Time PCR (RT-PCR)	20
2.4.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green	20
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Araştırmanın Türü ve Etik Yönü	22
3.2. Materyal	22
3.2.1. Çalışma Grubu	22
3.2.1.1. Çalışmaya Dâhil Edilme Koşulları	23
3.2.1.2. Çalışmadan Dışlanma Koşulları	23
3.3. Metot.....	23
3.3.1. Kandan Plazma Eldesi	23
3.3.2. Plazma Örneklerinden miRNA Eldesi.....	23
3.3.3. cDNA (kalıp DNA) Eldesi.....	24
3.3.4. cDNA'nın Zenginleştirilmesi	25
3.3.5. RT-PCR	26
3.3.6. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Demografik Veriler.....	28
4.2. miRNA Ekspresyon Analizleri	28

5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	42
EKLER	60
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	60
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	61
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	62
EK-4. RRMS HASTALARINA AİT DEMOGRAFİK VERİLER VE miRNA EKSPRESYON SEVİYELERİ.....	63

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında katkılarını esirgemeyen, eğitimim süresince her ihtiyacım olduğunda daima yanımda olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Eda BALKAN'a en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince sadece eğitimime değil, kişisel gelişim sürecime de katkıda bulunan, eşsiz bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Hasan DOĞAN'a, tez kapsamında örnek toplamında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Nuray BİLGE'ye, yoğun çalışma temposuna rağmen yardımlarını benden esirgemeyen İsmail Hakkı TAŞ'a ve tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan değerli Tıbbi Biyoloji Laboratuvar Personeline, bu çalışmayı 2019-6849 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Projeleri Koordinatörlüğüne, tezimin tüm aşamalarına katkıda bulunarak tamamlanmasına yardımcı olan, hayatıma anlam katan, bana öğrencilik ve hekimlik hayatım boyunca en önemli desteği veren bir tanecik Eşim'e, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Annem ve Babam'a, tez yazımında yüzümü güldüren güzeller güzeli canım Kızım'a, Teşekkürü bir borç bilirim.

Arş. Gör. Dr. Ezgi YAŞAR

ÖZET

Multiple Skleroz Hastalarında WNT Sinyal Yolağında Görev Alan miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Amaç: Multiple Skleroz (MS) inflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize otoimmün merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Son çalışmalarda WNT sinyal yolunun miyelinizasyon sürecinde negatif bir faktör olduğu gösterilmiştir. miRNA'lar hedef genleri baskılayarak hücrenin gelişim, farklılaşma, çoğalma ve hücrenin ölümü gibi süreçlerde rol oynayan protein kodlamayan RNA'lardır. Bir çok yolakta olduğu gibi miRNA'lar WNT sinyal yolunun düzenlenmesinde de etkilidir. Çalışmamızda WNT sinyal yolağında görev alan genleri hedefleyen miRNA'lar (miR-145, miR-301b , miR-214, miR-190a, miR-1304) ekspresyon seviyelerine bakıldı. MS ve WNT sinyal yolağı arasındaki ilişkinin anlaşılması, elde edilecek sonuçlar ile MS'in etiyolojisinin aydınlatılmasında, tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kliniğe ve literatüre katkı sağlamak amacıyla çalışmamız gerçekleştirildi.

Materyal ve Metot: Çalışmamıza alınan MS tanılı (17) hastanın hem atak hem de remisyon dönemlerinde kan örnekleri alındı. Çalışmaya katılan kontrol grubundan (16) kan örneği alınarak, RT-PCR yöntemi kullanılarak çalışmamıza alınan miRNA'ların ekspresyon düzeylerine kantitatif olarak bakıldı.

Bulgular: Kontrol grubu ile kıyaslandığında; MS atak dönemine ait miRNA seviyelerinin (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a ve miR-1304) kat artış değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, Remisyon dönemine ait tüm miRNA seviyelerinin kat artış değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar (sırasıyla; $p=0.010$, $p=0.023$, $p=0.002$, $p=0.006$, $p=0.003$) tespit edilmiştir. Hastaların kullandığı ilaçlara ve atak sayılarına göre bakıldığında ise miRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, MS'in klinik seyri ve genetik mekanizmasının aydınlatılmasında özellikle remisyon döneminde WNT sinyal yolağında etkili olan miRNA ekspresyon düzeylerinin rolü olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: miRNA, multiple skleroz, WNT sinyal yolağı

ABSTRACT

Determination of miRNA Expression Levels Involved in the WNT Signaling Pathway in Multiple Sclerosis Patients

Aim: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune central nervous system disease characterized by inflammation, demyelination and axon damage. Recent studies have shown that the WNT signaling pathway is a negative factor in the myelination process. miRNAs are protein-encoding RNA's that play a role in processes such as cell growth, differentiation, proliferation, and cell death by suppressing target genes. As in many pathways, miRNAs are also effective in regulating the WNT signaling pathway. In our study, expression levels of miRNAs (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a, miR-1304) targeting genes involved in the WNT signaling pathway were examined. Our study was carried out to understand the relationship between MS and WNT signaling pathway, to clarify the etiology of MS, to determine the treatment strategies and to contribute to the clinic and literature.

Material and Method: Blood samples were obtained from both the attack and remission periods of the patient with MS (17). Blood samples were taken from the control group (16) and the expression levels of miRNAs were evaluated quantitatively by using the RT-PCR method.

Results: When compared with the control group; While there was no statistically significant difference in miRNA levels (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a, miR-1304) in MS attack period, there was no statistically significant difference in terms of fold increase values of all miRNA levels of remission period. statistically significant differences ($p = 0.010$, $p = 0.023$, $p = 0.002$, $p = 0.006$, $p = 0.003$, respectively). There was no statistically significant difference in miRNA expression levels according to the drugs used and the number of attacks.

Conclusion: In our study, it was concluded that miRNA expression levels, which are effective in the WNT signaling pathway, may play a role in clarifying the clinical course and genetic mechanism of MS, especially during remission.

Key Words: miRNA, multiple sclerosis, WNT signaling pathway

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOS	: Beyin Omirlik Sıvısı
C. Elegans	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CTNNB1	: Catenin Beta
DGCR8	: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
FTY720	: Fingolimod
FZD	: Frizzled
GA	: Glatiramer Asetat
GWAS	: Genome Wide Association Study
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
IFN	: Interferon
IFN-β-1b	: İnterferon-Beta-1b
IL7R	: İnterlökin 7 Reseptör α Zinciri Reseptörü
KIR	: Katil İmmünoglobulin Benzeri Reseptörler
KIS	: Klinik İzole Sendrom ,
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
miRNA	: MikroRNA
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Multiple Skleroz
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
NO	: Nitrik Oksit

OKB	: Oligoklonal Band
OL	: Oligodentrosit
ON	: Optik Nörit
PPMS	: Primer Progresif MS
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNA Pol III	: RNA Polimeraz III
RRMS	: Relapsing Remitting MS
RT-PCR	: Real Time PCR
SPMS	: Sekonder Progresif MS
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TCF	: Transkripsiyon Faktör
TGF	: Transforming Growth Factor
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
XPO5	: Exportin-5
WNT	: Wingless Type

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. miRNA biyosentezi	15
Şekil 2.2. WNT sinyal yolağı	19
Şekil 2.3. SYBR green yöntemi.....	21
Şekil 3.1. Çalışmamıza ait rotor-gene Q RT-PCR aplikasyon eğrileri.....	27
Şekil 4.1. Çalışma gruplarına ait miRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki kat artış grafiğı.....	29
Şekil 4.2. Grup 1 (atak dönem MS)'e ait miRNA regülasyon grafiğı.....	32
Şekil 4.3. Grup 2 (remisyon dönem MS)'e ait miRNA regülasyon grafiğı.....	33
Şekil 4.4. Örnek bazında tüm miRNA verilerine ait hiyerarşik küme analizi.....	34
Şekil 4.5. Grup bazında tüm miRNA verilerine ait hiyerarşik küme analizi.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Birinci derece akrabalarda topluma kıyasla MS'in risk oranları.	6
Tablo 2.2. MS hastalığının klinik belirtileri ve görülme sıklığı.....	8
Tablo 2.3. 2017 McDonald tanı kriterleri	11
Tablo 3.1. cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları.....	25
Tablo 3.2. cDNA'nın zenginleştirilmesi için bileşenleri ve miktarları	25
Tablo 3.3. cDNA'nın zenginleştirilme tepkime sıcaklıkları	25
Tablo 3.4. RT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları	26
Tablo 3.5. RT-PCR tepkime koşulları.....	26
Tablo 4.1. Gruplara ait demografik veriler	28
Tablo 4.2. Çalışma gruplarına ait miRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki kat artış değerleri	30
Tablo 4.3. Gruplara ait p değerleri ve istatistiksel anlamlılık	30
Tablo 4.4. Kullanılan ilaçlara göre p değerleri ve istatistiksel anlamlılık	31
Tablo 4.5. Atak sayılarına göre p değerleri ve istatistiksel anlamlılık.....	31

1. GİRİŞ

Multiple Skleroz (MS) demiyelinizasyon, akson hasarı ve inflamasyon ile karakterize olan merkezi sinir sistemini tutan otoimmün bir hastalık olarak tanımlanır. MS hastalığının etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Miyelin kılıflar, oligodentrositler, akson ve sinir hücreleri hasarlanır. Oligodentrositlerin gelişimi ve onarılmasında görev alan birçok çeşit sinyal ileti yolağı vardır. Sinyal ileti yollarından biri de evrimsel açıdan oldukça korunmuş olan WNT sinyal yoludur. WNT sinyal yolu erişkin dönemde kendisini yenileyebilen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrolünde, embriyonik dönemde ise hücrelerde hücre polaritesi ve proliferasyonunun sağlanması, hücre farklılaşması ve göçünde önemlidir. Ayrıca yapılan literatür çalışmalarında WNT sinyal yolunun miyelinizasyon oluşum sürecinde negatif bir faktör olduğu gösterilmiştir.

miRNA'lar protein kodlamayan RNA'lardır. DNA'dan transkripsiyonu yapılan, proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. miRNA'lar protein kodlayan genlerin eksonik, intronik bölgelerinde ve genler arası bölgelerde bulunabilirler. miRNA bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak hücrel gelişim, farklılaşma, çoğalma, ölümü gibi süreçlerde rol oynar. Birçok hücrel sinyal ileti yolağında olduğu gibi, WNT sinyal yolunun düzenlenmesinde de önemli fonksiyonları vardır. miRNA'lar vücudumuzdaki her türlü sinyal yolağının çalışmasının düzenlenmesinde oldukça önemlidir. miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin artışı veya azalışı sonucunda sinyal yollarının çalışması etkilenir. Sinyal yollarındaki bozukluk başta kanserler ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın etiyolojisinde rol alır. Literatürde WNT sinyal yolağının MS hastalığı üzerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir. Ancak konuyla ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

MS'in erken teşhisinde mevcut klinik bulgular ve moleküler testler yetersiz kalmaktadır.¹ MS ile ilgili yapılan yüzlerce çalışma mevcut olup, henüz tam olarak ne görevli bir gen ne de genetik bir mekanizma keşfedilmiştir. MS ile ilgili çalışmaların çoğunluğu MS etyolojisinden sorumlu polimorfizm çalışmalarıdır. Çalışmamıza WNT sinyal yolunda işlevi olan 5 adet miRNA alınmıştır. Frizzled (FZD) reseptörü üzerine etkili olan FZD7 geninin ifadesini düzenleyen miRNA-145,² TCF/LEF transkripsiyon faktörü üzerine etkili olan TCF4 geninin ifadesini düzenleyen miR-301b,³ β catenin proteini üzerine etkili olan, CTNNB1 geni regülasyonu yapan miR-214,⁴ MAPK sinyali üzerine etkili olan MAPK8 geninin ifadesini düzenleyen miR-190a,⁵ WNT ligand üzerine etkili olan WNT3A geninin ifadesini düzenleyen miRNA-1304⁶ dahil edildi. Çalışmaya alınan WNT sinyal yolağında görev alan miRNA'lar ile MS hastalığı arasındaki genetik ilişkinin olup olmadığını açıklayan ve destekleyen literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Nöroloji Anabilim Dalında MS tanısı almış hastalardan atak dönemi ve remisyon dönemlerinde ayrı ayrı olmak üzere örnek alındı. Çalışmaya dahil edilen miRNA'ların ekspresyon düzeylerine kantitatif olarak bakıldı ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. MS hastalığının etyolojisinin aydınlatılmasında ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde, kliniğe ve literatüre katkıda bulunması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Skleroz

2.1.1. Tanım

Multiple skleroz (MS) Santral sinir sistemin (SSS)' in kronik bir otoimmün, inflamatuvar nörolojik hastalığıdır. Miyelin kılıfların demiyelinizasyonuna sebep olan ataklar ile seyreden, multifaktöriyel etyopatogenezi olan ve sıklıkla genç erişkinleri etkileyen en yaygın nörolojik hastalıklardan biridir.¹ MS'nin seyri çok çeşitlidir ve öngörülemezdir. Hastaların çoğunda hastalık, başlangıçta zaman içinde ilerleyici nörolojik bozulma ile takip edilen, tersine çevrilebilir nörolojik defisit atakları ile karakterizedir. MS yaklaşık 2 milyon kişiyi etkileyen, etkin bir tedavisi olmayan, kadınlarda iki kat daha fazla görülen bir hastalıktır.⁷ MS hastalığının nedeni bilinmemektedir, ancak genetik yatkınlık ve bir virüs, metabolizma veya çevresel faktörler gibi non-genetik bir tetikleyicinin bir kombinasyonunu içerdiği düşünüldüğünde, SSS'de tekrarlayan immün ataklara yol açan otoimmün bir bozukluk ile sonuçlanmaktadır.¹

2.1.2. Tarihçesi

MS, 1878 yılında Fransız bir bilim insanı olan Anatomist Dr. Luis Ranvier sinir hücrelerini koruyan, destekleyen MS hastası olan kişilerde zedelenen miyelini keşfetmişti.⁸ 1933'de Amerikalı bilim insanı olan Dr. Thomas Rivers o güne kadar viral bir hastalık olduğu düşünülen MS'in viral bir hastalık olmadığını, yaptığı hayvan deneylerinde otoimmün bir hastalık olduğunu göstermiştir.⁹ 1959 yılında ise Amerikalı bilim insanı Dr. Philip Paterson T hücrelerinin hastalığın gelişmesinde rolü olduğunu keşfetmiştir. 1960 yılında ise bir grup bilim insanı tarafından yapılan çalışmada MS'li hastaların beyin omurilik sıvısında B hücrelerini tespit etmişler ve bu bilgi tanıda önemli

olarak değerlendirmiştir.¹⁰ Takip eden yıllarda (1960lar ve 1970'lerde) birçok bilim insanı MS'in otoimmün bir hastalık olduğunu onaylamışlardır.¹¹

2.1.3. MS'in Epidemiyolojisi ve Etyopatogenezi

MS en yaygın nörolojik hastalıklardan biridir. Kuzey Avrupa Yerlilerinde bir birey yaşam boyu yaklaşık %0,1-%0,2 MS hastalığı olma riskine sahiptir. Dünyada en fazla MS insidansı Kuzey Avrupa'dadır. Kadınlarda erkeklere göre MS iki kat fazladır.¹² Türkiye'de 40.000 den fazla MS tanısı almış hasta bulunmaktadır. MS riski çevresel, nöroimmün ve genetik faktörlerle ilişkili olmasına rağmen, kesin neden olan faktör bilinmemektedir.

