



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE SKLEROZ GELİŞİMİ İLE İLİŞKİLİ miRNA'LARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Furkan SARIDAŞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa-2018**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE SKLEROZ GELİŞİMİ İLE İLİŞKİLİ miRNA'LARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Furkan SARIDAŞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof.Dr. Mehmet ZARİFOĞLU**

**Bursa-2018**

# İçindekiler

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. ÖZET .....                                                                         | iii |
| 2. SUMMARY .....                                                                      | v   |
| 3. GİRİŞ .....                                                                        | vi  |
| 3.1 Multipl Skleroz .....                                                             | 2   |
| 3.1.1 Tanım .....                                                                     | 2   |
| 3.1.2 Patofizyoloji.....                                                              | 3   |
| 3.1.3 Etiyoloji.....                                                                  | 4   |
| 3.1.4 Epidemiyoloji.....                                                              | 5   |
| 3.1.5 Klinik alt tipleri .....                                                        | 5   |
| 3.1.6 Tedavi.....                                                                     | 8   |
| 3.2 Mikrobiota .....                                                                  | 8   |
| 3.3 MikroRNA.....                                                                     | 11  |
| 3.4 Multiple Skleroz ve MikroRNA .....                                                | 25  |
| 4. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                              | 43  |
| 4.1 Gereç.....                                                                        | 43  |
| 4.1.1 Çalışma Grubu .....                                                             | 43  |
| 4.1.2 Materyal.....                                                                   | 43  |
| 4.2 Çalışmada Kullanılan Ölçekler ve Yöntemler: .....                                 | 44  |
| 4.2.1 Kandan RNA İzolasyonu .....                                                     | 44  |
| 4.2.2 Gaytadan RNA İzolasyonu .....                                                   | 44  |
| 4.2.3 Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini.....                              | 45  |
| 4.2.4 Kan ve Gaytadan cDNA Sentezi.....                                               | 46  |
| 4.2.5 Ekspresyon Analizi.....                                                         | 46  |
| 4.2.6 RT-PCR Tabanlı MikroRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi .....        | 47  |
| 4.2.7 Klinik Değerlendirme.....                                                       | 47  |
| 4.3 İstatistiksel Analiz.....                                                         | 48  |
| 5. BULGULAR.....                                                                      | 49  |
| 5.1 Demografik Veriler .....                                                          | 49  |
| 5.2 MikroRNA Ekspresyon Ortalamaları .....                                            | 50  |
| 5.3 RRMS, KiS, RiS ve Kontrol Grubu Tanımlayıcı Verileri ve Anlamlılık Değerleri..... | 51  |
| 5.4 Klinik Özelliklere Göre Analizler .....                                           | 52  |
| 5.5 ROC Analizleri.....                                                               | 54  |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 6. TARTIŞMA ve SONUÇ ..... | 56 |
| 7. EKLER.....              | 83 |
| 8. TEŞEKKÜR .....          | 89 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ .....          | 89 |



## ÖZET

Multiple Skleroz etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, ancak genetik zeminde çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıktığı düşünülen, periferde başlayarak otoimmün sürecin santral sinir sistemine geçmesi ve tekrar şekillenmesi ile seyreden, santral sinir sisteminin inflamatuvar demiyelinizan nörodejeneratif otoimmün bir hastalığıdır. Multiple skleroz'un tanısı radyolojik ve labaratuvar (beyin omurilik sıvısı incelemesi vs.) bulguları ışığında klinik olarak konulmaktadır. Bu tanı sürecinde yardımcı laboratuvar tekniklerinden beyin omurilik sıvısı incelemesi komplikasyonu olabilen lomber ponksiyon aracılığı ile yapılmakta ve bazı olgularda çekincelere neden olmaktadır. Ayrıca Multiple Skleroz hastalığının öncülü olarak kabul edilen Klinik İzole Sendrom ve Radyolojik İzole sendrom tanılı hastalar yıllar içindeki takiplerinde Multiple Skleroz tanısı alabilmekte ve bu aşamadan önce tanı konulup riskli olabilecek hasta gruplarında tedavi başlanması ileride gelişebilecek özürüllüğü engellemede oldukça önemlidir.

mikroRNA (miRNA)'ların hücresel gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynadığı, kanserden otoimmün hastalıklara kadar birçok patogeneze ile ilişkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. miRNA ekspresyonlarının özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. miRNA-146a ve miRNA-155; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuvar araçlarla uyarılan, inflamatuvar uyarıya cevapta merkezi bir rol oynadığı düşünülen miRNA'lardır. Ayrıca miRNA-10a, miRNA-146a ve miRNA-155'in gastrointestinal mukoza ile hematopoetik sistem ve immün sistem arasındaki etkileşimde görev aldıkları saptanmıştır.

Multiple skleroz etiyolojisi multifaktöriyeldir. Otoimmünite, genetik faktörler, D vitamini, sigara ve geçirilmiş EBV enfeksiyonunun etyolojide rol aldığı birçok çalışmada belirtilmiştir. Hastalığın etyopatogenezinde, muhtemelen çevresel uyaran (örn; enfeksiyon), yatkınlık genleri (nöroinflamasyona yatkınlık sağlayan genlere sahip bireyler) ve belirleyici genler (yatkın bireylerdeki hastalık fenotipi) arasındaki etkileşimler rol

oynamaktadır. miRNA aracılı gen düzenlenmesi gibi epigenetik mekanizmalar ise bireydeki hastalığa yatkınlığı ve hastalık şiddetini belirleyebilmektedir.