MS, SSS'de enflamasyon, demiyelinizasyon, aksonal hasar ve kayıp ile oluşan plaklara karakterize nörolojik bir hastalıktır. Bu plaklar beyinde ve omurilikte, ventriküller etrafındaki beyaz maddede, optik sinirler ve izler, korpus kallosum, serebellar pedinküller, uzun izler ve omurilik ve beyin sapının subpial bölgelerinde MS'in tüm formlarında görülür.¹³

Genel olarak hastalarda, demiyeline aksonlar, azalmış sayıda oligodendrosit, astrosit proliferasyonu, translasyonlu aksonlar, lenfositlerin ve makrofajların parankimal sızıntılarını içeren fokal inflamatuvar plaklar gösterilir. İlerici seyirde, MS, yaygın gri ve beyaz madde atrofisi tarafından domine edilir. Plaktaki normal görünen beyaz maddenin, plak dışındaki diffüz yaralanması ile birlikte düşük dereceli enflamasyon ve mikrogliyal aktivasyonla karakterize edilir.¹⁴ Bu seyir sırasında ortaya çıkan enflamasyon, mikrogliyal aktivasyon, aksonal ve miyelin yaralanmaları sekonder demiyelinizasyon izler.¹⁴

MS'in primer veya sekonder progresif seyri ile başvuran hastalarda yaralanan doku kalıpları homojendir. Oligodendrosit kaybı, aksonların hasarı, astrositik gliyoz ve temel kriterlerden oluşan demiyelinizasyon gösterilmiştir.¹⁵ Farklı MS formlarıyla ilişkili demiyelinizasyon ve sonradan nörodejenerasyon, adaptif ve doğal immünitinin çeşitli

bileşenlerini içermektedir.¹⁶ Miyelin kılıfları, aktive edilmiş makrofajlar ve mikroglialar tarafından salınan sitotoksik sitokinler, ekzotoksinler, reaktif oksijen veya nitrik oksit (NO) türleri gibi spesifik olmayan ürünlere karşı özellikle hassastır.¹³ Bununla birlikte, en sık gözlenen demiyelinizasyon kalıpları, antikor ve kompleman ilişkili değişikliklerin yanı sıra, demiyelinizasyonun başlatılmasının, distal oligodendrosit işlemlerinin ve oligositlerin apoptozinin dejenerasyonu sonucu hipoksi benzeri doku hasarıdır. Ayrıca astrositlerin kutupları, perivasküler glia sınırlarının yapısal organizasyonunun bozulmasına neden olur.¹⁷

MS’de epidemiyolojik veriler MS etyolojisi için Epstein-Barr virüsü (EBV), güneşe maruz kalma, D vitamini eksikliği ve sigara gibi çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. EBV veya insan herpes virüsü 4, immün yetkin ve sağlıklı bireylerde genellikle asemptomatik olarak devam eder. Amerika Birleşik Devletleri’nde 18-19 yaş arası yetişkinlerin % 90’ının EBV’ye maruz kaldığı, MS’li hastalarda ise bu oranın %96’nın üzerine olduğu görülmüştür.¹⁸

D vitamini eksikliği olan MS hastalarına D vitamini takviyesi yapıp vitamin düzeyleri normal değerlere çekildiğinde atak sayılarında ciddi azalmalar olduğu literatürde gösterilmiştir. EBV ve D-Vit birbirinden bağımsız risk faktörleridir.¹⁹

MS’te, CD8+ T hücrelerini CD8+ dışındaki T hücreleri, B hücreleri veya plazma hücreleri ile karşılaştırıldığında, CD8+ T hücrelerinin baskın olduğu görülmüştür. SSS’de aktive T lenfositleri sitokin, kemokin ve metoproteinleri salgılar. Aksonal kaybı hızlandıran, demiyelinizasyona sebep olan toksik maddelerin salgılarını arttırarak mikrogliya hücrelerini aktive eder. MS’de akson çevresinde sitotoksik CD8+ T hücrelerinin yoğunluğu gözlenmiştir. Miyelinli aksonların CD8+ T hücreleri aracılı hasara neden olduğunu gösterilmiştir.²⁰ Efektör CD8 T hücreleri, neredeyse her çekirdekli hücre tipinde MHC sınıf I molekülleri tarafından kendilerine sunulan kendi peptitlerini

tanıma yetenekleri göz önüne alındığında MS'in etyopatogenezinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.²¹ MS'in başlıca CD8+ T hücrelerini ve CD4+ T hücrelerini içeren inflamatuvar kaynaklı lezyonlarda başladığına ve mikroglia ve makrofajları aktive ettiğine inanılmaktadır.¹³

2.1.4. MS ve Genetik

Sadece çevresel faktörlerle MS etiyojisi açıklanamamaktadır. MS'in bazı ırklarda daha fazla olması, yapılan ikiz çalışmaları ve yakın akrabalarda MS sıklığının fazla olması genetik etkenlerin önemini göstermektedir (Tablo 2.1). İkiz çalışmalarına bakıldığında hastalığın nedeninin %50 civarının kalıtsal olduğu anlaşılmıştır.^{22, 23} Tüm bu bilgiler ışığında MS kompleks bir genetik hastalıktır denilebilir. Belirli bir kalıtım modeli ile de MS'i açıklamak şu an için mümkün olmamaktadır. Etiyojisi çevresel ve genetik faktörleri içerisine alan multifaktöriyel bir hastalıktır.

Tablo 2.1. Birinci derece akrabalarda topluma kıyasla MS'in risk oranları.

Akrabalık	Tahmini risk (Genel topluma kıyasla)
Ebeveynler	% 2-3
Kardeşler	% 3-5
Ebeveynlerin ikisi de etkilenmişse	% 29.5
Çocuklar	% 2-3

MS riski genetik akrabalık derecesi ile orantılıdır. Bir bireyin MS olma riski, MS hastası olan bir aile üyesine sahip ise doğrusal olmayan bir şekilde artar. Nüfus, aile ve moleküler çalışmalar, genel popülasyonda yaygın olan allel varyantları, poligenik kalıtım modelini desteklemektedir.²⁴

MS'in 1970'lerden bu yana, Kafkas Avrupalılar ve Kuzey Amerikalılarda yapılan çalışmalar sonucunda HLA allelleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Genomik tipleme teknikleri kullanılarak DRB1 * 1501 - DQA1 * 0102 - DQB1 * 0602 haplotip ile

olduğu belirtilmiştir.²⁵ Daha sonra yapılan MS-HLA çalışmalarında özellikle DRB1 * 1501'in MS'te istatistiksel olarak en güçlü genetik risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Özellikle erken yaşta görülen MS hastalarında DRB1 * 1501 allelini taşıma sıklığı ileri yaşlarda ortaya çıkan MS vakalarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca DRB1 * 1501 allelini taşıyan MS hastalarının, taşımayanlara göre hastalığı daha şiddetli geçirdiği istatistiksel olarak gösterilmiştir.²⁶

Katil immünoglobulin benzeri reseptörler (KIR), oldukça polimorfik reseptörlerdir. Doğal öldürücü (NK) hücreler ile HLA varyasyonları arasında ilişki tespit edilmiştir. MS ile NK hücreleri arasındaki ilişki birkaç literatürle sınırlıdır. MS'de ve birçok nörolojik hastalıkta HLA Class I antijenlerinin KIR'ları ligand olarak kullanarak rol aldığı düşünülmektedir. KIR'ların CD4 T hücreleri tarafından da ifade edilebileceği de göz önüne alındığında, KIR çeşitliliğinin spesifik antikor üretimini etkileyebileceği ve dolayısıyla MS'deki immünolojik ilişkileri açıklayabileceği düşünülmektedir.²⁷

MS gelişiminde genetik risk faktörleri arasında yer alan İnterlökün 7 reseptör α zincirini (IL7R)'nin oynadığı roller tam olarak bilinmemektedir.²⁸ Literatürde polimorfizm, (rs:6897932), gen ekspresyon çalışmaları mevcut olup, fonksiyonel bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.²⁸ MS'te yapılan genetik çalışmaların amacı; MS ile ilgili tüm duyarlılık genlerini tanımlamak, DNA varyantlarının MS tutulum, klinik fonksiyonları arasındaki ilişkiyi tanımlamak, HLA ile birlikteliğini anlamak, Gen $\times$ Gen ve Gen $\times$ Çevre etkileşimi profillerini tanımlamak, nadir genetik varyantlardan herhangi biri ile epigenetik değişikliklerin rolünü açıklamak, genetik kontrol altındaki fenotipik sonuçları tanımlamak ve genetik aktarılabilirliğini değerlendirmektir.²⁴

2.1.5. MS'in Klinik Belirti ve Bulguları

MS hastalarında SSS hasarına bağlı olarak her hastada farklı belirti ve bulgular ortaya çıkabilmektedir. Kronik ağrı oldukça yaygındır ve MS'li kişilerin yaşamlarını

önemli ölçüde etkiler.²⁹ Ekstremitelerde güçsüzlük, duysal belirtiler, ataksi, mesane problemleri, yorgunluk, diplopi, görme bulanıklığı gibi görsel belirtiler, dizatri, bellek-konsantrasyon-dikkat bozukluğu gibi kognitif (bilişsel) belirtiler sık görülür. Hareket bozuklukları, epileptik nöbet, baş ağrısı, demans düzeyinde kognitif yıkım, kortikal belirtiler, işitme kaybı, amyotrofi ise MS'de daha az sıklıkta görülen belirti ve bulgulardır.³⁰ Optik nörit (ON) MS'li hastaların yaklaşık % 20'sinde ilk bulgu olabilir.³¹ Tablo 2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. MS hastalığının klinik belirtileri ve görülme sıklığı

MS in Klinik Belirtileri	Görülme Sıklığı
Bir ya da daha fazla ekstremitede güçsüzlük	%35
Optik nörit	%25
Parestezi	%20
Diplopi	%10
Vertigo	%5
Mesane problemleri	%5
Diğer	<%5

2.1.6. MS'in Klinik Tipleri

MS, temelde klinik tekrarlamaların sıklığı, hastalığın ilerlemesi için geçen süre ve MRG'de lezyon gelişimine göre kategorilere ayrılmaktadır.³²⁻³⁵ 2010 yılında yeni bulgular ile McDonald kriterleri tekrar revize edilmiştir. McDonald MS Tanı Kriterleri Uluslararası Panel 2000 Klinik atak/ bulgu MS tanısı için gereken bulgu Nörologlar, hastaların hastalığın klinik seyrine göre klinik izole sendrom (KİS), relapsing-remitting MS (RRMS), primer progresif MS (PPMS), sekonder progresif MS (SPMS) ve progresif tekrarlayan MS olmak üzere beş ana kategoride gruplandırılmıştır.³⁶

2.1.6.1. Klinik İzole Sendrom

Enfeksiyon odağı olmadan omurilikte gelişen ilk iltihabi ataktır. MS genç erişkinlerin çoğunda hastalığın başlangıcı olarak ortaya çıkar. Optik sinirleri, omuriliği veya beyin sapını ilgilendiren klinik izole sendrom (KİS) olarak ortaya çıkar. KİS' lu hastaların %30-60 civarında MS gelişir. Kraniyal MRG'de klinik olarak sessiz beyin lezyonları görülürse, MS gelişme riski daha yüksek olur. KİS sonrasında, MRG'de lezyon yoksa ya da sayıca az ise, ilk 5 yılda özürlülük gelişmemişse ve ilk atak ile ikinci atak arasındaki süre uzun ise, MS'e bağlı özürlülük gelişme riski oldukça düşüktür. KİS tablosu ile gelen hastaların sürekli olarak klinik ve laboratuvar olarak değerlendirilmesi önerilir.³⁷

2.1.6.2. Relapsing-Remitting MS (RRMS)

MS hastalarının yaklaşık %85 ini etkileyen, en yaygın görülen MS tipidir. Kadınlarda daha sık görülmektedir. RRMS ile ataklar genellikle belirgin görsel ve duysal semptomlarla başlar. Yeni semptomların ortaya çıktığı veya önceki ataklardan kalan mevcut semptomların daha da ciddi hale geldiği öngörülemeyen MS ataklarıyla karakterizedir. Ataklar günlerden aylara kadar sürebilir. Atak süresi en az 24 saattir. Atakların ardından MS aylarca veya yıllarca etkin olmayabilir. Remisyon sırasında semptomlar sinir hasarlarından dolayı ortaya çıksa da, genellikle daha az şiddetlidir.³⁸

Semptomlar iyileştiğinde veya kaybolduğunda, semptomların alevlenme (alevlenme veya alevlenmeleri), ardından remisyon dönemleri ile işaretlenir.

Bening MS: MS relapsları arasında tamamen remisyonu olan ve zaman içinde özürlülük artışı gözlenmeyen veya özürlülüğün çok az görüldüğü klinik MS tipidir. RRMS' e dahil edilir.³²⁻³⁵

2.1.6.3. Primer Progresif MS (PPMS)

MS hastalarının yaklaşık %10' unu etkiler. Semptomlar başından itibaren giderek kötüleşmeye devam eder. Relaps veya remisyon dönemleri yoktur. PPMS formu, tipik olarak MS hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara daha dirençlidir.³²⁻³⁵

2.1.6.4. Sekonder Progresif MS (SPMS)

RRMS olan bazı hastalarda SPMS gelişebilir. Atak remisyon dönemlerini takiben hasta zamanla nörolojik fonksiyonlarında ilerleyici kötüleşmenin olduğu SPMS'e döner. Birçok hasta için, hastalığı modifiye edici ajanlarla yapılan tedavi sonucunda semptomlarında gecikme görülmüştür.³²⁻³⁵

2.1.6.5. Progresif Tekrarlayan MS (PTMS)

PTMS MS hastaların %5'inden azını etkileyen nadir bir formdur. Hastalığın başlangıcından itibaren arada sırada kötüleşen semptomları ilerleyicidir. Herhangi bir remisyon dönemi yoktur.³²⁻³⁵

2.1.7. MS'in Tanısı

MS' in tanısındaki temel prensip SSS' deki lezyonların neden olduğu klinik tablonun yayılımının gösterilmesi ve benzer özelliklere sahip diğer nörolojik hastalıkların dışlanmasıdır. MS hastaları arasında klinik oldukça değişkendir. Bu bulgulara neden olabilecek diğer patolojilerin dışlanması gerekmektedir. MS'in klinik bulgu ve belirtileri izole olarak veya kombinasyon halinde ortaya çıkabilir. Klinik atak denebilmesi için en az 24 saat sürmelidir ve 2 atak arası süre yaklaşık 30 gün olarak belirlenmiştir.^{35, 39}

MS Tanı Kriterleri 2017 Revizyonu

MS tanısında McDonald tanı kriterleri kullanılmaktadır. McDonald kriterleri MS tanısında kullanılan klinik, radyolojik ve laboratuvar birleşenleri içermektedir. İlk olarak 2001 yılında toplanılarak MS tanı kriterleri belirlenmiştir. Daha sonra 2005'te, 2010'da ve en son olarak da 2017'de toplanılarak tanı kriterleri revize edilmiştir. McDonald tanı kriterleri 2017 yılı toplantısında atak tanımı gözden geçirilmiş ve MS tanısı kesinleşmeden önce en az 1 atağın objektif bulgusunun nörolojik bakı / VEP / MRG ile

gösterilmesinin önemi vurgulanmıştır. Demiyelinizan lezyonların SSS’ de alansal ve zamansal yayılımının MRG kriterleri gözden geçirilerek sadeleştirilmiştir. Kriterlerin yalnızca SSS demiyelinizan hastalığı düşündüren KİS olguları için geçerli olduğu vurgulanmıştır. Ayırıcı tanının önemi vurgulanmıştır. NMO ve NMO spektrumu gözden geçirilmiştir. Kriterlerinin pediatrik ve ileri yaş grubu Asya ve Latin Amerika popülasyonunda uygulanabilirliği tartışılmıştır.³² Revize edilen 2017 McDonald tanı kriterleri⁴⁰ Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3. 2017 McDonald tanı kriterleri

2017 Revize McDonald kriterleri (Thompson ve arkadaşları)		
Atak	Objektif klinik bulgulu lezyon sayısı	MS tanısı için gerekli ek veri
≥2 atak	≥2	Yok(a)
≥2 atak	1+ öyküde başka bir alanda ki lezyona ait atak(b)	Yok(a)
≥2 atak	1	SSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG(c) ile mekanda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥2	Ek bir klinik atak veya MRG(d) ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB(e) varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	SSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG(c) ile mekanda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG(d) ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB(e) 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

a: Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa veya negatifse MS tanısı koymadan dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

b: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir. Öyküdeki atağa ait objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demiyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

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

d: MRG’de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG’de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG’sinde ilk MRG referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyon ya da kontrast tutan lezyon olması.

e: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda yerine geçer, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OKB: Oligoklonal band

2.1.8. MS'in Tedavisi

MS'in kesin bir tedavisi olmamakla birlikte, MS tedavisinde hastalığı modifiye edici, atak tedavisi ve semptomatik tedaviler uygulanmaktadır.