Bu çalışmada, MS hastalığının patofizyolojisinin anlaşılması, hastalığın tanı ve tedavi hedeflerine katkı sağlamak için, yeni potansiyel biyobelirteç ve terapötik hedef olabilecek miRNA'lardan miRNA-10a, miRNA-146a ve miRNA-155'in MS hastalığın gelişimi ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmamıza Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda Multiple Skleroz Polikliniği'nde Ekim 2015 – Mart 2018 tarihleri arasında Multiple Skleroz, Klinik İzole Sendrom, Radyolojik İzole Sendrom tanısı ile izlenen 82 hasta ve hastanemiz personelinden oluşan 32 sağlıklı bireyin kan ve feçes materyallerinde miRNA-10a, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyonları real-time PCR analizi ile değerlendirilmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre, RRMS, KİS ve RİS gelişimi ile mir-10a ekspresyon disregülasyonunun biyobelirteç potansiyeli taşıyacak düzeyde istatistiksel olarak anlamlı olduğu, miR-146a ve miR-155 ekspresyon düzeylerinin ise RRMS tanılı hastalarda tanı yaşı, hastalık süresi ve atak sayısı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Multiple Skleroz , Klinik İzole Sendrom, Radyolojik İzole Sendrom, miRNA

## **SUMMARY**

### **INVESTIGATION OF miRNAs ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS DEVELOPMENT**

Multiple sclerosis is a neurodegenerative autoimmune disease of the central nervous system, which has not been fully illuminated but is thought to be caused by environmental factors on the genetic basis. The diagnosis of multiple sclerosis neurological examination, radiological findings, and laboratory (cerebrospinal fluid examination, etc.) are placed with findings. In this diagnostic process, a spinal fluid examination of the brain is performed through lumbar puncture, which may be a complication, and in some cases causes reservations. In addition, patients with clinical isolated syndrome and Radiological isolated syndrome diagnosed as the leading cause of multiple sclerosis can become Multiple Sclerosis in the follow-up and the initiation of treatment in patients with risk factors is very important in preventing disability in the future.

The recent studies have shown that microRNAs play an important role in cellular development, homeostasis and immune function, and are associated with many pathogenesis from cancer to autoimmune diseases. miRNA (miR-) Expression has been determined to regulate specific immune response and inflammatory response. miR-146a and miR-155 are miRNA that are stimulated by pro-inflammatory agents such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which are thought to play a central role in the response to inflammatory stimuli. In addition, miR-10a, miR-146a and miR-155 were involved in the interaction between microbiota, gastrointestinal mucosa and hematopoietic system and immune system.

The etiology of multiple sclerosis is multifocal. Autoimmune diseases, genetic factors, vitamin D, smoking and recurrent EBV infection have been

reported in many studies involving etiology. The disease is probably caused by interactions between environmental stimulus (e.g. infection), predisposition genes (individuals with genes that predispose to neuroinflammation), and determining genes (the phenotype of disease in predisposed individuals). Epigenetic mechanisms such as miRNA mediated gene regulation can determine the predisposition and severity of the disease in the individual.

In this study, we aimed to evaluate the pathophysiology of MS disease and the changes in MS disease of miR-10a, miR-146a and miR-155, a new biomaterial and therapeutic target in order to contribute to the diagnosis and treatment objectives of MS disease. In the present study, miR-10a, miR-146a and miR-155 expression in blood and feces materials of 82 patients with Multiple Sclerosis in Uludağ University Faculty of Medicine Department of Neurology between October 2015 and March 2018 were evaluated with the real-time PCR method.

According to the results of the study, Relapsing Remitting Multiple Sclerosis, Clinically Isolated Syndrome and Radiologically Isolated Syndrome development and miR-10a expression dysregulation were associated with the level of non invasive biological diagnostic potential, and miR-146a and miR-155 expression levels were determined to vary with age, duration of disease and number of attacks in patients diagnosed with RRMS.

**Key words:** Multiple Sclerosis, Clinical isolated syndrome, Radiological isolated syndrome, miRNA.

## GİRİŞ

Multiple Skleroz (MS) santral sinir sistemini tutan, optik sinir, beyin ve omurilikte enflamasyon ve demiyelinizasyonun neden olduğu ataklar ve/veya progresyon ile seyreden, multifaktöriyel etyopatogenezi olan ve sıklıkla genç erişkin nüfusu etkileyen kronik bir hastalıktır (1).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, Kuzey Amerika ve Avrupa'da en yüksek prevalans düzeylerine ulaşmakla birlikte tüm dünya çapında iki milyondan fazla insanı etkilemektedir.

Nörodejeneratif hastalıklar göz önüne alındığında ise MS, Parkinson hastalığı (PH) ve Alzheimer hastalığı (AH) ile barsak florası arasındaki ilişkiyi ortaya koyan yeni birçok çalışmalar mevcuttur. Parkinson hastalığı ile ilgili barsak mikroorganizmaları tarafından başlatılan primer immun yanıtın inflamatuvar bir yanıt ile beyin amiloidi olan a-synükleinin yanlış katlanmasına yol açabileceği (2), bakteriyel proteinlerin inflamasyon, oksidatif stres ve sitotoksite aracılığı ile PH'nin ilerlemesini indükleyebileceği (3), bu süreçte nöroinflamatuvar yanıtın Toll benzeri reseptör-2'nin (TLR2) upregülasyonu ve mikroglianin aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve hayvan modellerinde periferik inflamatuvar yanıtın mikrogliada kompleman yolağını indükleyerek dopaminerjik nöron hasarına yol açtığı çalışmada belirtilmiştir (4,5). Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda ise özellikle davranış değişikliğinin barsak florası ile ilgili olduğu öne sürülmüştür. Normal diyet ve yüksek yağlı diyet verilen farelerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, yüksek yağlı diyet grubundaki farelerde santral inflamatuvar yanıtta artma ve bilişsel davranışta bozulma gözlemlenmiştir (6). Kronik inflamatuvar, demiyelinizan ve nörodejeneratif patogeneze sahip MS ile mikrobiota arasındaki ilişkiyi göstermeye çalışan çalışmalar ilk olarak hayvanlarda bir MS modeli olarak geliştirilen deneysel allerjik ensefalomyelit olgularında saptandı. Ochoa-Reparaz ve arkadaşları farelerde ensefalomyelit geliştirmeden önce bağırsak mikroorganizmalarını değiştirmek için bir antibiyotik karışımı kullandılar. Oral

yoldan verilen antibiyotiklerle yapılan tedavinin fekal ve bağırsak mikroorganizmalarını önemli ölçüde azalttığını ve Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit gelişme ihtimalini ve şiddetini belirgin şekilde azaltabileceğini saptadılar (7).