1. Hastalığı Modifiye Edici Tedavi: Altta yatan bağışıklık bozukluğunu ve semptomlarını hafifletmek ve atakların tekrarlamasını azaltıp, MRG'de yeni plak oluşmasını önlemek amacıyla kullanılır. İmmünmodülatör tedavilerdir. Tedavi alan hastalar uzun dönem ataksız kalabilir.⁴¹ En sık kullanılan ajanlar; Glatiramer asetat, Interferon beta 1a, Interferon beta 1b, Mitoxantrone, Fingolimod, Natalizumab, Alemtuzumab, Daclizumab'dır.⁴²⁻⁵²

2. Atak Tedavisi: Sadece atak döneminde kullanılır. Atağın kısa sürmesi, tam olarak iyileşmesi için yüksek doz steroid kullanılır. Steroidler kontrendike veya etkisiz ise, plazma değişimi (plazmaferez) kısa süreli kullanılabilir.⁴¹

3. Semptomatik Tedaviler: Nörolojik fonksiyon bozukluğu sonucunda ortaya çıkan belirtileri hedef alan tedavilerdir. Hastalığın seyri üzerinde etkisi yoktur. Hastanın yakınmalarına göre kullanılan ilaçlar (ağrı kesiciler, kas gevşetici, epilepsi ilaçları gibi) ve hastalarda görülen güç kayıpları, dengesizlik, ellerde beceriksizlik ve kas sertlikleri (spastisite) etkili bir fizyoterapi ile önlenebilir.⁵³

2.2. miRNA'lar

2.2.1. Tanım

Ökaryotların DNA'sı, RNA'ya transkribe olmaktadır ve yaklaşık sadece %2'si proteine çevrilir. Proteine çevirisi olmayan RNA'lara kodlanmayan RNA (ncRNA) adı verilir ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludurlar.⁵⁴ Kodlanmayan RNA'lar housekeeping ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA'lar olarak ikiye ayrılırlar. Housekeeping ncRNA'lar canlıların tüm dokularında bulunur ve birçok temel işlevin yerine getirilmesinden sorumludur.⁵⁴

Genetik biliminde, miRNA yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda tek iplikli RNA molekülü türüdür. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. miRNA'lar kodlamayan RNA'lardandır, DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar.⁵⁵ Esas olarak mesajcı RNA (mRNA)'da tamamlayıcı hedef dizilere bağlanarak ve translasyon mekanizmalarına müdahale ederek, protein sentezlenmesini engelleyerek işlev görürler. Farklı literatür çalışmalarında miRNA'ların translasyonunu susturmaya yönelik bilgiler mevcuttur.⁵⁶

miRNA'lar protein kodlayan genlerin eksonik, intronik bölgelerinde ve genler arası bölgelerde bulunabilirler. miRNA'ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi, tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.⁵⁷

Hedefledikleri miRNA'ların 3' translasyonu yapılmayan bölgesine (3'-UTR), 5'UTR, promotor veya protein kodlayan bölgelerine 2-8 nükleotid uzunluğunda kısmi bir eşleşme ile bağlanarak gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görevlidirler. Çok sayıda miRNA'nın ekspresyonunda meydana gelen değişimler çeşitli hastalıkların geniş ölçüde patogenezi ile ilişkilidir. Ayrıca sinir sistemine özgün miRNA'lar nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların gelişiminde pay sahibidir. miRNA'lar bu hastalıkların patogenezinde önemlidir ve özel proteinlerin ekspresyonunu değiştirecek yönde hedef seçmeleri konusunda kanıtlar artmaktadır. miRNA'ların, katıldıkları gen regülasyonu ile nörolojik hastalıkların meydana gelmesi ve ilerlemesinde önemli rolleri olabilir. Ayrıca, hastalıkların tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılabilirler.⁵⁸⁻⁶¹

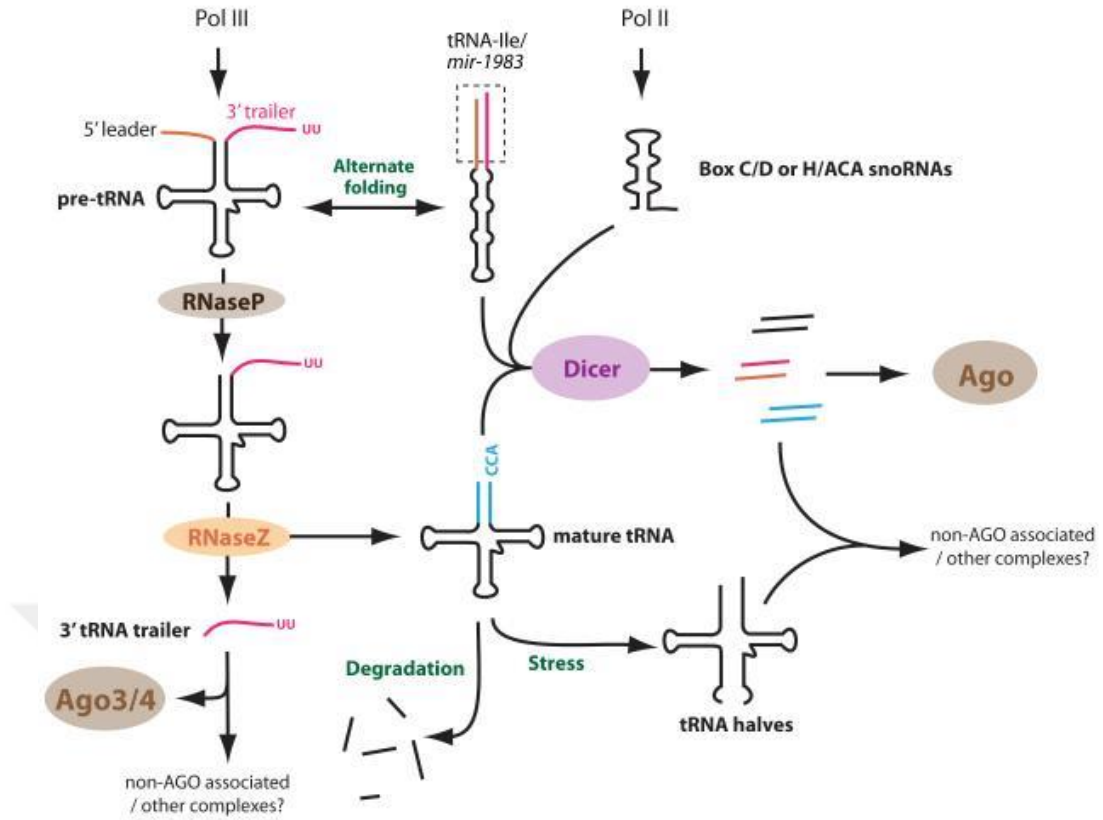
2.2.2. miRNA'ların Tarihçesi

İlk defa 1993'de Lee ve arkadaşları, *Caenorhabditis elegans* (C. Elegans)'ta lin-14 geninin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı belirlenen 22 nükleotid uzunluğunda

olan lin-4 ismini verdikleri miRNA'lar keşfedilmiştir.⁵⁶ Reinhart ve arkadaşları 2000'de C. Elegans'ta bir miRNA tipi olan Let-7'yi keşfetmişlerdir. 21 nükleotidden oluşan Let-7 larvadan erişkin döneme geçişi kontrol etmektedir. Let-7'nin aktivasyonunun kaybı durumunda ergin dönemden larvaya geçiş olduğu görülmüştür. Let-7 keşfinin çığır açan bir nitelikte olup kodlanmayan RNA sınıfında yer alıp, gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu olan bu RNA'lar miRNA olarak tanımlanmıştır.⁶² Günümüzde birçok canlıda gözlenen miRNA'ların sadece insanda yüzlerce tipi bulunmuştur. miRNA'ların işlevsel yapıları da evrimsel olarak iyi bir şekilde korunmuş olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir.⁶³

2.2.3. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi nükleusta RNA polimeraz III aracılığı ile transkripsiyonla başlar ve saç tokası şeklinde olgun miRNA dizisini içeren pri-miRNA oluşur. Saç tokası şekli RNAaz III enzimi (Drosha) ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8)'den (Pasha) oluşan mikroreseptör aracılığı ile kesilir ve pre-miRNA oluşmasına neden olur. Prekürsör saç tokası çekirdekten Exportin-5 (XPO5) aracılığı ile sitoplazmaya taşınır ve daha sonra başka bir RNA Pol III enzimi olan Dicer ile 18-25 nükleotid uzunluğunda miRNA'ya kesilir.^{64, 65}



Şekil 2.1. miRNA biyosentezi (Mol Cell. author manuscript; available in PMC 2012 Sep 16)⁶⁶

2.2.4 miRNA ve Epigenetik:

Epigenetik DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesi üzerinde düzenlemeler yapan kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik, bu düzenlemeyi DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıyla kontrol eder. Epigenetik mekanizmasında meydana gelebilecek değişiklikler konjenital bozukluklara, multisistemik pediyatrik sendromlara, ileri yaşlarda ortaya çıkabilecek kanser veya nörodejenerasyonla seyreden hastalıklara neden olabilirler. miRNA'ların biyogenez süreci günümüzde iyi bilinmektedir ancak halen daha düzenlenmesi tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Protein kodlayan genler gibi miRNA kodlayan genler de miRNA epigenetik mekanizmanın kontrolü altında iken, bazı miRNA'lar da dolaylı olarak veya doğrudan epigenetik mekanizmalarda işlevi olan faktörleri düzenledikleri belirtilmiştir.⁶⁴

2.2.5. miRNA'ların Tıpta Kullanım Alanları

Günümüzde birçok hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisinde miRNA kullanımıyla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır.⁶⁷ miRNA'larla hastalık tanısını koyabilmek için; serum, BOS, gözyaşı sıvısı, ovaryen folikülü sıvısı, süt, safra, karınzari sıvısı, idrar, plevral efüzyon, kan, nazal sekresyon, tükürük ve feçes gibi biyolojik sıvı veya dokular kullanılmaktadır. miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılmasının planlanması ve ilk kez serumdaki varlığı Lawrie ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gösterilmiştir.⁶⁸

İlk kez 2002'de Calin ve arkadaşları tarafından miR-15 ve miR-16'nın B-hücreli kronik lenfositik lösemi ile ilişkisinin olduğu bildirilmiştir.⁶⁹ Daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda miRNA genlerinin %50'sinden daha fazlasının kanserle ilişkili miRNA olduğu ve tümör supresör gibi davranarak onkogenleri inhibe ettikleri veya onkogen gibi davranarak tümör supresörleri inhibe ettikleri gösterilmiştir.⁷⁰ Sadece kanserle ilgili çalışmalar değil ayrıca bu çalışmaların yanı sıra miRNA'ların farklı birçok hastalıkla ilişkisinin olduğu gösterilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının 2005'de yaptıkları çalışmada kalp ve iskelet kaslarının prekürsör hücrelerinde miR1'in eksprese olduğunu ventiküler kardiyomiyositleri düzenlediğini göstermişlerdir.⁷¹ Wienholds ve arkadaşları 2005'de Zebra balığı üzerine yaptıkları çalışmalarında bazı miRNA'ların SSS'e spesifik olduğunu bildirmişlerdir.⁷²

Leidenger ve arkadaşları'nın 48 Alzheimer hastası ile yaptıkları çalışmalarında 12 adet miRNA tipinin ekspresyon seviyelerini Real Time-PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. Alzheimer hastalığına sahip kişilerde Let-7d, miR-112, miR-151a, miR-161, miR-1285 ve miR-5010 tiplerinin ekspresyon düzeylerinin yüksek iken, Let-7f, miR-26b, miR-103a, miR-107, ve miR-532 tiplerinin ise ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu raporlanmıştır. Aynı zamanda Alzheimer'lı hastaların miRNA ekspresyon düzeylerinin MS, Parkinson,

Majör Depresyon, Bipolar Bozukluk ve Şizofreni olan olgulardan farklı olduğu gösterilmiştir.⁷³

miRNA'lar bütün hücrelerde eksprese olduğu için birçok sayıda hastalıkla ilişkisi mevcuttur. Günümüzde çok sayıda bilim insanı miRNA'ların antagonistlerini ya da mimiklerini (benzerlerini) sentezleyerek yeni tedavi yöntemleri geliştirmeyi hedefledikleri bilinmektedir. Sentetik miRNA antagonistlerin ve mimik miRNA'nın asıl miRNA gibi hedef mRNA'ya bağlanıp translasyonu susturduğunu belirten sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.⁷⁴

Sonuç olarak mRNA'ların negatif post-transkripsiyonel düzenleyicilerinden olan miRNA'ların her biri mRNA'lara bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlerler. Bir mRNA'nın yüzlerce miRNA tarafından ekspresyon seviyeleri düzenlenmektedir.⁷⁵ Büyüme, gelişme, farklılaşma ve apoptozis gibi birçok biyolojik süreçte işlevi olan miRNA'ların çeşitli hastalıkların tanı, prognoz ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.⁷⁶

miRNA'lar mRNA'lara tam olarak bağlanmamaktadır ve bir miRNA birçok mRNA'ya bağlanabilmektedir. Bu sebepten dolayı tedavide kullanılması beklenen etkilerinin yanı sıra birçok farklı biyolojik olayın da gelişmesine sebep olabilirler.

2.2.6. miRNA ve MS

miRNA'lar, bağışıklık sistemini ve nöroinflamasyonu modüle etme gibi çeşitli biyolojik işlemlerde bulunur. miRNA'ların, özellikle hastalıklardaki karmaşık fonksiyonları hala tam olarak anlaşılamamıştır.⁷⁷ Son çalışmalar, miRNA'ların kanda oldukça stabil olduğunu ve dolaşımdaki ribonükleazlara dirençli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, çoklu biyolojik süreçlerdeki önemli rolleriyle birlikte, periferik kandaki miRNA'lar, MS'in ve birçok hastalığın teşhisi ve prognozu için ümit vaat etmektedir.

Ayrıca, miRNA taklitçileri, inhibitörleri ve antisens oligonükleotitleri, MS'e karşı tedavide etkili hale gelebileceği belirtilmektedir.⁷⁸

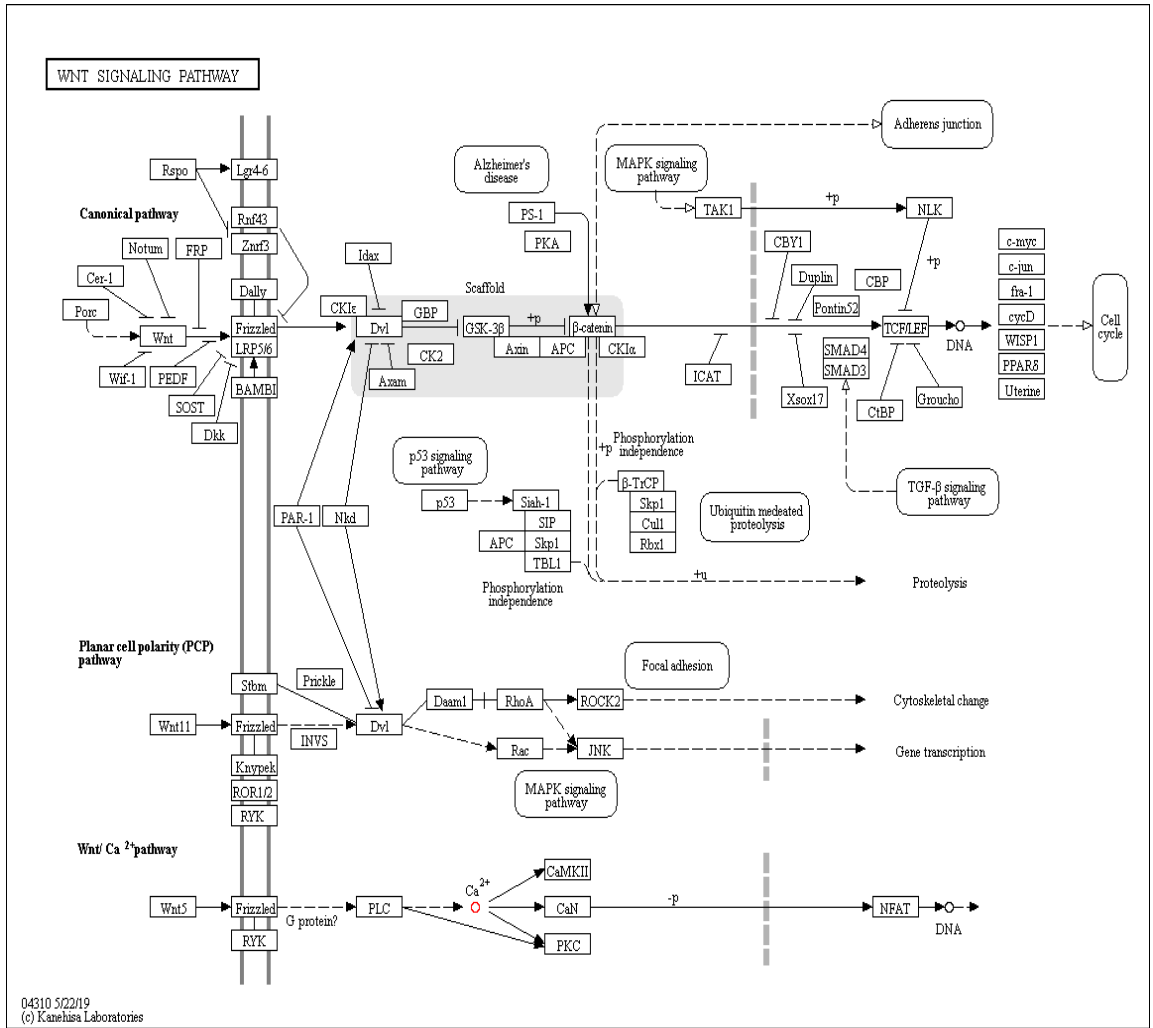
2.3. WNT Sinyal Yolağı

Sinyal yolları hücreler arası iletişimi sağlar, uygun hücre aktivitesini düzenler, geciktirir ve doku homeostazında, yenilenmesinde rol oynar. Organizmada görev alan sinyal ileti yollarından birisi WNT sinyal yoludur ve evrimsel açıdan iyi korunmuştur. WNT sinyal yolu kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesi ve proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol almaktadır. WNT sinyal yolunda görev alan genlerde meydana gelecek herhangi bir ekspresyon değişikliği birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilir.⁷⁹⁻

82

Wingless Type (WNT) proteini 1982 senesinde farenin kanserli meme dokusunda izole edilmiş olan bir glikoproteindir. WNT proteininin Klasik (WNT- β -Catenin), Klasik olmayan (hücre polarizasyonu) ve WNT-Ca⁺⁺ (hücre zarından kalsiyum transportu) yolağı olmak üzere üç yolağa dâhil olduğu gösterilmiştir.⁸³

Oligodendrositler (OL) SSS'deki miyelinleştirici hücrelerdir. Kompleks bir moleküler mekanizma miyelinasyon ve remiyelinizasyonu düzenler. Yapılan çalışmalarda, WNT moleküllerinin, OL olgunlaşması üzerindeki inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. Onkogeneze ve embriyogeneze sırasında hem hücre içi ve hem de hücre dışı olmak üzere, çeşitli gelişimsel süreçlerde de WNT / β -katenin yolağını aktivasyonu önemlidir.⁸⁴ WNT sinyal yolu bu süreçlerde çok önemli bir engelleyici faktör olarak kabul edilmiştir.^{85, 86} WNT sinyal yolağı Şekil 2.6. 'da gösterilmiştir.



Şekil 2.2. WNT sinyal yolağı

2.3.1. WNT Sinyal Yolağı ve MS

WNT sinyal yolu SSS’de miyelinizasyon sürecince negatif bir rol oynamaktadır.⁸⁷ Miyelin kaybı ve bozulmuş aksonal iletim; uyuşma, halsizlik, görme bozukluğu ve parezi gibi çeşitli nörolojik defisitlere yol açar. Hasar görmüş miyelin, klinik remisyonla uyumlu olarak tamir veya remiyelinize edilebilir. Remiyelinize olmuş kılıflar bir sonraki demiyelinizasyona karşı hassastır ve tekrarlayan remiyelinizasyon ve demiyelinizasyon, MS’te klinik relaps ve remisyon ile karakterizedir. Sonuç olarak geri dönüşümsüz bir sakatlığa yol açabilir.^{88, 89}

Etkili remiyelinasyon tedavileri için iki önemli problemin çözülmesi gerekmektedir. İnflamatuvar demiyelinizasyon sürecinin nasıl durdurulacağı ve miyelin

remodelinginin nasıl teşvik edileceği. MS'in periferdeki ve SSS'deki otoimmün inflamatuvar mekanizmasını hedeflemek için, bu hastalığa yönelik mevcut ilaçlar esas olarak immünomodülatörlerdir. İmmünomodülatör tedavi inflamasyonu hafifletmekte önemlidir. Demiyelinizasyon seyrini durdurabilir ve klinik alevlenmeyi önleyebilirler. Ancak, önceden kurulmuş olan demiyeline lezyonlar için onarımı destekleme yaklaşımları hala eksiktir. WNT sinyal yolunun miyelinizasyon sürecindeki rolü gösterilmiştir. Oligodentrositler SSS'de remiyelinizasyon yapan hücrelerdir ve WNT sinyal yolu oligodentrositlerin gelişimi üzerine olan etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İnflamatuvar ve otoimmünite ile ilişkisi de göz önüne alındığında, zamanında ve etkin remiyelinizasyona yol açacak olan yaklaşımlar geliştirmek için WNT sinyal yolu-MS ile yapılacak olan çalışmalar literatüre katkı sağlayacaktır.⁹⁰⁻⁹⁴

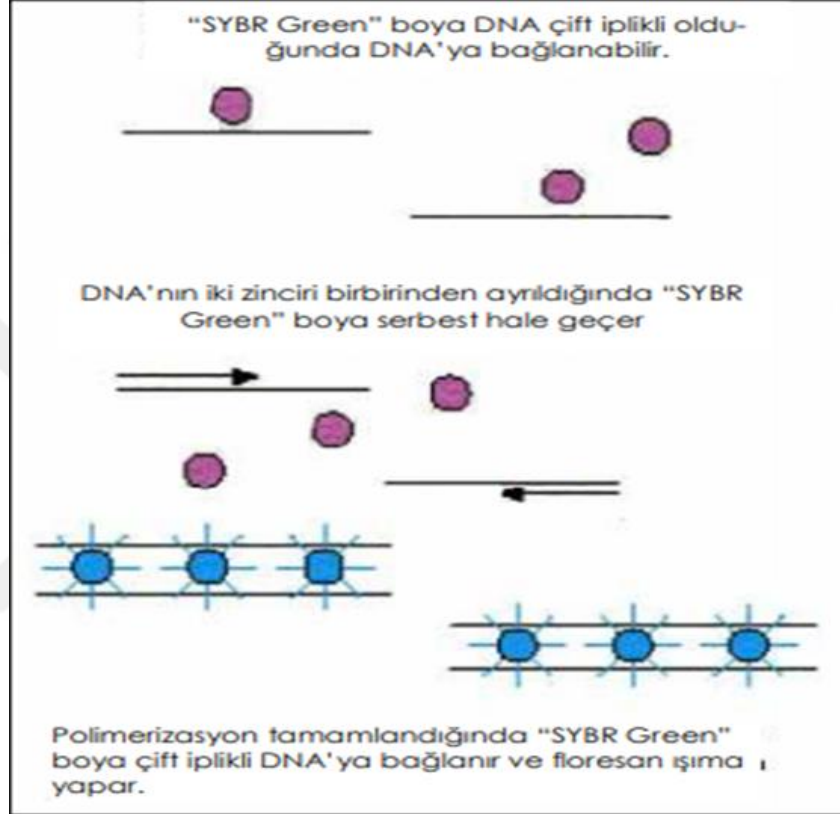
2.4. Real Time PCR (RT-PCR)

PCR'ın amacı spesifik bir gen bölgesini çoğaltmak ve belirlenen bölgelerin çalışılabilmesini sağlamaktır. RT-PCR ise PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya cDNA'nın prob veya floresan boyalar kullanılarak eş zamanlı olarak kantitatif değerlendirme yapmasıdır. PCR reaksiyonu esnasında çoğalan ürün miktarı ile floresan boya ların verdiği ışım a doğru orantılıdır. Hangi döngüde, hangi oranda artış oldu ğu reaksiyon sırasında tespit edilebilir. Piyasada birçok çeşit prob kullanılmaktadır. RT-PCR ile amplifikasyon sonrası ürün varlığının saptanması özgün ve özgün olmayan belirleme sistemi olarak ikiye ayrılır. Problar ile özgün belirleme, SYBR Green ile ise özgül olmayan belirleme yapılır.^{95, 96}

2.4.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green

Özgül olmayan belirleme sisteminde çift zincirli DNA boya ları kullanılır. En sık kullanılan SYBR Green'dir. SYBR Green 480nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520nm dalga boyunda indirgenir. Primerler bağlanır ve DNA zinciri uzama başlar. Boya

molekölü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve böylece floresan yayılımı başlar. Başlangıçta döngü gerçekleşirken sinyal zayıftır. Ancak ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da hızla artar. Bu artış RT-PCR' nin monitöründen izlenir. Çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri yapılması gerekmektedir.^{95, 96}



Şekil 2.3. SYBR green yöntemi⁹⁷

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Araştırmanın Türü ve Etik Yönü

Araştırma; Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmış prospektif bir çalışmadır. Çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 30.11.2017 tarihli B.30.2.ATA.0.01.00/140 Sayılı kurul onayı alındı. 07.01.2019 - 24.05.2019 tarihleri arasında hastanemiz Nöroloji Polikliniğine başvuran MS tanısı almış, atak döneminde olan 17 MS hastasının atak tedavisi almadan önce ve kontrol grubu olarak 16 sağlıklı bireyin yazılı onayları alınarak çalışmaya dahil edildi.

3.2. Materyal

3.2.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Nöroloji Polikliniğine başvuran 17 atak döneminde olup klinikte yatan, atak tedavisi (Pulse tedavisi) alan MS hastası dâhil edildi. Hastalardan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile yazılı onayları alındı. Ayrıntılı sistemik ve nöroloji muayeneleri yapıldı. Klinik, laboratuvar ve kullanılan ilaç bilgileri kaydedildi. EDTA'lı tüpe kanları alındı. Remisyon dönemine girdikten 3 ay sonra kontrole çağırıldı ve tekrar ayrıntılı muayeneleri yapılarak EDTA'lı tüpe kanları alındı.

MS tanısı almış ve atak döneminde olan, çalışmanın tüm kriterlerine uyum sağlayan 5'i erkek (%29,4) ve 12'si (%70,6) kadın 17 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak tamamen sağlıklı, herhangi bir hastalığı olmayan, birbiri ile akrabalığı bulunmayan 5'i erkek (%31,25) ve 11'i (%68,75) kadın toplam 16 birey dahil edildi. Hasta bireylerin yaş ortalaması $28,64 \pm 7,34$ yıl olup, en genç hastamız 19 yaşında, en yaşlı hastamız ise 40 yaşında idi. Kontrol grubunun yaş ortalaması ise $28,81 \pm 6,7$ yıl olup, en genç katılımcımız 19 yaşında, en yaşlı katılımcımız ise 46 yaşındaydı.

Hastalarımızdan 4 tanesi yeni tanı almış olup henüz ilaca başlanmamışken atak tedavisi almıştır. En uzun süreli olan hastamız 15 yıllık MS hastasıdır. Hastalarımızın hepsi RRMS'dir.

3.2.1.1. Çalışmaya Dâhil Edilme Koşulları

- 18 yaş üzeri, 65 yaş altı hastalar
- MS tanısı almış atak döneminde olan yatarak atak tedavisi alan, remisyon döneminde 3 ay sonra kontrole gelebilecek hastalar
- MS dışında ek bir hastalığı olmayan hastalar çalışmaya dâhil edildi.

3.2.1.2. Çalışmadan Dışlanma Koşulları

- Remisyon döneminde kontrole gelmeyen hastalar
- Gebe olan, emziren hastalar
- Obez olan hastalar
- 3 aylık remisyon döneminde herhangi bir hastalık geçiren, ameliyat olan veya tekrar atak geçiren hastalar çalışmaya dâhil edilmedi.

3.3. Metot

3.3.1. Kandan Plazma Eldesi

Çalışmaya dâhil olan bireylerden EDTA'lı tüpe alınan kan örneği hemolize olmaması açısından bekletilmeden 1900xg (3000 rpm) ve 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sarı plazma fazı temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Plazma örneği soğutmalı santrifürüjde 16.000xg ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant fazı yeni bir tüpe aktararak -80°C'de saklandı.

3.3.2. Plazma Örneklerinden miRNA Eldesi

miRNA eldesi, miScript RNeasy Mini kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Plazmalar -80°C'den çıkarılarak 4°C'de çözünmesi beklendi. 16.000xg ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. 200 µl serum örneği alınarak 2 ml ependorf

tüpe konuldu ve üzerine 5 katı kadar (1000 µl) Qiazol Lysis Reagent eklenerek vortekslendi. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında (15-25°C) bekletildi. Daha sonra başlangıç materyali kadar (200 µl) kloroform eklenerek 15 saniye vortekslendi. 2-3 dakika oda sıcaklığında beklendi. 12.000xg ve 4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan en üst fazdan 600 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne transfer edildi. Üzerine 900 µl %100’lük saf etanol eklendi. Oluşan karışımdan 700 µl örnek alınarak RNA easy mini kolonun içine konuldu. Kapağı kapatılarak 8000xg ve oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edildi. Örneğin tamamı bitinceye kadar bu basamak tekrarlandı. 700 µl RWT tampondan RNaz mini kolona eklenerek ve 15 saniye oda sıcaklığında 8000xg’de santrifüj edilerek yıkama kısmının ilk basamağı yapıldı. Toplama tüpünde kalan kısım atılarak 500 µl RPE tamponundan RNaz Mini kolonun üstüne eklendi ve 15 saniye oda sıcaklığında 8000xg’de santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpünde kalan kısım atılarak 500 µl %80 etanol RNaz Mini kolona eklendi ve 2 dakika 8000xg’de santrifüj edildi.