Birçok kanser ve inflamatuvar hastalıkların etiyolojisinde rol alabileceği belirtilen ve bu alanda çalışmaların yoğunlaştığı mikroRNA (miRNA, miR-) araştırmaları son dönemlerde özellikle ilgi toplamaktadır. İmmün sistem hücrelerinin fonksiyonlarını ve görevlerini düzenleyen miRNA'lar ile ilgili MS hastalarında da yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu yapılan çalışmalarda birçok miRNA araştırılmış; özellikle miR-155 ve miR-146a'nın bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca miRNA'ların yine tanı alan olgularda prognostik değerlerinin olabileceği ve ileri dönemde tedavi hedefi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Ülkemizde ise MS tanılı hastaların barsak floraları, hastalık etyopatogenezi ile gastrointestinal sistem ve miRNA ekspresyonları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmamızda MS ve bu tanıyı almadan önceki dönemi temsil eden Klinik İzole Sendrom (KİS) ve Radyolojik İzole Sendrom (RİS) tanısı almış olgularla sağlıklı bireylerin serum ve gayta örneklerinde miRNA (miR-10a, miR-146a ve miR-155) analizleri yaparak; bu miRNA'ların MS gelişiminden önceki dönemlerdeki (KİS, RİS) ve MS tanısı aldıktan sonra hastalık progresyonundaki değişimlerini, prognostik değerlerini ve farklı immunomodülatör tedavilerin bu mikroRNA'lar üzerinde oluşturduğu değişimleri ortaya koymaya çalıştık.

### **3.1 Multipl Skleroz**

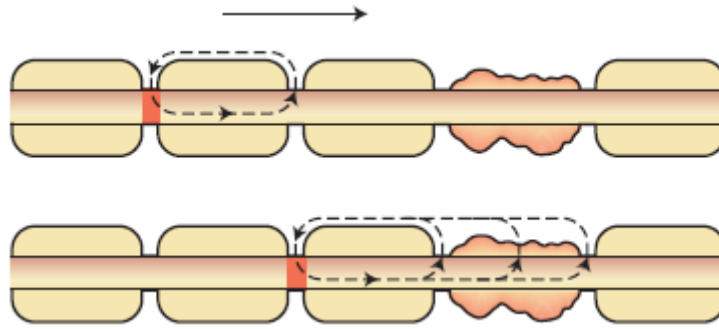
#### **3.1.1 Tanım**

Multipl Skleroz (MS) inflamasyon, demyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize, sıklıkla beyaz cevheri tutan ancak korteks ve derin gri cevherde de görülebilen merkezi sinir sisteminin kronik otoimmün bir hastalığıdır (8).

MS; travmadan sonra genç erişkinlerde gözlenen en sık nörolojik bozukluktur. Genellikle 20-40 yaş arasında başlar ve kadın cinsiyet hakimiyeti vardır. Kadınlarda daha iyi prognozludur. Hastalık sıklıkla genç yetişkinlerde ortaya çıkar (9). Prevalansı coğrafi özelliklere bağlı olarak 100.000'de 2 ile 200 arasında değişmekte olan prevelansın ülkemizde 30.000-50.000 arasında olduğu tahmine dilmektedir.

### 3.1.2 Patofizyoloji

MS MSS'de görülen patolojik sürecin yani demiyelinizasyon ve orta derecede aksonal kayıba bağlı belirti ve bulgu verir. Demiyelinizasyon sürecinde düğüm noktalarında aksonal elektriksel akımın yalıtkanlığı bozulduğu için yavaşlatmakta hatta uzun segment bir demiyelinizasyon söz konusu olduğunda akımı kesintiye uğrayabilir.



**Şekil-1:** Sinir lifinin normal (üst) ve demiyelinize (alt) bölgelerindeki impuls iletiminin şematik diyagramı (10).

Bu yapısal değişikliklere ilaveten, plak ve periplak bölgesindeki otoimmün hücreler tarafından serbest bırakılan sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri gibi faktörler hücreler veya aksonlar için toksik etki oluşturup sinir iletiminin fonksiyonel bozulmasında rol almakta olduğuda göz ardı edilmemelidir.

Periferde aktivasyona uğrayan immün hücrelerin yüzeyinde hedef dokuya göçü kolaylaştıracak moleküllerden olan selektin, kan beyin bariyerindeki ligandları ile etkileşime geçerek hücrelerin endotel üzerinde yuvarlanmalarını ve ardından integrin adezyon molekülleri de bağlanma/tutulmalarını sağlarlar. Buna karşın hedef dokudan salgılanan kemokinler

kimyasal gradienti yöneterek ve intergin aktivasyonunu artırarak bununla birlikte immun sistem hücrelerinden salınan matriks metalloproteinazlar da bazal membranın yapısını bozarak dokuya infiltrasyonu artırılır. Sonuç olarak kan beyin bariyeri yapısı hasara uğrayarak geçirgenlik bozulur ve immun hücrelerin infiltrasyonunu kolaylaştır (11).

### **3.1.3 Etiyoloji**

#### **3.1.3.1 Otoimmünite**

MS için nedensel mekanizma olarak otoimmünite olma ihtimali var olsa da, bu konu ispatlanamamıştır(12)(13).

#### **3.1.3.2 Genetik**

Orta düzeyde etkili birçok genetik ve nongenetik faktörün etkileşimi hastalık olasılığını artırmaktadır. Genel popülasyona kıyasla, MS'in ailesel oluşumunda daha yüksek bir sıklık duyarlılığın güçlü ancak Mendel olmayan bir kalıtım olduğunu düşündürmektedir (14,15).

MS hem MHC hem de insan lökosit antijeni (HLA) sınıfı I A3 ve B7 antijenleri ile ilişkilidir. Sınıf II polimorfizmleri, Dw2 ve DR2, aynı zamanda güçlü bir ilişki ve özellikle HLA DRB1 \* 1501 alleli göstermektedir (16). MHC sınıfı dışında da MS'ye yakınlık oluşturabilecek gen lokusları saptanmıştır. IL-7 reseptör bölgesi ve IL-2 reseptör bölgesi güçlü bir şekilde MS'ya yakınlıkta rolü olan bölgelerdir (17). IL-7 ve IL-2 reseptör sinyali, CD4-CD8-timositlerin farklılaşması ve seleksiyondan sonra CD4 + ve CD8 + hücrelerinin hayatta kalmasında bir role sahiptir.

#### **3.1.3.3 Enfeksiyöz**

MS etyolojisinde muhtemel bir mikrobiyal enfeksiyon yolu vardır. Belirli bir viral genom saptanamazken son yıllarda, insan herpesvirüs 6 (HHV6), Epstein-Barr virüsü (EBV) ve Chlamydia pneumoniae gibi patojenler arasında en olası ilişkinin EBV ile MS arasında olabileceği düşünülmüştür. EBV enfeksiyonları asemptomatik olarak daha yaygın görülürken semptomatik olarak gözlemlenen enfeksiyöz mononükleoz öyküsü MS için risk oluşturmaya yakınlık görülmektedir (18). Enfeksiyöz Mononükleoz öyküsü olan hastalarda MS gelişme riski normalden 2-3 kat daha fazladır (19). Bu ilişki

EBV'nin direkt MSS'de inflamasyon oluşturarak veya moleküler düzeyde benzerlikten dolayı uygunsuz otoreaktif cevabın oluşması şeklinde açıklanmıştır (20).