RNaz Mini kolon, yeni bir 2 ml’lik koleksiyon tüpüne yerleştirildi ve 1 dakika en yüksek hızda (16.000xg) santrifüj edildi. RNaz Mini kolon, yeni bir 1.5 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi. 14 µl RNaz içermeyen su, spin kolonunun merkezine direkt olarak eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında beklendi ve sonrasında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen RNA’ların saflığı ve miktarı nano-drop (maestrogen) cihazında ölçüldü. Elde edilen RNA’lar -80 °C’ ye kaldırıldı.

3.3.3. cDNA (kalıp DNA) Eldesi

RNA’nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200ng/µl olacak şekilde ayarlandı. cDNA eldesi için miScript Reverse Transcription (RT) kiti kullanıldı. Tablo 3.1’de verilen bileşenlerden oluşan karışım hazırlandı.

Tablo 3.1. cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript HiSpec tamponu	4 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	2 µl
miScript Reverse Transkriptaz Karışımı	2 µl
Kalıp RNA	12 µl
Toplam Hacim	20 µl

Hazırlanan karışım 8 µl olarak her bir tüpe aktarıldı. Daha sonra 12 µl RNA eklendi ve PCR cihazına konuldu. 37°C’de 60 dk, ve 95°C’de 5 dk olan tepkime koşullarına göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA miktarları 20 µl’de 50 ng/µl olacak şekilde ayarlanarak cDNA zenginleştirilmesi için 5 µl cDNA kullanıldı.

3.3.4. cDNA’nın Zenginleştirilmesi

cDNA’lar, miScript PreAMP PCR Kit kullanılarak zenginleştirme işlemi Tablo 3.2’de verilen bileşenler ve miktarlarına göre, Tablo 3.3’de belirtildiği gibi zenginleştirme işlemi yapıldı.

Tablo 3.2. cDNA’nın zenginleştirilmesi için bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript PreAMP Buffer	5 µl
HotStarTaq DNA Polimeraz	2 µl
miScript PreAMP Primer Karışımı	5 µl
miScript PreAMP Evrensel Primer	1 µl
RNaz içermeyen Su	7 µl
Dilüe edilmiş cDNA	5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 3.3. cDNA’nın zenginleştirilme tepkime sıcaklıkları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)	
95	15dk	} 12 döngü
94	30sn	
60	3dk	

3.3.5. RT-PCR

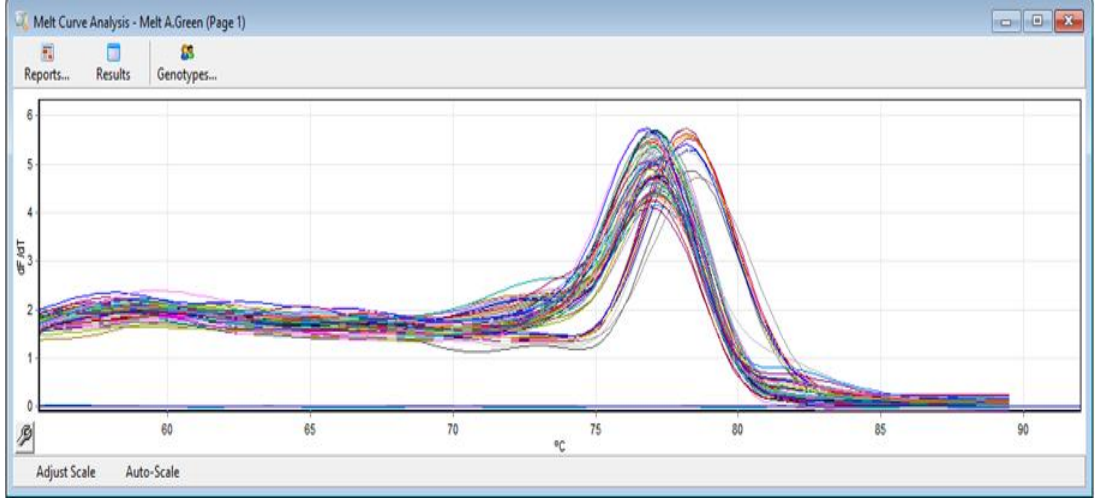
Rotor-Gene Q RT-PCR cihazında her bir örnek için (SNORD61, miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a, miR-1304), genlerin ekspresyon düzeylerine bakıldı. Referans gen olarak plazmada eksprese olan housekeeping RNA olan SNORD61⁹⁸ seçildi. RT-PCR için kullanılan bileşenler ve oranları Tablo 3.4’de, RT-PCR tepkime koşulları ise Tablo 3.5’de verilmiştir. MiScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak melting curve analizi yapıldı. Çalışmamıza ait aplikasyon eğrileri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. RT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım	10 µl
10x miScript Evrensel Primer	2 µl
10x miScript Primer Assay (Related miRNA primer)	2 µl
RNaz içermeyen su	1 µl
Zenginleştirilmiş cDNA	5 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.5. RT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)		
95	15 dk		
94	15 sn	}	40 döngü
55	30 sn		
70	30 sn		



Şekil 3.1. Çalışmamıza ait rotor-gene Q RT-PCR aplikasyon eğrileri

3.3.6. İstatistiksel Analiz

miRNA'ların gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler hesaplandı. Real Time analizinde verilen Ct değerlerinin Excel programına veri girişi yapılarak tüm miRNA'ların $2^{\Delta\Delta Ct}$ analizleri GeneGlobe Data Analysis Center online analiz programıyla istatistiği yapıldı. SNORD61⁹⁸ referans gen kabul edilerek öncelikle delta Ct değerleri hesaplandı. Aynı programda Satürn T testi ile p değeri hesaplandı. $p < 0.05$ olması anlamlı olarak değerlendirildi. Bu değerler çalışmamıza dâhil edilen tüm genler için yapıldı. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden tablo halinde verildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Çalışmamızda yer alan hasta ve kontrol gruplarına ait demografik veriler Tablo 4.1’de verilmiştir. Gruplar arasında yaş ($p=0,947$) ve cinsiyet ($p=0,909$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Tablo 4.1. Gruplara ait demografik veriler

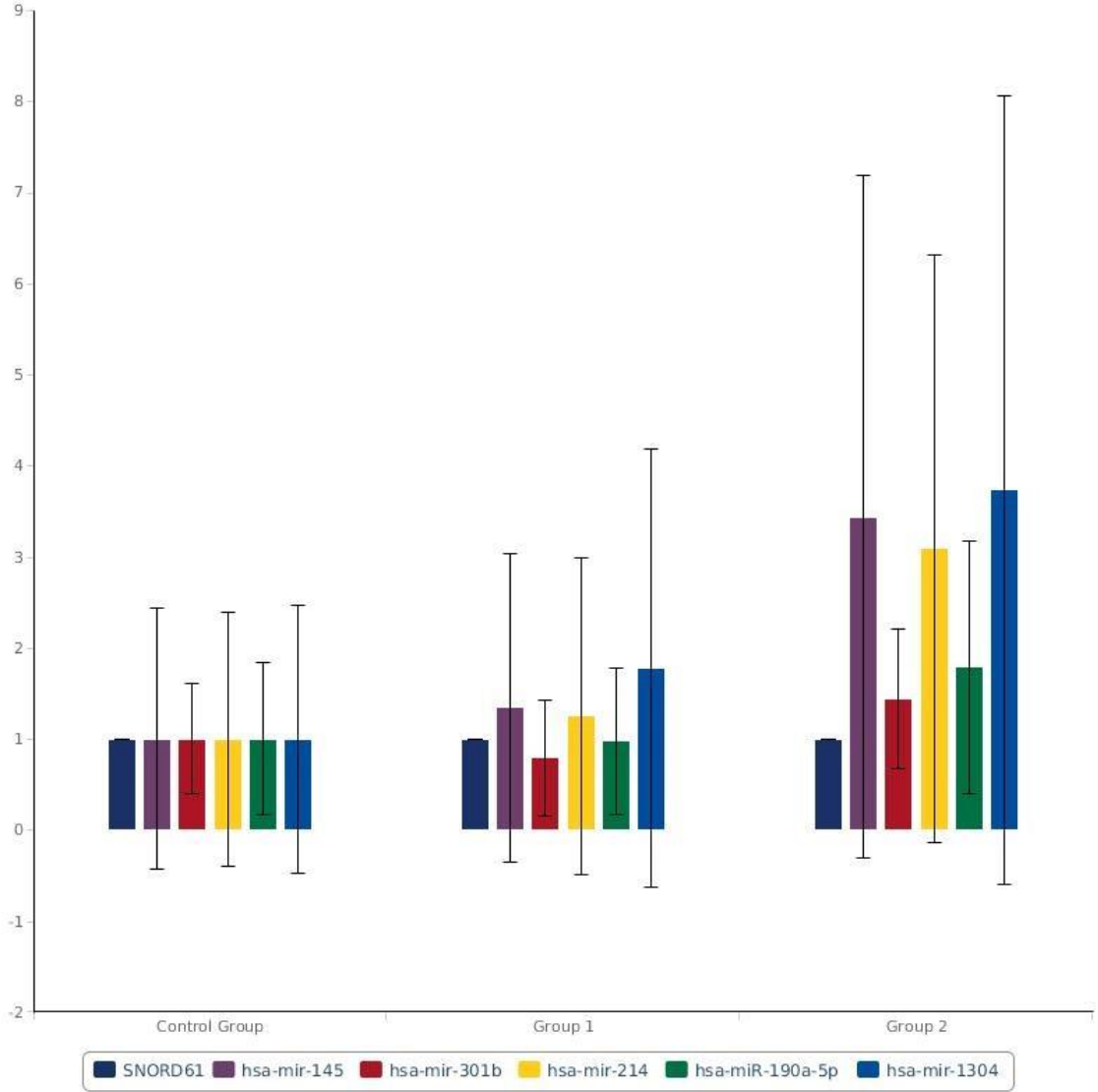
	Hasta	Kontrol
Hasta sayısı	17	16
Yaş ortalaması	28.64±7.34	28.81±6.70
Cinsiyet K/E n(%)	12 (%70.6) / 5 (%29.4)	11 (%68.75) / 5 (%31.25)

Çalışmamızda yer alan 17 RRMS hastasının 4’ü (%23,6) yeni tanı almış ve henüz ilaç tedavisine başlamamış olup, yalnızca atak tedavisi almıştır. Hastalarımızın 5’i (%29,4) subkutan interferon beta-1b (IFN- β -1b), 3’ü (%17,6) subkutan glatiramer asetat, 5’i (%29,4) oral fingolimod kullanmaktadır. Hastalara ait ortalama atak geçirme sayısı 5,29’dur. MS hastalarımıza ait ortalama hastalık süresi 3,35 yıldır.

4.2. miRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışmamıza dahil edilen hasta ve kontrol gruplarından toplamda 50 adet kan örneği alındı. Toplanan örneklerden miRNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi ve zenginleştirilmesi yapıldı. Belirlediğimiz miRNA’ların (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a ve miR-1304) ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak tespit edildi.

Yapılan istatistik analizlere göre; gruplar arasında karşılaştırılan miRNAların (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a, miR-1304), kontrol grubuna kıyasla kat farkları gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışma gruplarına ait miRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki kat artış grafiği

Kontrol grubuna ait miRNA ekspresyon seviyeleri 1 olarak kabul edildiğinde, Grup 1'e ait 3 miRNA seviyesinde (miR-145, miR-214 ve miR-1304) artış gözlemlenirken, 2 miRNA seviyesinde (miR-301b ve miR-190a) azalma tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kontrol grubuna ait miRNA ekspresyon seviyeleri 1 olarak kabul edilerek

yapılan kat artış analizine göre; Grup 2'ye ait tüm miRNA ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Kat artışına ait sayısal veriler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma gruplarına ait miRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki kat artış değerleri

miRNA Tipi	Grup 1* Kat artış	Grup 2* Kat artış
hsa-miR-145	1,3431	3,435
hsa-miR-301b	0,7887**	1,4385
hsa-miR-214	1,2509	3,0889
hsa-miR-190a	0,9727**	1,7895
hsa-miR-1304	1,7727	3,7293

*Kat artış değerleri, kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. **Kat artışı yerine kat azalışı gözlemlenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlerde; Atak dönemi (Grup 1) ve Remisyon dönemi (Grup 2) MS hastaları ile kontrol grubu arasındaki değişimin anlamlılığı SNORD61 kontrolü ile normalize edilen 2' Delta CT ($2^{-\Delta CT}$) değerleri üzerinden değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında; Grup 1'e ait tüm miRNA seviyelerinin (miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a ve miR-1304) kat artış değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık (sırasıyla; $p=0,833$, $p=0,704$, $p=0,738$, $p=0,759$ ve $p=0,274$) gözlenmezken, Grup 2'ye ait tüm miRNA seviyelerinin kat artış değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (sırasıyla; $p=0,010$, $p=0,023$, $p=0,002$, $p=0,006$ ve $p=0,003$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Gruplara ait p değerleri ve istatistiksel anlamlılık

miRNA Tipi	Grup 1 p değeri	Grup 2 p değeri
hsa-miR-145	0,833	0,010*
hsa-miR-301b	0,704	0,023*
hsa-miR-214	0,738	0,002*
hsa-miR-190a	0,759	0,006*
hsa-miR-1304	0,274	0,003*

*İstatistiksel anlamlılığı ifade eder.

Kullanılan ilaçlara göre yaptığımız istatistiksel analizlere göre Atak dönemi ve Remisyon dönemi MS hastaları ile kontrol grubu arasındaki değişimin anlamlılığı Tablo 4.4’te, Atak sayılarına göre istatistiksel anlamlılık Tablo 4.5’te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Kullanılan ilaçlara göre p değerleri ve istatistiksel anlamlılık

	miR-145		miR-301b		miR-214		miR-190a		miR-1034	
İlaç	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
IFN- β -1b	0,887	0,011*	0,77	0,027*	0,749	0,004*	0,769	0,006*	0,238	0,002*
FTY720	0,902	0,017*	0,713	0,021*	0,724	0,005*	0,787	0,006*	0,127	0,003*
GA	0,822	0,022*	0,692	0,032*	0,830	0,002*	0,743	0,007*	0,280	0,003*
Diğer	0,790	0,013*	0,823	0,019*	0,711	0,001*	0,717	0,005*	0,391	0,002*

G1: Grup1, G2: Grup2 *İstatistiksel anlamlılığı ifade eder.