#### **3.1.3.4 Vitamin D**

Düşük vitamin D düzeyleri, bir çok farklı çalışmada artmış MS riski ile ilişkilendirilmiştir. MS'te yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ekvatordan uzaklaştıkça insidansın arttığı saptanmış ve takip edilen diğer çalışmalarda bu artışın güneş ışınlarına mağruziyet ve D vitamin düzeyleri ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Düşük D vitamini ile MS gelişme riskini arttığını ve replasman ile bu riskin azaltılabileceğini vurgulayan birçok çalışma yayınlanmıştır (21-23). Son yıllarda ise bunun kesin kanıt düzeyinde risk faktörü olduğu belirtilmektedir (24).

#### **3.1.3.5 Sigara**

Sigara nörotoksiktir ve inflamasyonu tetikler. Ayrıca, zayıf da olsa, sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre daha şiddetli bir seyre sahip olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (25).

#### **3.1.4 Epidemiyoloji**

Birçok çalışmada relapsing form MS'te ortalama başlangıç yaşının 29-32 arasında olduğu belirtilmiştir. Hastaların %5'i 18 yaş öncesinde, %3-12'ü ise 50 yaşından sonra MS tanısı almaktadır (26). Primer Progresif MS'te kadın/erkek oranı 1 iken diğer formlarda 2/1-3/1'dir (27). Ülkemizdeki güncel verilere değinmek gerekirse; 2017 yılında yapılmış olan bir çalışmada Orta Karadeniz Bölgesinde MS prevalansı 43.2/100,000 saptanırken (28) 2012 yılında yapılan bir diğer çalışmada ülkenizin kuzey doğusunda MS prevelansı 68.97/100,000, kadın erkek oranı 4/1, hastaların yaş ortalaması 35,1±10,2 olarak hesaplanmıştır (29).

#### **3.1.5 Klinik alt tipleri**

1996 yılında Lublin ve arkadaşları tarafından yapılan dört başlık altında tanımlanan klinik seyir 2013 yılında Klinik İzole Sendrom (KİS), Relapsing (ataklı) Remitting MS (RRMS) ve progresif (ilerleyici) MS olarak üç başlık altında tanımlanmıştır (30). Güncel sınıflamada Progresif-relapsing terimi artık kullanılmayıp bu hastalar progresif aktif hastalar grubu içine

alınırken KİS terminolojisi kullanılmış ve MS fenotipleri arasına sokulmuştur. Radyolojik izole sendromlu hastalar ise klinik belirti ve bulgulara sahip olmadığından bir MS fenotipi olarak belirlenmemiştir.

#### **3.1.5.1 Radyolojik İzole Sendrom (RİS)**

"Radyolojik izole sendrom" (RİS) terimi tipik MS semptomları bulunmayan ve nörolojik muayenesi normal olan ancak tesadüfen beyin manyetik rezonans görüntülemesinde MS'teki lezyonlara benzer beyaz cevher lezyonlarının saptandığı tablodur ve ilk olarak 2009 yılında ortaya atılmıştır (31).

RİS prevalansı %0,15 olmakla birlikte prevalans ve insidansı ile ilgili çalışmalar azdır (32). Bu sonuçlar RİS'in tesadüfen saptanan MR bulgularına dayandığı için farklı semptomlarla başvuru durumlarında radyolojik görüntüleme olarak MR istenilme sıklığı ile ilişkili olarak değişebilmektedir.

Radyolojik izole sendrom tanısından MS tanısına dönüşüm ise bu alanda en çok incelen konu olmuştur. Bir çok kohort araştırması, ilk RİS tespitinden sonraki 5 yıl içerisinde RİS hastalarının %30'unda semptomatik demiyelinizan bir olay gelişeceğini ve neredeyse üçte ikisinin radyolojik olarak MR görüntülerinde yeni lezyonlarla ilerleyeceği gösterilmiştir (33,34). 2014 yılında yayınlanan RİS epidemiyolojisini inceleyen çok uluslu bir kohort çalışmasında, erkek cinsiyet, genç yaş ve spinal kord lezyonlarının varlığının gelecekte klinik MS'in gelişiminde rol oynayan en önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (34). Spesifik olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesi RİS'ten MS'e dönüşümü öngörmekte tek başına bir yararı olmayıp klinik ve radyolojik bulgular ile kombine değerlendirmede katkısı söz konusudur (35).

#### **3.1.5.2 Klinik izole sendrom (KİS)**

İzole optik nöropati, medulla spinalis tutulumu, beyin sapı ve serebellum tutulumu ve nadien hemisferik tutulum şeklinde klinik sunum olarak ortaya çıkan, MR'da MS'i düşündürten semptomatik ya da asemptomatik lezyonların gözlendiği, diğer alternatif tanıların yokluğunda; merkezi sinir sisteminin enflamatuvar-demiyelinizan etkilenimli, ilk nörolojik tablosudur (36). İzole optik nevrit (ON), izole parsiyel medulla spinalis ya da beyin sapı tutulumu şeklinde ortaya çıkabildiği gibi supratentoriyel başlangıçlı

da olabilir. Cinsiyet dağılımı MS'e benzer şekilde kadın erkek oranı 2,5/1 şeklindedir (37). Sıklıkla genç erişkin dönemde (20-45 yaş arası), ataklar akut veya subakut dönemde tipik olarak başlangıçtan 2-3 hafta içinde semptomların zirve yapar şeklindedir. Bu tanıyı alan hastanın takiplerinde MS gelişirse bu durum "ilk klinik olay" adını alır. MS, %85 oranında KİS şeklinde başlar (38).