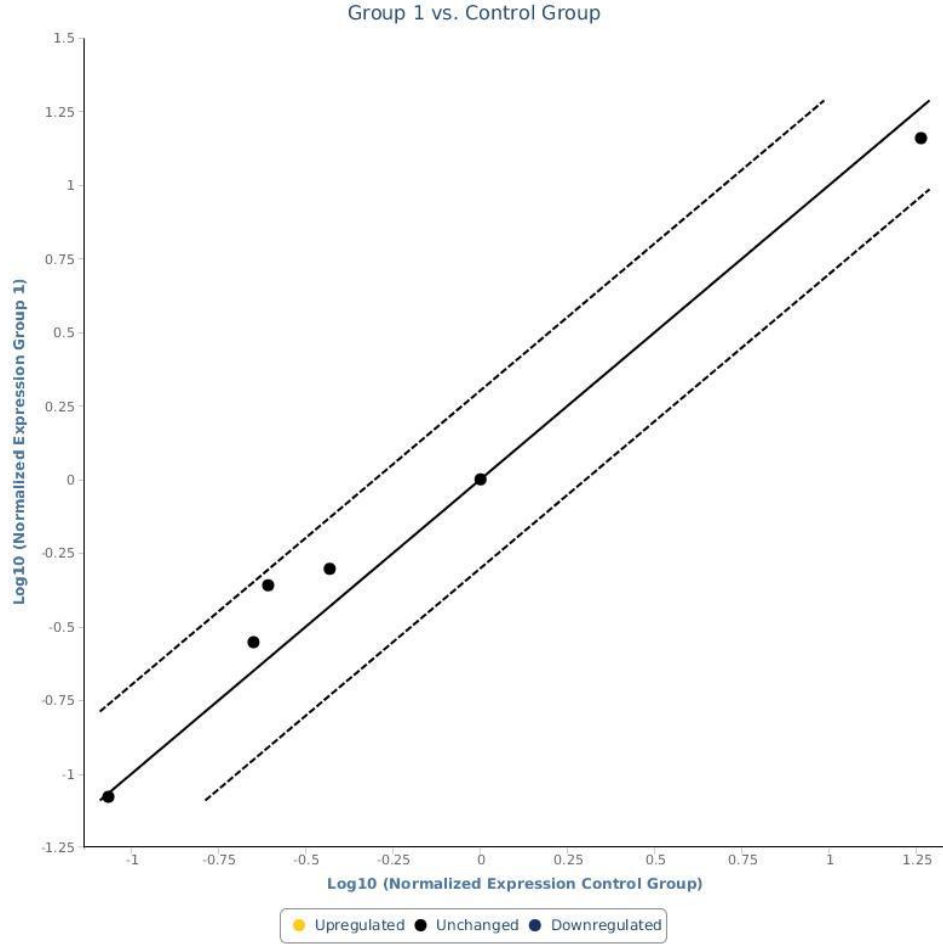
Tablo 4.5. Atak sayılarına göre p değerleri ve istatistiksel anlamlılık

	miR-145		miR-301b		miR-214		miR-190a		miR-1034	
Atak S.	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
≥ 6	0,836	0,016*	0,744	0,019*	0,711	0,004*	0,723	0,007*	0,235	0,002*
2-5	0,872	0,029*	0,706	0,029*	0,821	0,003*	0,753	0,006*	0,291	0,003*
1	0,790	0,013*	0,823	0,019*	0,711	0,001*	0,717	0,005*	0,391	0,002*

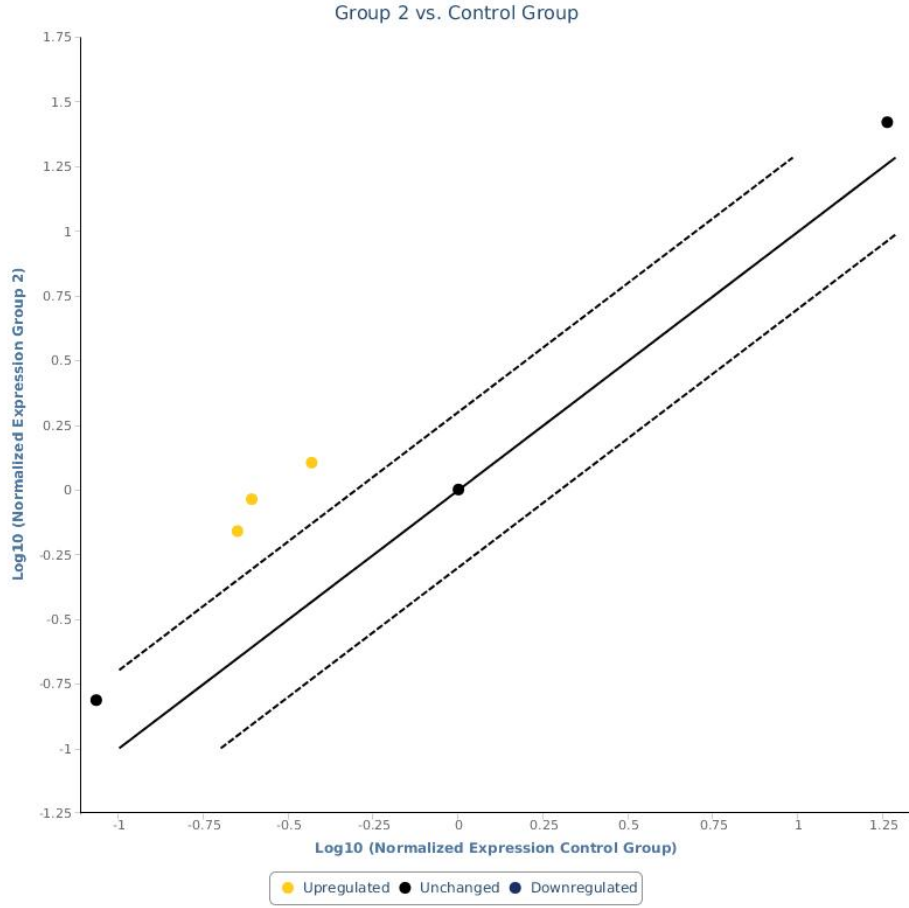
G1: Grup1, G2: Grup2 *İstatistiksel anlamlılığı ifade eder.

Elde edilen verilere göre Grup 1’de analiz edilen miRNA tiplerinden miR-145, miR-214 ve miR-1304 ekspresyon seviyelerinde up-regülasyon, miR-301b ve miR-190a ekspresyon seviyelerinde ise down-regülasyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Grup 2’de analiz edilen tüm miRNA tiplerinin ekspresyon seviyelerinde up-regülasyon

gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Kullanılan ilaçların ve atak sayılarının çalışmamızda miRNA gen ekspresyonları üzerine etkisi bulunmamıştır.

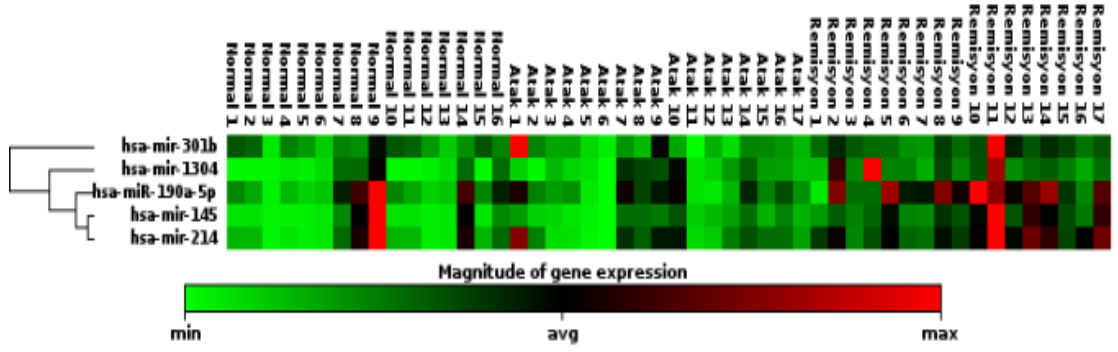


Şekil 4.2. Grup 1 (atak dönem MS)'e ait miRNA regülasyon grafiği



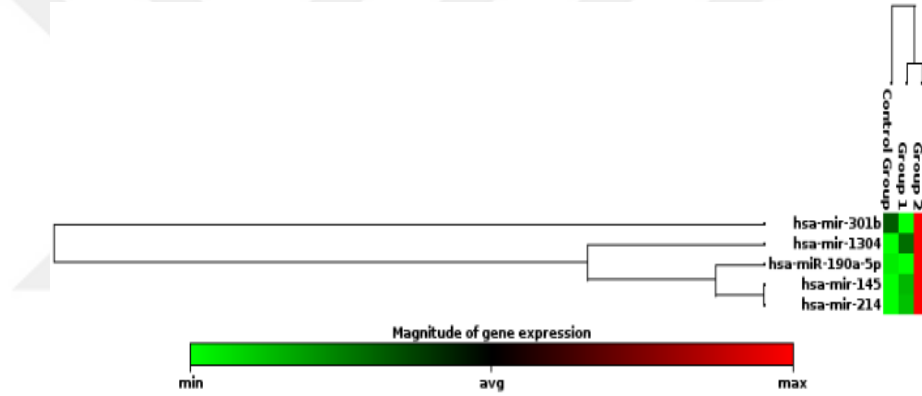
Şekil 4.3. Grup 2 (remisyon dönem MS)'e ait miRNA regülasyon grafiği

Çalışmaya alınan örneklerle ait miRNA ekspresyon seviyelerini gösteren hiyerarşik küme grafiği Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Grup bazında tüm miRNA'lara ait ekspresyon seviyelerini gösteren küme grafiği ise Şekil 4.5'te verilmiştir. Şekil 4.4'te tek eksende ve Şekil 4.5'te her iki eksende yer alan dendogramlar, hiyerarşik küme sonuçlarını temsil eder.



Şekil 4.4. Örnek bazında tüm miRNA verilerine ait hiyerarşik küme analizi

Satırlar, miRNA tiplerini, sütunlar ise örnek sayısını (16 Kontrol, 17 Grup 1, 17 Grup 2) temsil eder. Kırmızı renk; aşırı ifadeyi (over-expression) temsil ederken; yeşil renk düşük ifadeyi (under-expression) temsil eder.



Şekil 4.5. Grup bazında tüm miRNA verilerine ait hiyerarşik küme analizi

Satırlar miRNA tiplerini, sütunlar ise örnek sayısını (16 Kontrol, 17 Grup 1, 17 Grup 2) temsil eder. Kırmızı renk; aşırı ifadeyi (over-expression) temsil ederken; yeşil renk düşük ifadeyi (under-expression) temsil eder.

5. TARTIŞMA

MS SSS'ni etkileyen, beyin ve omurilikte inflamasyon ve aksonları çevreleyen miyelin kılıfların demiyelinizasyonuna sebep olan ataklar ile seyreden, multifaktöriyel etyopatogenezi olan ve sıklıkla genç erişkinleri etkileyen en yaygın nörolojik hastalıklardan biridir.⁹⁹ MS'in klinik ve patolojik özelliklerinin tanımlanmasının üzerinden 150 yıldan fazla geçmiş olmasına rağmen etiyopatogenezi hala bilinmemektedir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda; çevresel faktörler, genetik faktörler ve otoimmünite başta olmak üzere birçok faktörün etkili olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁰ Ayrıca miRNA aracılı gen düzenlenmesi gibi epigenetik mekanizmalarında bireyin hastalığa yatkınlığında, hastalığın şiddetinde ve hastalığın tedavisinde dahi önemli rol aldığı belirtilmiştir.¹⁰¹

Demiyelinizasyon, sıklıkla SSS'de kronik inflamasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. Miyelin kaybı ve bozulmuş aksonal iletim; uyuşukluk, görme bozukluğu ve parezi gibi nörolojik bozukluklara neden olmaktadır.⁸⁷ Hasarlı miyelin onarılabilir veya remiyelinize olabilir; ancak, yapılan çalışmalar remiyelinizasyon işleminin demiyelinize olan lezyonun küçük bir kısmında gerçekleştiğinden dolayı yetersiz olduğunu belirtmektedir. Buna ilaveten, remiyelinize olmuş kılıflar bir sonraki атаğa karşı daha zayıf bir savunmaya sahiptir. Sürekli tekrar eden demiyelinizasyon-remiyelinizasyon süreci, geri dönüşümsüz hasarlara sebebiyet verebileceği belirtilmiştir.^{87, 88, 102}

Son 10 yılda yapılan araştırmalar; WNT sinyal yolağının miyelinizasyon ve remiyelinizasyonda önemli bir göreve sahip olduğunu göstermiştir.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Bu aşamada; daha efektif remiyelinizasyon terapilerinin elde edilmesi için inflamatuvar demiyelinizasyon sürecinin nasıl durdurulacağı ve remiyelinizasyonun nasıl destekleneceği hakkında kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, oligodentrositlerin gelişimi ve onarılmasında görev alan WNT sinyal yolağı ile MS

hastalığı arasındaki ilişkinin irdelenmesi, elde edilecek muhtemel sonuçlar ile MS'in etiyolojisine ve tedavisine katkı sağlanabilmesi amacıyla mevcut çalışmamızı gerçekleştirdik.

Çalışmamızda, McDonald 2017 revize kriterlerine göre 17 RRMS tanılı hasta ve 16 sağlıklı kontrol grubu değerlendirildi. Hastalarımızın demografik özellikleri cinsiyet ayrımı açısından literatür ile uyumlu kadın/erkek cinsiyet oranı 2,4 (12/5) 'dür ve çoğu çalışmada kadın oranı daha fazla tespit edildi.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Yine benzer şekilde hastalığın başlangıç yaşı mevcut literatür ile uyumlu olup¹⁰⁹ çalışmamızda bu değer 19-40 olarak tespit edildi. Diğer çalışmalarda, MS hastalarının tedavisinde en çok tercih edilen tedaviler IFN-Beta-1b, Glatiramer Asetat, Fingolimod'dur.¹¹⁰ Çalışmamıza alınan MS hastaları IFN-Beta-1b, Glatiramer Asetat, Fingolimod ilaçlarını kullanmaktadırlar.

Multiple Skleroz ile ilgili yapılan genetik çalışmalar son 10 yılda ciddi derecede artış göstermiş iken, MS gelişiminde miRNA'ların rollerinin tespitine yönelik mevcut literatürde çok az sayıda çalışma mevcuttur. Gerçekleştirilen bu çalışmalar özellikle, miR-7-1, miR-20a, miR-145, miR-146a, miR-146b, miR-155 ve miR-326 üzerinden MS hastalığının patogeneze yönelik çalışmalardır.¹¹¹⁻¹¹⁵ Çalışmamıza alınan miRNA'lardan miR-145; membranı yedi kez geçen WNT proteini için reseptör görevi gören, beta-kateninin nükleer birikimine ve WNT hedef genlerinin aktivasyonuna yol açan beta-katenin klasik sinyalleme yolağına bağlanan frizzed reseptörü üzerine etkili FZD geninin regülasyonunda etkilidir.¹¹⁶ WNT reseptörlerini downregüle etmekle görevli olan TCF4 geni üzerine etkili olan miR-301b,¹¹⁷ Klasik WNT sinyal yolağının anahtar down-regülatör bileşeni olan, hücre yapışmasının düzenlenmesinde rol oynayan β -Catenin proteinini kodlayan CTNNB1 geni regülasyonu yapan miR-214,¹¹⁸ WNT/ β -catenin sinyalleşmesini düzenleyen Mitojen aktive eden protein kinazı düzenleyen MAPK8 geni üzerine etkili olan miR-190a,¹¹⁹ normal embriyonik mezoderm gelişimi ve kaudal somit

oluşumu için gerekli olan, gelişmekte olan nöral tüpün normal morfogenezi için gerekli olan¹²⁰ WNT ligand üzeri etkili olan WNT3A geni regülasyonu yapan miR-1304 olmak üzere beş miRNA'nın ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza alınan miR-145; RRMS hastalarının atak ve remisyon dönemlerinde alınan kan örneklerinde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda eksprese olmuştur. miR-145 ekspresyon düzeyi artışı Grup 1'de anlamlı değil iken, Grup 2'de 3 kattan daha fazla oranda ekspresyon düzeyi tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürde, Sondergaard ve arkadaşları tarafından yapılan ekspresyon çalışmasında miR-145'in MS hastalarında sağlıklı hastalara kıyasla 3 kat daha fazla eksprese olmasının yanı sıra, miR-145'in Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PKMH)'de, serum ve plazmada bulunabilen miR-145'in muhtemel diyagnostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.¹²¹ Keller ve arkadaşlarının 20 MS hastası ve 19 sağlıklı bireyden oluşan çalışmasında ise 866 farklı miRNA profiline bakılmıştır. miR-145'i de içeren 10 miRNA tipinin MS hastalarında disregülasyona uğradığını tespit etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda miR-145'inde içinde olduğu 9 miRNA tipinin MS hastalarında overeksprese olduğunu, yalnızca miR-20b'de downregülasyon tespit edildiğini bildirmişlerdir.¹¹² WNT sinyal yolağında da rolü olduğu bilinen miR-145'in MS hastalarında tespit edilen up-regülasyonunun;¹²² ve WNT sinyal yolağı ile etkileşimde olan FZD7 reseptörünü^{107, 121} hedef alarak oligodentrositlerin farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir.