MS'e dönüşüm riskini belirlemek, MS'te erken tedavinin yararları göz önünde bulundurulduğunda, çok önemlidir (39). KİS'ten MS'e dönüşüm için MR, BOS, klinik tablo, genetik, çevresel ve immunolojik olmak üzere birçok risk faktörü belirtilmiş olmasına rağmen pratikte MR ve BOS incelemesi değerlendirilmektedir (40). Bu dönüşüm riskini değerlendirme de MR'da lezyonların Barkhof kriterlerinin sayısı, lezyon sayısı anlamlı bulunmuştur (41). İnfratentorial bölgede; özellikle beyin sapında lezyon gözlemlenmesinin MS'e dönüşüm açısından daha riskli olduğu vurgulanmıştır (42). Oligoklonal bant dışında intratekal B hücre yanıtı gösteren kızamık, kızamıkçık ve varisella zoster gibi nörotropik virüslere karşı oluşan IgG ankorları (43) ve MS'te B hücresi anahtar düzenleyicilerinden biri olan CXCL13'ün artmış BOS konsantrasyonlarının (44) dönüşümde anlamlı olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir. Son yıllardaki bu faktörlere ilave olarak genetik ve immünolojik faktörler, güneşe maruz kalma, D vitamini düzeyi, erken çocukluk veya ergenlik çağında geçirilmiş enfeksiyonlar ve sigara gibi diğer çevresel faktörlerin KİS hastalarının MS'e dönüşüm riski ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (45). Buna rağmen KİS'te prognozu belirlemede kullanılabilecek netlik kazanmış genetik veya çevresel belirteç yoktur.

### **3.1.5.3 Ataklarla seyreden MS (RRMS)**

Klinikte ataklar ve iyileşmelerle seyreden ve belirgin bir ilerleme göstermeyen bu tipi tüm MS olgularının 2/3'ünü kapsamaktadır. Sıklıkla görülen ataklar motor, duysal, serebellar, spinal ve görme ile ilgili semptomlarla karakterizedir. MS'in en belirgin klinik seyri, klinik işlev bozukluğunun akut veya subakut başlangıcı olarak tanımlanan, genellikle günlerden birkaç haftaya kadar zirveye ulaşan relapsların ortaya çıkması ve bunu takip eden semptomların ve bulguların kısmen veya tamamen düzeldiği

bir remisyondur. Relaps süreleri en az 24 saat olarak belirlenmiş. Bu sürenin altında gelişen yeni semptomlar nüks olarak algılanmaz. Daha önceki klinik işlev bozukluğunun kötüleşmesi, ateş, enfeksiyon, fiziksel aktivite veya metabolik rahatsızlık ile aynı anda ortaya çıkabilir ve bu tablo saatler hatta günler sürebilir.

#### **3.1.5.4 Progresif seyreden MS (PMS)**

Hastalık seyri sırasında özürülüğün eklendiği seyirdir. Atak ve iyileşmeler ile giden ortalama 5-6 yıllık erken dönem sonrası atak sayısının azaldığı, düzelmenin az olduğu, özürülüğün giderek arttığı ikincil ilerleyici dönem gözlenebilir, başlangıçtan itibaren ataklar yaşansa da sürekli bir ilerleme gözlenebilir, iyileşme kaydedilmeden, başlangıçtan itibaren hastalığın kötüleşmesi gözlenebilir.

#### **3.1.6 Tedavi**

Hastalığı ortadan kaldıran bir tedavi yöntemi henüz gösterilememiştir. Atak sırasında verilen intravenöz metil prednizolon tedavisi ile defisitleri düzeltebilmek, böylece doğrudan atağa bağlı kalıcı engelliliği önlemek ya da belirtilerin hafifletilmesini sağlamak hedeflenmektedir. Ayrıca hastalığı kontrol altına almaya, atak sıklığını azaltmaya, progresyonun yol açtığı engelliliği ve sürekli kötüleşmeyi önlemeye yönelik immunomodülatuar tedaviler mevcuttur. Hastalığın modülasyonunu sağlayan bu tedavilerde, hastalığın aktivitesi ve prognostik faktörler dikkate alınarak basamaklı bir tedavi yaklaşımı benimsenmiştir. İlk olarak 1993 yılında beta interferon ve birkaç sene sonra glatiramer asetat olarak belirlenen birinci basamak tedavilere yakın zamanda dimetil fumarat ve teriflunamid gibi oral tedaviler de eklenmiştir. İkinci basamak tedavide kullanılan ilaçlar, fingolimod ve natalizumab olarak belirlenmiştir. Ayrıca mitoksantron da kötü gidişli RRMS ve SPMS tedavisinde FDA (American Food and Drug Administration) onayı almış bir diğer tedavidir (46).

### **3.2 Mikrobiyota**

İnsan bağırsağı bakteri, mantar, parazit ve virüs gibi çeşitli mikroorganizmalar için en geniş rezervuar alanıdır. İnsan gastrointestinal sisteminde 100 milyondan fazla bakteri bulunur. Bu organizmadaki toplam

ökaryotik hücrelerin sayısının 10-100 katı kadardır. İnsan vücudu ile ortak gelişim sürecinde bağırsak bakterileri insan vücudu ile karşılıklı yarar sağlayan simbiyotik bir hale gelmiştir. Tek hücreli ökaryotlar, virüsler, arkealar ve bu güne kadar izole edilebilen 400 kadar bakteri mikrobiyota olarak adlandırılan memeli barsak mikroflorası topluluğunu oluşturur (47). İnsanlarda sindirim sistemi mikrobiyotası doğumdan hemen sonra şekillenmeye başlamaktadır. Doğum esnasında yenidoğan, vajinal kanaldaki birçok mikroorganizma ile karşılaşarak sindirim sistemi mikrobiyotasını oluşturur (48).

İnfanlarda gastrointestinal sistem mikrobiyotasını beslenme şekli, gestasyonel yaş, hospitalizasyon ve sık antibiyotik kullanımı etkiler. Erişkin dönemde intestinal mikrobiyota kompleks ve dinamik bir ekosistem olarak son şeklini almış olur (49). Erişkin dönemde de antibiyotik kullanımı, enfeksiyonlar, gebelik ve yaşam biçimlerinin uzun süreli değişimi gibi çevresel değişiklikler, bağırsak mikrobiotasının kompozisyonunu ve çeşitliliğini değiştirebilir (50).