miR-301b ve miR-190a'nın ekspresyon seviyeleri, Grup 1, Grup 2 ve Kontrol grubunda birbirinden farklı düzeylerde dir. Her iki miRNA tipinde de MS hastalarının atak döneminde kontrol grubuna göre downregülasyon saptanmıştır. Grup 2'de, hem Grup 1'e hem de kontrol grubuna kıyasla up-ekspresyon düzeyi tespit edilmiştir. Remisyon döneminde alınan kan örneklerinden gerçekleştirilen analizler sonucunda miR-301b ve

miR-190a'nın sırasıyla 1,4385 ve 1,7895 kat daha fazla eksprese olduğu belirlenmiştir. Literatürde miR-190'ın kontrol grubunda 0,6 ila 2 kat arasında aşağı regülasyonu, MS hasta grubunda ise 0,2 ila 2 kat arasında up-regülasyonu hiyerarşik küme grafiği sunulmuştur.¹²¹ Diğer bir çalışma ise MS hastalarında miR-130 ailesinde yer alan miR-301b'nin ekspresyonunun TNF-alfa ve IFN-gamma salınımını indükleyerek beyin fonksiyonlarının negatif yönde etkilenmesini sağladığı ifade edilmiştir.¹²³

Çalışmamızda değerlendirmeye alınan diğer bir miRNA tipi olan miR-214; hem atak hem de remisyon dönemindeki hastalardan alınan örneklerde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda eksprese olmuştur. Çalışmaya alınan miR-145'de olduğu gibi remisyon dönemindeki ekspresyon düzeyi, atak dönemde tespit edilen ekspresyon düzeyinden yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada miR-214 seviyesi MS hastalarının remisyon dönemindeki ekspresyon seviyesi atak dönemindeki ekspresyon seviyesinden daha yüksek bulunmuştur. miR-214'ün over-ekspresyonunun; Th17'nin farklılaşma süreci ve TGF- β ile mTOR sinyal yollarının negatif regülasyonu aracılığı ile ortaya çıkan patogeneze rol aldığı da bildirilmiştir.¹²⁴ upregüle olmuş miR-214'ün Th17'nin gelişimi ile IFN-gamma ve diğer sitokinlerin üretimini artıracak ve MS hastalığında görülen inflamatuvar sürecin öncüsü olduğu ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra iki farklı çalışma, miR-214'ün oligodendrositlerde over-ekspresyonunun remiyelinizasyon ve akson rejenerasyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermişlerdir.^{125, 126} WNT sinyal yolağında da rolü olduğu bilinen bir diğer miRNA olan miR-214'ün MS hastalarında tespit edilen up-regülasyonunun tıpkı miR-145'te olduğu gibi oligodendrositlerin farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir.¹²⁷

Çalışmaya alınan miR-1304 ile MS hastalığı arasındaki ilişkiye dair mevcut literatürde çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda hem Grup 1'de hem de Grup 2'de tespit edilen miR-1304 ekspresyon değeri göz önüne alındığında over-ekspresyonunun

mevcut olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızdaki diğer miRNA'lerden elde edilen verilere bakıldığında kontrol grubuna kıyasla hem Grup 1'de hem de Grup 2'de en çok kat artışına sahip olan miRNA olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan literatür taraması sonucunda, MS ile ilişkili olduğuna dair bir veriye rastlanmasa da bir diğer nörolojik hastalık olan epilepsi ile ilişkisi saptanmıştır. miR-1304'ün epilepsi hastalarında ABCB1 genini hedef olarak over-eksprese olduğu ve bu hastalığın etyopatogenezinde bir role sahip olduğu belirtilmiştir.¹²⁸

MS hastalığının etyopatogenezinde birçok miRNA'nın rol aldığı belirtilmiştir. Literatürde miR-18b, miR-599, miR-96,¹²⁹ miR-16-2, miR-100, miR-125b, miR-124, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-326,¹⁰⁸ miR-614, miR-572, miR-648, miR-1826, miR-422a, miR-22,¹³⁰ miR-30e, miR-140, miR-210, miR-500, miR-574,¹⁰⁷ miR-181c, miR-633,¹³¹ miR-93, miR-744,¹²¹ miR-485, miR-497, miR-376a, miR-193a¹³² ve miR-200c¹³³ seviyelerinin up-regülasyonları ile miR-17, miR-20a,¹¹¹ miR-7-1,¹⁰⁸ miR-15b, miR-23a, miR-223,¹³⁴ miR-16-1, miR-15a, miR-152, miR-199a, miR-318,¹³³ miR-572,¹³⁵ miR-1979,¹³⁰ miR-922,¹³¹ ve miR-132¹¹³ seviyelerinin down-regülasyonu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda miRNA tiplerinin MS hastalarında görülen bu disregülasyonları sonucunda bahsi geçen bazı mekanizmalar devreye girmektedir. Bu mekanizmalardan bazıları; Th1/Th17 farklılaşmasının indüklenmesi sonucu sitokin salınımı ile ortaya çıkan inflamatuvar yanıt,¹³⁶ IL-10 sitokin transkripsiyonun, takiben IL-1-beta salınımının ve LPS ile aktive edilmiş monositlerin indüklenmesinin sonucu ortaya çıkan inflamatuvar yanıt,¹²¹ TNF-alfa ve IFN-gamma salınımını indükleyerek beyin fonksiyonlarının negatif yönde etkilenmesi,¹²³ Miyelin Gene Regülatör Faktör (MRF) gen bölgesinin hedeflenmesi sonucu oligodentrositlerin farklılaşmasını indüklenmesi,^{122,} ¹²⁷ IL-17 üretiminin tetiklenerek Th CD+ hücrelerinin MS patogenezine dâhil olmasının

sağlanması¹³⁷ ve CD47 hücrelerinin hedeflenerek miyelinlerin fagositozunun artırılması ile sonuçlanan makrofaj salınımının tetiklenmesidir.⁶⁰

MS’de kullanılan immunmodülatör tedaviler ile miRNA’lar arasındaki ilişki ile ilgili literatürde yayın sayısı oldukça sınırlıdır. IFN-Beta-1b (IFN- β -1b), Fingolimod (FTY720) ve Glatiramer Asetat (GA) tedavileri ile MS hastalarında miRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiye dair bazı çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda yer alan miRNA profilleri bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz miRNA’ların profilleri ile uyumlu değildir. Literatürde, IFN- β -1b tedavisinin; miR-155, miR-27a, miR-532, miR-16, miR-423, miR-346, miR-518b, miR-27a, miR-760, miR-342, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-95, miR-149, miR-181c, miR-193a, miR-193, miR-708 ve miR-874 ekspresyon seviyeleri üzerinde etkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur.^{138, 139} Ayrıca, GA tedavisinin miR-146a ve miR-155 ekspresyon seviyeleri üzerine,¹¹⁵ FTY720 tedavisinin ise miR-15b, miR-23a ve miR-223 ekspresyon seviyeleri üzerine¹⁴⁰ etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda hastalara uygulanan tedavilerin miRNA profilleri üzerine olan etkileri analiz edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm bu veriler ışığında, son 10 yılda yapılan çalışmalar ile MS-miRNA ilişkisinde gelinen nokta; miRNA'ların hücre gelişimini ve farklılaşmasını nasıl düzenlediğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, miRNA'ların immün sistem yanıtlarını modüle etmedeki kritik rolü çalışmalarda desteklenmektedir. Özellikle otoimmünite sürecinde rol alan miRNA profillerinin bilim insanları tarafından son yıllarda ilgi odağı olduğu düşünüldüğünde, gelecekte yapılacak kapsamlı çalışmalar ile WNT sinyal yolağında görev alan miRNA'lardan bazılarının yeni diyagnostik biyobelirteç olarak değerlendirilmesi ve hastalığın mekanizmasının daha da aydınlatılması muhtemeldir.

Son yıllarda MS-miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısında önemli derecede artış olduğu görülmektedir. Bu çalışmaların sonucunda, hastalığın çevresel uyaran, hastalığa yatkınlık ve belirleyici genler arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıktığı öngörülmektedir. Çalışmamız MS gelişimi açısından önemli rolleri olabilecek, WNT sinyal yolağında görev alan miR-145, miR-301b, miR-214, miR-190a ve miR-1304 miRNA'larının araştırılması, ayrıca hastalığın seyri ve mekanizmasının çözülmesine dair gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T*, 2012, 37: 175-184.
2. Zhang J, Guo H, Zhang H, Wang H, Qian G, Fan X, Hoffman AR, Hu JF, Ge S. Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer*, 2011, 117: 86-95.
3. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, Davis RJ. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*, 2013, 339: 218-222.
4. Xia H, Ooi LL, Hui KM. MiR-214 targets beta-catenin pathway to suppress invasion, stem-like traits and recurrence of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2012, 7: e44206.
5. Park JE, Lee JA, Park SG, Lee DH, Kim SJ, Kim HJ, Uchida C, Uchida T, Park BC, Cho S. A critical step for JNK activation: isomerization by the prolyl isomerase Pin1. *Cell Death Differ*, 2012, 19: 153-161.
6. Lu C, He Y, Duan J, Yang Y, Zhong C, Zhang J, Liao W, Huang X, Zhu R, Li M. Expression of Wnt3a in hepatocellular carcinoma and its effects on cell cycle and metastasis. *Int J Oncol*, 2017, 51: 1135-1145.
7. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*, 1996, 45: 322-333.
8. Barbara J-G. Louis Antoine Ranvier (1835–1922). *Journal of neurology*, 2006, 253: 399-400.
9. Vozikis A, Sotiropoulou E. Economic Burden of Multiple Sclerosis on patients: Research Findings from Greece. *Journal of Finance and Economics*, 2013, 1: 36-40.

10. Holmoy T. The discovery of oligoclonal bands: a 50-year anniversary. *Eur Neurol*, 2009, 62: 311-315.
11. Steinman L. Optic neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197: 1065-1071.
12. Rotstein DL, Chen H, Wilton AS, Kwong JC, Marrie RA, Gozdyra P, Krysko KM, Kopp A, Copes R, Tu K. Temporal trends in multiple sclerosis prevalence and incidence in a large population. *Neurology*, 2018, 90: e1435-e1441.
13. Huang WJ, Chen WW, Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp Ther Med*, 2017, 13: 3163-3166.
14. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2015, 14: 183-193.
15. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, 2014, 13: 518-524.
16. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 2010, 140: 918-934.
17. Zindler E, Zipp F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2010, 24: 551-562.
18. Gabert J, Beillard E, Van der Velden V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela J-M, Cave H. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 2003, 17: 2318.
19. Rolf L, Muris A-H, Mathias A, Du Pasquier R, Konecny I, Disanto G, Kuhle J, Ramagopalan S, Damoiseaux J, Smolders J. Exploring the effect of vitamin D3

- supplementation on the anti-EBV antibody response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2018, 24: 1280-1287.
20. Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hunig T, Becher B, Goebels N. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8⁺ T cells causes axonal loss. *Am J Pathol*, 2009, 175: 1160-1166.
 21. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett*, 2011, 585: 3758-3763.
 22. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*, 1994, 44: 11-15.
 23. de Rezende PA, Arruda WO. Genetic aspects in multiple sclerosis: I. Twin studies. *Arq Neuropsiquiatr*, 1996, 54: 433-438.
 24. Canto E, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics. *Multiple Sclerosis Journal*, 2018, 24: 75-79.
 25. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymment DA, Tiislar M, Ferretti V, Tienari PJ, Sadovnick AD, Peltonen L, Ebers GC, Hudson TJ. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 2005, 37: 1108-1112.
 26. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA- DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 2000, 48: 211-219.
 27. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 2015, 64: 13-25.

28. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 2007, 39: 1083.
29. Amatya B, Young J, Khan F. Non-pharmacological interventions for chronic pain in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 12: CD012622.
30. Skleroz M. Tanı Ve Tedavi Kılavuzu 2016.
31. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*, 2005, 202: 473-477.
32. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 2011, 69: 292-302.
33. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*, 1983, 13: 227-231.
34. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 1996, 46: 907-911.
35. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS.

- Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2001, 50: 121-127.
36. Hauser SL, GDMsaoddIFA, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. II. New York: McGraw-Hill Medical;. 2008. pp. 2611–2621.
37. Turan ÖF. Clinically Isolated Syndromes. *Turkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*, 2009, 2: 15.
38. Sharma HS. *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*. Baskı. Elsevier, 2003.
39. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of neurology*, 2005, 58: 840-846.
40. Efendi H. Multipl Skleroz Tanı Ve Tedavi Kılavuzu.
41. Cortese I, Chaudhry V, So YT, Cantor F, Cornblath DR, Rae-Grant A. Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 2011, 76: 294-300.
42. Gold R, Giovannoni G, Selmaj K, Havrdova E, Montalban X, Radue EW, Stefoski D, Robinson R, Riester K, Rana J, Elkins J, O'Neill G, investigators Ss. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2013, 381: 2167-2175.
43. Kappos L, Wiendl H, Selmaj K, Arnold DL, Havrdova E, Boyko A, Kaufman M, Rose J, Greenberg S, Sweetser M, Riester K, O'Neill G, Elkins J. Daclizumab HYP

- versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 2015, 373: 1418-1428.
44. Georges Weill 1866-1952. *Bull Soc Belge Ophtalmol*, 1952, 102: 509-511.
 45. Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, Skoromets A, Stolyarov I, Bass A, Sullivan H, Margolin DH, Lake SL, Moran S, Palmer J, Smith MS, Compston DA. Alemtuzumab more effective than interferon beta-1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*, 2012, 78: 1069-1078.
 46. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 2012, 380: 1829-1839.
 47. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 2012, 380: 1819-1828.
 48. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Vigiuetta V, Dawson KT, Investigators CS. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2012, 367: 1087-1097.
 49. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT, Investigators DS. Placebo-

- controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2012, 367: 1098-1107.
50. Filippi M, Preziosa P, Meani A, Ciccarelli O, Mesaros S, Rovira A, Frederiksen J, Enzinger C, Barkhof F, Gasperini C, Brownlee W, Drulovic J, Montalban X, Cramer SP, Pichler A, Hagens M, Ruggieri S, Martinelli V, Miszkiet K, Tintore M, Comi G, Dekker I, Uitdehaag B, Dujmovic-Basuroski I, Rocca MA. Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. *Lancet Neurol*, 2018, 17: 133-142.
51. Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, Galea I. Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011: CD007621.
52. Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J, Liu S, Zhu Y, Seddighzadeh A, Hung S, Deykin A, Investigators AS. Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis a randomised, phase 3, double-blind study. *Lancet Neurol*, 2014, 13: 657-665.
53. Henze T, Rieckmann P, Toyka K. Symptomatic treatment of multiple sclerosis. *European neurology*, 2006, 56: 78-105.
54. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*, 2011, 90: 430-440.
55. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843-854.

57. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 99-110.
58. Mahmood S, Bhatti A, Syed NA, John P. The microRNA regulatory network: a far-reaching approach to the regulate the Wnt signaling pathway in number of diseases. *J Recept Signal Transduct Res*, 2016, 36: 310-318.
59. Song JL, Nigam P, Tektas SS, Selva E. microRNA regulation of Wnt signaling pathways in development and disease. *Cell Signal*, 2015, 27: 1380-1391.
60. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res*, 2011, 157: 163-179.
61. Sonkoly E, Pivarcsi A. microRNAs in inflammation. *Int Rev Immunol*, 2009, 28: 535-561.
62. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res*, 2011, 717: 1-8.
63. Lee CT, Risom T, Strauss WM. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol*, 2007, 26: 209-218.
64. Güzelgöl F, Aksoy K. Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2015, 24: 472-493.
65. Hitit M, Kurar E, Güzeloğlu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10.
66. Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*, 2011, 43: 892-903.

67. Fiorucci G, V Chiantore M, Mangino G, A Percario Z, Affabris E, Romeo G. Cancer regulator microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19: 461-474.
68. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B- cell lymphoma. *British journal of haematology*, 2008, 141: 672-675.
69. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99: 15524-15529.
70. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene therapy*, 2006, 13: 496.
71. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, 436: 214.
72. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, 309: 310-311.
73. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome biology*, 2013, 14: R78.
74. van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circulation research*, 2012, 110: 496-507.
75. Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, Choi YH, Tuschl T, Bosio A. Combined characterization of microRNA and mRNA profiles

- delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 2011, 29: 847-857.
76. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*, 2006, 6: 857.
77. 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: 34512.
78. Luo D, Fu J. Identifying characteristic miRNAs-genes and risk pathways of multiple sclerosis based on bioinformatics analysis. *Oncotarget*, 2018, 9: 5287-5300.
79. Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11: 547-553.
80. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 59-88.
81. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 691-701.
82. Zwamborn RA, Snijders C, An N, Thomson A, Rutten BP, de Nijs L. Wnt Signaling in the Hippocampus in Relation to Neurogenesis, Neuroplasticity, Stress and Epigenetics. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2018.
83. He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian CN, Zhang J. Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chin J Cancer*, 2015, 34: 554-562.
84. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005, 437: 1370-1375.

85. Fancy SP, Zhao C, Franklin RJ. Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27: 247-254.
86. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessaris N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 578-590.
87. Xie C, Li Z, Zhang GX, Guan Y. Wnt signaling in remyelination in multiple sclerosis: friend or foe? *Mol Neurobiol*, 2014, 49: 1117-1125.
88. Goldschmidt T, Antel J, Konig FB, Bruck W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology*, 2009, 72: 1914-1921.
89. Stadelmann C, Bruck W. Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *J Neurol*, 2008, 255 Suppl 1: 12-18.
90. Maurer M, Dachsel R, Domke S, Ries S, Reifschneider G, Friedrich A, Knorn P, Landefeld H, Niemczyk G, Schicklmaier P, Wernsdorfer C, Windhagen S, Albrecht H, Schwab S, Investigators TS. Health care situation of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving immunomodulatory therapy: a retrospective survey of more than 9000 German patients with MS. *Eur J Neurol*, 2011, 18: 1036-1045.
91. Remington GM, Treadaway K, Frohman T, Salter A, Stuve O, Racke MK, Hawker K, Agosta F, Sormani MP, Filippi M, Frohman EM. A one-year prospective, randomized, placebo-controlled, quadruple-blinded, phase II safety pilot trial of combination therapy with interferon beta-1a and mycophenolate mofetil in early

- relapsing-remitting multiple sclerosis (TIME MS). *Ther Adv Neurol Disord*, 2010, 3: 3-13.
92. Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Hommes OR. Intravenous immunoglobulin in MS: promise or failure? *J Neurol Sci*, 2007, 259: 61-66.
 93. Hoffmann V, Kuhn W, Schimrigk S, Islamova S, Hellwig K, Lukas C, Brune N, Pohlau D, Przuntek H, Muller T. Repeat intrathecal triamcinolone acetone application is beneficial in progressive MS patients. *Eur J Neurol*, 2006, 13: 72-76.
 94. Polman C, Barkhof F, Sandberg-Wollheim M, Linde A, Nordle O, Nederman T, Laquinimod in Relapsing MSSG. Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology*, 2005, 64: 987-991.
 95. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 2001, 29: e45-e45.
 96. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 39: 81-86.
 97. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 2003, 17: 2318-2357.

98. Bignotti E, Calza S, Tassi RA, Zanotti L, Bandiera E, Sartori E, Odicino FE, Ravaggi A, Todeschini P, Romani C. Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 2341-2348.
99. Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dorr J, Pfueller CF, Harms L, Niendorf T, Paul F, Wuerfel J. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-field strength magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol*, 2012, 69: 739-745.
100. Saridas F. Investigation of miRNAs associated with Multiple Sclerosis development. Neurology. Bursa: Uludag University, 2018.
101. de Faria O, Jr., Moore CS, Kennedy TE, Antel JP, Bar-Or A, Dhaunchak AS. MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Front Genet*, 2012, 3: 311.
102. Stadelmann C, Bruck W. Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 2008, 255: 12-18.
103. Ciani L, Boyle KA, Dickins E, Sahores M, Anane D, Lopes DM, Gibb AJ, Salinas PC. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca(2)(+)/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 10732-10737.
104. Hutchins BI, Li L, Kalil K. Wnt-induced calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Sci Signal*, 2012, 5: pt1.
105. Tuller T, Atar S, Ruppin E, Gurevich M, Achiron A. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. *Genes Immun*, 2013, 14: 67-82.

106. Viswambharan V, Thanseem I, Vasu MM, Poovathinal SA, Anitha A. miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. *Biomarkers in Medicine*, 2017, 11: 1-10.
107. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, Nejad P, Patel B, Hei H, Khoury S, Quintana F, Kivisakk P, Chitnis T, Weiner HL. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in Multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 2013, 73: 729-740.
108. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stahler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, Kappel A, Wright I, Dorr J, Paul F, Diem R, Tocariu-Krick B, Meder B, Backes C, Meese E, Ruprecht K. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler*, 2014, 20: 295-303.
109. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM. *Neurology in clinical practice*. Baskı. 2008: 1159-1187.
110. Sorensen PS. New management algorithms in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 2014, 27: 246-259.
111. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J, Consortium ANMSG. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One*, 2010, 5: e12132.
112. Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One*, 2009, 4: e7440.

113. Moore CS, Rao VT, Durafourth BA, Bedell BJ, Ludwin SK, Bar-Or A, Antel JP. miR-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. *Annals of Neurology*, 2013, 74: 709-720.
114. Paraboschi EM, Solda G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD, Salviati A, Barizzzone N, Leone M, Duga S, Asselta R. Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 8695-8712.
115. Waschbisch A, Atiya M, Linker RA, Potapov S, Schwab S, Derfuss T. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One*, 2011, 6: e24604.
116. Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci*, 2014, 127: 1565-1575.
117. Dai R, Frejtag W, He B, Zhang Y, Mivechi NF. c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 2000, 275: 18210-18218.
118. Lillehoj EP, Lu W, Kiser T, Goldblum SE, Kim KC. MUC1 inhibits cell proliferation by a beta-catenin-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1028-1038.
119. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietilainen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Borglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Bottcher Y, Olesen J, Breuer R, Moller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Rethelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R,

- Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemeny LA, Genetic R, Outcome in P, Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jonsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson H, Nothen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, 2009, 460: 744-747.
120. Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, Takagi J. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/alpha-albumin. *Elife*, 2016, 5.
 121. Sondergaard HB, Hesse D, Krakauer M, Sorensen PS, Sellebjerg F. Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2013, 19: 1849-1857.
 122. Yoshikawa H. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein modulates the arrangement of radial growth of the axon and the radial component of myelin. *Med Electron Microsc*, 2001, 34: 160-164.
 123. Lopez-Ramirez MA, Reijerkerk A, de Vries HE, Romero IA. Regulation of brain endothelial barrier function by microRNAs in health and neuroinflammation. *FASEB J*, 2016, 30: 2662-2672.
 124. Ahmadian-Elmi M, Bidmeshki Pour A, Naghavian R, Ghaedi K, Tanhaei S, Izadi T, Nasr-Esfahani MH. miR-27a and miR-214 exert opposite regulatory roles in Th17 differentiation via mediating different signaling pathways in peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunogenetics*, 2016, 68: 43-54.
 125. Lin ST, Fu YH. *DMM Disease Models and Mechanisms*. Baski. 2009.

126. Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, Johnson KR, Notterpek L, Hudson LD. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci*, 2008, 28: 11720-11730.
127. Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, Ibrahim A, Ligon KL, Rowitch DH, Barres BA. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell*, 2009, 138: 172-185.
128. Huang L, Wang X, Zou J, Li J, Lu Q. Dysregulation of miR-1304-3p in hippocampus and serum of patients with intractable epilepsy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017, 10: 4263-4272.
129. Otaegui D, Baranzini SE, Armananzas R, Calvo B, Munoz-Culla M, Khankhanian P, Inza I, Lozano JA, Castillo-Trivino T, Asensio A, Olaskoaga J, Lopez de Munain A. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One*, 2009, 4: e6309.
130. Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 6219-6225.
131. Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Decard BF, Thum T, Gold R. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*, 2012, 79: 2166-2170.
132. Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol*, 2010, 40: 888-898.
133. Yang D, Wang WZ, Zhang XM, Yue H, Li B, Lin L, Fu J. MicroRNA expression aberration in Chinese patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*, 2014, 52: 131-137.
134. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Bonsi R, Serpente M, Villa C, Pietroboni AM, Naismith RT, Alvarez E, Parks BJ, Bresolin N, Cross AH, Piccio

- LM, Galimberti D, Scarpini E. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2013, 19: 1938-1942.
135. Mancuso R, Hernis A, Agostini S, Rovaris M, Caputo D, Clerici M. MicroRNA-572 expression in multiple sclerosis patients with different patterns of clinical progression. *J Transl Med*, 2015, 13: 148.
 136. Aljawadi ZA, Al-Derzi AR, Abdul-Majeed BA, Almahdawi AM. MicroRNAs (20a, 146a, 155, and 145) expressions in a sample of Iraqi patients with multiple sclerosis. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, 2016, 58: 371-377.
 137. Fenoglio C, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E. MicroRNAs as active players in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 13227-13239.
 138. Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, Schroder I, Flechtner K, Freiesleben S, Fullen G, Thiesen HJ, Zettl UK. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 16087-16110.
 139. Singh J, Deshpande M, Suhail H, Rattan R, Giri S. Targeted Stage-Specific Inflammatory microRNA Profiling in Urine During Disease Progression in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Markers of Disease Progression and Drug Response. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11: 84-97.
 140. Fenoglio C, De Riz M, Pietroboni AM, Calvi A, Serpente M, Cioffi SM, Arcaro M, Oldoni E, Scarpini E, Galimberti D. Effect of fingolimod treatment on circulating miR-15b, miR23a and miR-223 levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2016, 299: 81-83.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Ezgi YAŞAR
Doğum tarihi:	25.04.1989
Doğum Yeri:	Bayburt
Medeni Hali:	Evli, 1 çocuk
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel:	0442 3446949
Faks:	-
E-mail:	ezgiozer89@gmail.com
Eğitim	
Lise:	İbrahim Hakkı Fen Lisesi (2003-2006)
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi (2006-2012)
Yüksek lisans:	-
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2014-2019)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi derecede (B2 seviyesinde)
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	
At biniciliği, bisiklet, kitap okuma	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi EDA BALKAN danışmanlığında sunulan “Multiple Skleroz Hastalarında WNT Sinyal yolağında görev alan miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%9	15
Genel Bilgiler	%21	30
Materyal ve Metod	%19	35
Bulgular	%7	10
Tartışma	%8	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 16 / 07/ 2019

Arş.Gör. Dr. Ezgi YAŞAR
İmza :



Dr. Öğr. Üyesi Eda BALKAN
İmza :



* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Arş.Gör.Dr.Ezgi YAŞAR
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Multiple Skleroz Hastalarında Wnt Sinyal Yolağında Görev Alan miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 6 Karar No: 15	Tarih: 30.11.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.	
	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Prof.Dr.Hamidullah UYANIK
Üye

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Doç.Dr.İlker İNCE
Üye

Yrd.Doç.Dr.Binali FIRINCI
Üye

Emrah MELETLIOĞLU
Üye

EK-4. RRMS HASTALARINA AİT DEMOGRAFİK VERİLER VE miRNA EKSPRESYON SEVİYELERİ

Hasta No	Cns.	Yaş	Hast./yıl	Atak sayısı	Kullandığı ilaç	miR-145 Eksp. düzeyi		miR-301b Eksp. düzeyi		miR-214 Eksp. düzeyi		miR-190a Eksp. düzeyi		miR-1304 Eksp. düzeyi	
						G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
H 1	K	39	3	5	GA	1,85	1,91	3,86	1,25	5,07	2,66	1,98	0,44	1,25	1,71
H 2	K	25	3	4	FTY720	0,96	2,98	1,07	1,74	1,75	3,48	1,06	2,57	0,41	7,42
H 3	K	36	13	10	IFN-β-1b	0,88	2,35	0,82	1,37	0,53	1,64	0,88	1,17	1,83	3,01
H 4	K	20	Yeni tanı	1	-	0,59	2,80	0,85	1,25	0,51	2,36	0,95	1,16	1,22	11,89
H 5	E	34	5	6	GA	0,40	4,36	0,46	1,23	0,25	3,34	0,42	2,75	0,93	3,10
H 6	K	28	1	2	GA	0,20	2,32	0,31	0,96	0,14	2,07	0,31	1,64	0,27	3,12
H 7	K	40	15	20	FTY720	2,69	2,21	0,94	0,92	2,75	1,93	1,89	1,67	4,96	2,04
H 8	E	27	Yeni tanı	1	-	2,67	3,72	0,67	1,58	2,14	3,16	1,41	2,55	4,47	4,47
H 9	K	23	3	8	FTY720	2,49	3,15	1,98	1,25	3,05	2,57	1,67	1,92	4,32	3,03
H 10	K	27	5	9	FTY720	3,18	4,45	0,82	1,46	3,12	3,46	1,86	3,30	5,90	4,20
H 11	E	19	Yeni tanı	1	-	1,05	8,91	0,19	3,78	0,60	6,59	0,48	2,61	0,88	9,93
H 12	K	39	2	4	IFN-β-1b	1,34	3,11	0,74	1,81	0,75	3,27	0,44	1,88	1,25	2,85
H 13	K	21	2	5	IFN-β-1b	1,78	5,41	0,43	1,41	1,80	4,73	0,74	2,30	2,59	3,61
H 14	K	20	2	7	FTY720	2,69	4,48	1,06	1,70	2,36	3,97	1,58	2,71	3,87	3,95
H 15	E	37	1	2	-	1,52	3,28	1,03	1,53	1,98	2,48	1,04	1,49	2,41	3,21
H 16	K	25	Yeni tanı	1	-	2,32	2,47	0,93	1,17	1,95	3,32	1,35	1,01	2,39	2,19
H 17	E	27	2	4	IFN-β-1b	1,49	5,41	0,68	1,41	1,28	4,73	0,94	2,3	1,66	3,61
Ortalama		28,64	5,29	3,35		1,65	3,73	0,99	1,52	1,77	3,28	1,12	1,97	2,39	4,31

Cns: Cinsiyet, Hast./yıl: Hastalık Süresi/Yıl, G1:Grup 1, G2:Grup 2, GA: Glatiramer Asetat, FTY720:Fingolimod, IFN-β-1b:Interferon Beta-1b,