İntestinal mikrobiyotanın, immün sistem dışında birçok metabolik olaylarda, sistemik ve mukozal immün sistem fonksiyonlarında önemli işlevleri olan bir "organ" gibi davrandığı anlaşılmıştır. Artık mikrobiyotanın obezite, diyabetes mellitus, ateroskleroz ve non-alkolik hepatosteatoz patogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Mikrobiyotanın, peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritlere reaktif sekretuar Ig A ve intestinal alkalen fosfataz üretimi sağladığı, polisakkarit A ve Nükleer Faktör Kapa B (NF-kB) inaktivasyonu ile hücrel immünite, lenfoid organogenez ve mukozal bariyer oluşumu ile immünitenin gelişmesini sağladığı, ayrıca dendritik hücrelerin toleransını artırarak immün toleransın oluşumunda rolü olduğu saptanmıştır. İntestinal mikrobiyotanın mukozal ve sistemik immünite üzerine olan bu etkileri; gastrointestinal sistemin, allerjik ve otoimmün hastalıkların patogenezinde kritik öneme sahip olduklarını göstermektedir (51).

Mikrobiota ile doğal bağışıklık arasındaki ilişki iyi dökümente edilmiştir. Simbiyotik bağırsak bakterilerinin spesifik lenfosit alt kümelerinin gelişimi ve işlevi için çok önemli olduğu bilinmektedir(52,53).

Sinir, endokrin ve bağışıklık sistemlerinin iletişimleri aracılığı ile iki yönlü olarak bağırsak-beyin aksı oluşur ve bu organların birinde gerçekleşen değişiklikler diğerini etkilemektedir. Bağırsak mikroorganizmalarının bileşimi ve miktarındaki bozukluklar hem enterik sinir sistemini hem de merkezi sinir sistemini etkileyebilir ve dolayısıyla bu da bir mikrobiyota-bağırsak-beyin aksının varlığına işaret eder. Mikrobiyotik bağırsak-beyin aksı, bağırsak mikroeolojisi üzerine yapılan son araştırmaların odak noktasıdır. Beyin ve barsak, enterik sinir sistemi , vagus siniri, bağışıklık sistemi veya bağırsak mikroorganizmalarının metabolik süreçleri dahil çeşitli yollarla yoluyla bağlanabilir. Bağırsak ve beyin arasındaki bu karmaşık etkileşim Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, şizofreni ve multipl skleroz gibi çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarının gelişim ve progresyonu ile yakından ilişkilidir (54).

Kronik, inflamatuvar, demiyelinizan ve nörodejeneratif patogeneze sahip olan Multiple skleroz hastalığı ile mikrobiota arasındaki ilişkiyi göstermeye çalışan çalışmalar ilk olarak hayvanlarda bir MS modeli olarak geliştirilen deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modellerinde gösterilmiştir. Deney hayvanında ensefalomyelit gelişmeden önceki dönemde antibiyoterapi ile barsak mikroorganizmaları önemli ölçüde azaltıldığında hastalığın gelişme ihtimalinin ve şiddetinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (7).

MS ve diyet arasındaki ilişki bir çok çalışmada incelenmiştir. Hastalığın batıdaki ülkelerde ve ekvatorun 40 derece ve üzeri uzak bölgelerde yüksek prevalans göstermesinin bu bölgelerde tipik olarak yüksek kalorili diyet alıkanlığı olması ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (55,56). Mikrobiota birçok metabolik yolu (karbonhidrat, lipid ve aminoasit metabolizması) düzenmekte, konak immün sisteminin gelişim ve toleransına müdahale eder. Mikrobiota bileşiminin değişimi (disbiyozis) beslenme alışkanlıkları; özellikle yüksek yağ / yüksek şekerli batı diyetine bağlı olabilir (57).



**Şekil-2:** Diyet ile lokal/sistemik inflamasyon ve otoimmünite ilişkisi(58).

Tüm bu diyetel değişikliklerde değişen immün cevabın yönlendirilmesinde miRNA'ların rolü yüksek orandadır. Genetik ve epigenetik değişiklikler, kanser vb. hastalıklarda saptanan anormal miRNA ifadesini açıklayabilir. Belli beslenme / çevresel faktörler, bu değişikliklerden sorumlu olabilir, zira bunlar çeşitli süreçlerde (apoptoz, hücre döngüsü düzenlemesi, anjiyogenez ve iltihaplanma) miRNA ekspresyonunu ve mRNA hedeflerini düzenlediği gösterilmiştir. Diyet alışkanlıkları ile dışkı ve kanda miRNA değişikliklerini inceleyen bir çalışmada yedi miRNA incelenmiş (miR-16, miR-21, miR-34, miR-92a, miR-106a, miR-146 and miR-222) miR-146 ekspresyon değişimi hiçbir grupta saptanmazken, dışkı örneklerinde hem vejeteryenlerde hemde veganlarda artmış miR-92a düzeyleri anlamlı saptanmıştır (59).

### 3.3 MikroRNA

İyi tanımlanmış iki tane küçük RNA tipi bulunmaktadır; mikroRNA (miRNA)'lar ve short interfering RNA (siRNA)'lar. miRNA ve siRNA'lar biyokimyasal ve fonksiyonel olarak ayırt edilememelerinden dolayı orijinlerine göre ayrılırlar. miRNA'lar dsRNA'ların hairpin (saç tokası) şekilli prekürsörlerinden elde edilirken, siRNA'lar uzun dsRNA'lardan oluşur. İlk keşfedilen küçük RNA; miRNA'dır (60). İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Bu

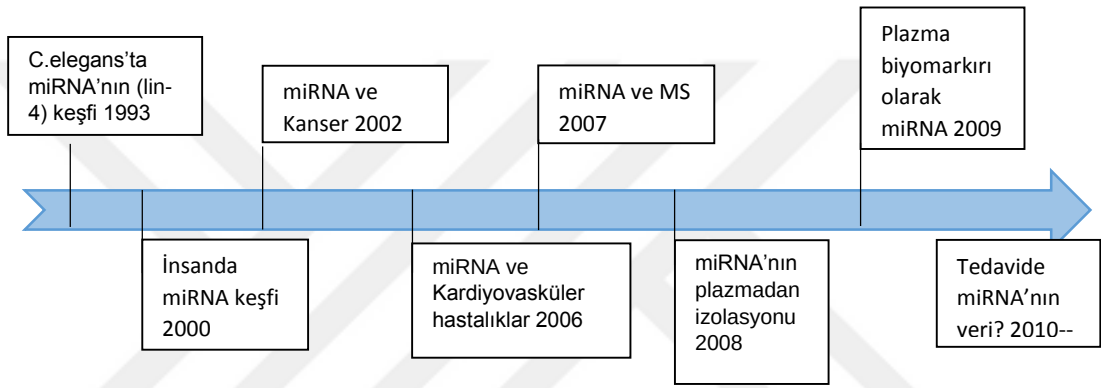
güne kadar, 24 yıl içinde toplam 15,000'in üzerinde, insanlarda ise yaklaşık 2500 miRNA tanımlanmış ve sayı artarak devam etmektedir (61).

Mikro RNA (miRNA); genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu gerçekleştiren, genomun posttranskripsiyonel basamakta ekspresyonunu etkileyen, kodlama fonksiyonu olmayan yani protein translasyonu yapmayan, ortalama 22 nükleotid büyüklüğünde, esas olarak tek iplikli gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan fonksiyonel bir RNA türüdür (62). İnsan genlerinin %30'undan fazlasını düzenleme yeteneğine sahiptirler. Nomenklatür olarak 3 kısımdan oluşur. İlk kısım üç harften oluşur ve hangi türde bulunduğunu gösterir (hsa-H.sapiens, cel-C. elegans, mmu-M. Musculus). İkinci kısım ise olgun miRNA'yı tanımlayan '-miR-' ifadesidir. Üçüncü ve son kısım ise bulunuş sırasını belirten rakamdır (örn; miR-155). Farklı DNA bölgesine yerleşmiş, gen ikilenmesi sonucu oluşan benzer dizilerden kodlanan miRNA'lar, bir-iki nükleotid dışında neredeyse aynı diziye sahiptirler ve son rakamdan sonra harf koyarak adlandırılırlar (örn; miR-146a, miR-146b). Bu çalışmamız insan miRNA'ları üzerine olduğu için tüm hsa-miRNA ifadeleri miRNA olarak kısaltılmıştır.

miRNA'ların önemli bir özelliği de doku özgüllüğüdür. miRNA'lar dokuya özgü bir şekilde ifade edilir ve bu nedenle çeşitli dokuların miRNA ifade şekilleri farklıdır. Bu özellik, çeşitli hastalıklarda biyolojik belirteç olarak miRNA'ların kullanımında büyük önem taşır. Ayrıca, aynı miRNA çeşitli dokularda farklı hedeflere sahip olabileceğinden, miRNA'nın etkisi de dokuya özgüdür. miRNA'lar gen ekspresyonu düzenlemesini sıklıkla negatif yönde baskılayarak yapar. Yapılan çoğu çalışmada bu küçük moleküllerin hematopoezde farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi çok önemli hücrel olaylarda kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir. Malign hastalıklardaki rolü giderek daha çok aydınlatılmış olmakla birlikte otoimmünite ve inflamasyonda düzenleyici rollerinin saptanması birçok hastalığın etyopatogeneziindeki araştırmaların odağı haline gelmiştir.

İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis*

elegans'ta Lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle rapor edildi. Ancak bulunan bu genetik materyal için, mikroRNA terimi ilk defa 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (63). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları tarafından yine C.elegans'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfedildi. Daha sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilip miRNA olarak isimlendirilmiştir (64).

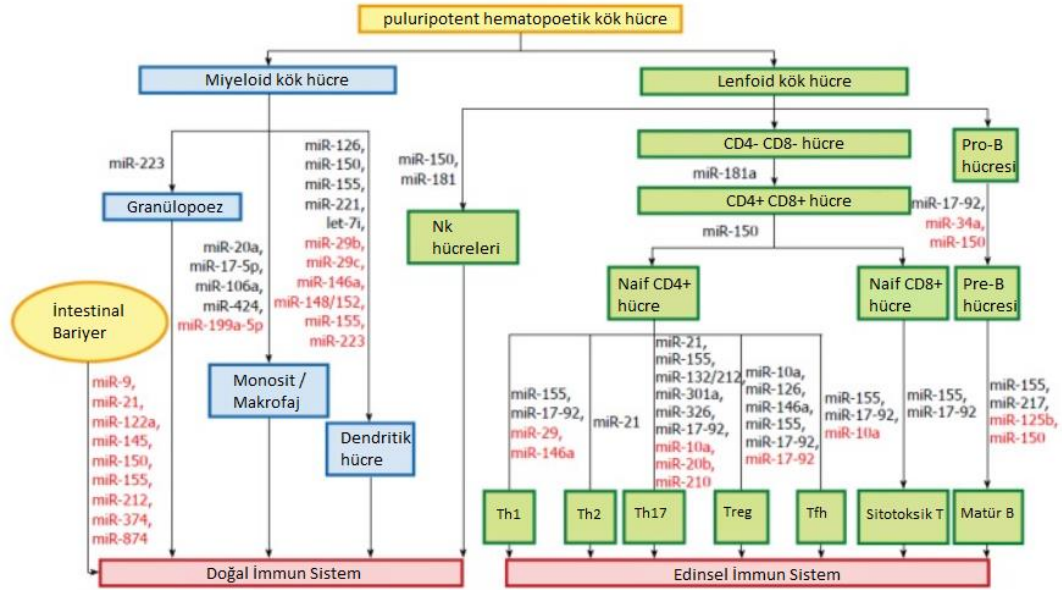


**Şekil-3:** MikroRNA'ların kronolojisi

miRNA'nın hücresel mRNA sentezinin %30'unda rolü olduğu (65), protein kodlayan genlerin yaklaşık %90'ını düzenlediği ve immün sistemin farklılaşması, çoğalması, hücre apoptozisi ve homeostazın korunması da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde merkezi bir rol oynadığı belirtilmektedir. Bu nedenle miRNA'ların ekspresyonundaki değişikliklerin potansiyel olarak bazı patolojik tabloların ve klinik bozuklukların gelişimine katkıda bulunduğu şaşırtıcı değildir. Günümüzde, miRNA'ların patogenetik rolü, malign hastalıklarda olduğu kadar otoimmün tablolarda da yoğun olarak incelenmektedir. miRNA ekspresyon profilindeki değişiklikler, Sistemik Lupus Eritematosus (SLE), Romatoid Artrit (RA) ve Sjögren Sendromu (SS) gibi farklı otoimmün hastalıklarda saptanmıştır (66,67).

### 3.3.1.1 İmmün sistem ve miRNA

miRNA'lar yalnızca immün sistemin gelişiminde değil, aynı zamanda doğuştan gelen ve adaptif immünitenin düzenlenmesinde de kritik rol oynamaktadır (68). miRNA'lar, miR-181, miR-223 ve miR-142'nin hematopoetik hücrelerde güçlü şekilde eksprese edilmesi ve hematopoetik köken farklılaşması sırasında düzenleyici rolü vardır (69).



Şekil-4: miRNA'ların immün sistem gelişiminde rolleri(70).

### 3.3.1.2 Doğal İmmün sistem ve miRNA

Doğal immunitede rol alan hücreler; makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler (natural killer –Nk- hücreleri), kompleman faktörleri, Toll like reseptörler ve diğerleridir. Santral sinir sisteminin lokal immün hücreleri ise mikroglialardır (71). Doğal bağışıklık sistemi konakçı savunmasının ilk bariyeridir ve işgalci mikroorganizmalara karşı mekanizmalarda önemlidir; Dahası, adaptif bağışıklığın gelişiminin temelini oluşturmaktadır. Konak hücreler, toll benzeri reseptörler (TLR'ler), C-tipi lektin-benzeri reseptörler (CLR'ler), retinoik asitle indüklenebilir gen (RIG)–I benzeri reseptörler (RLR'ler) oligomerizasyon bölgesi (NOD) benzeri reseptörler (NLR'ler) ve nükleotit bağlayıcılar da dahil olmak üzere çeşitli kalıp tanıma reseptörlerini (PRR'ler) eksprese ederler. Bunlar patojenle ilişkili

moleküler kalıpları (PAMP'lar) geniş bir yelpazede tanıyabilir. Bu mekanizmalar, proenflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve interferonların (IFN) serbest bırakılmasına ve aynı zamanda uyarıcı moleküllerin ekspresyonuna neden olan hücre içi sinyal yollarını tetiklemektedir (72).

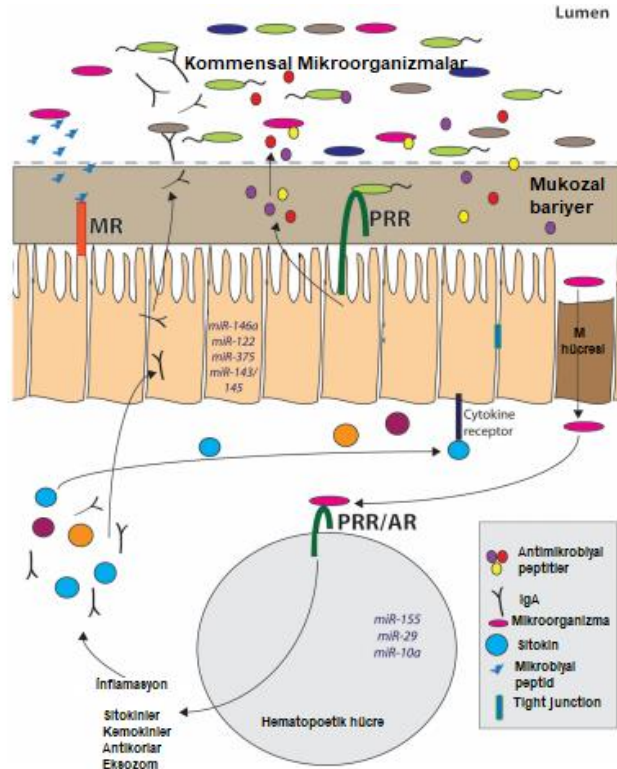
TLR'ler, çoğu immün hücrede yüksek oranda ifade edilebilen farklı hücre tiplerini potansiyel olarak aktive edebilen en tipik kalıp tanıma reseptörleridir (73). TLR'lerin anormal şekilde harekete geçirilmesi sınırsız inflamatuvar yanıtlara neden olabilir. Bu nedenle, TLR ailesi otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (74). TLR4, gram negatif bakteriler için tipik endotoksin olan lipopolisakaritleri (LPS) tanıyabilir. LPS kaynaklı inflamatuvar cevaplar miR-146 a / b, miR-132 ve miR-155 aşırı ekspresyonunu indükler. miR-146'nın up-regülasyonu, hedef genleri olan interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz (IRAK) 1 ve tümör nekroz faktörleri reseptör ilişkili faktörü (TRAF) 6'nın translasyonel baskılamasına yol açar (75).

LPS'ye mağruziyet, tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sekresyonunu uyarır. miR-155 up-regülasyonu ve miR-125b down-regülasyonu ile TNF- $\alpha$  translasyonu ve konağın vereceği yanıt düzenlenir (76). MiR-146a ve miR-155, TLR-7 ve TLR-9 aracılığıyla dendritik hücrelerde IFN-tip I sentezini etkilerken, miR-21, miR-126, miR-146a , MiR-155 in T ve B hücrelerinde anormal sitokin salınımını, hücre alt gruplarının farklılaşmasını, B hücre hiperaktivitesini ve otoantikor üretimine yol açan epigenetik modifikasyonları düzenlediği belirtilmiştir.

### **3.3.1.3 Edinsel İmmun sistem ve miRNA**

Edinsel immün sistemde hem T hem de B lenfositlerini önemli hücresel bileşenlerdir. T hücreleri spesifik antijen reseptörlerine sahiptir ve antijen temasından sonra klonal olarak hızla çoğalırken B hücreleride immunglobülin salgılayan plazma hücrelerine dönüşür (71). RNase III enzim ailesinden olan miRNA biyogeneğinde rol alan Dicerin tükenmesi, T hücresi gelişiminin erken safhasında, hem timusta hem de periferik lenfoid organlarda T hücresi sayısının azalmasına neden olur (77). Dicer eksikliği bulunan T yardımcı (Th) hücreleri, artmış IFN- $\gamma$  ekspresyonu ve antikorların blokajı gibi anormal sitokin sekresyonu gösterirler (78). Erken progenitör B

hücrelerinde Dicerin tükenmesi miR-17 aracılığı ile pre-B öncesi hücredeki geçişin bloke edilmesine neden olur (79).



**Şekil-5:** Mikrobiota ve hematopoetik sistem arasındaki etkileşimler ve miRNA'ların rolü (80).

Multiple sklerozun gelişiminde de önemli role sahip Th17 hücreleri tarafından üretilen interlökin IL-17, miR-326 ve miR-155 ile yakından ilişkilidir. MiR-326'nın aşırı ekspresyonu multipl skleroz hastalarında Ets-1'i hedefleyerek Th17 hücre proliferasyona yol açar (81). Öte yandan MiR-155, Th17 hücresi oluşumunu indükleyen sitokinlerin dendritik hücre üretimi için esastır. MiR-155, insan monosit türevi dendritik hücrelerde LPS ile uyarılan enflamatuvar süreçlere yanıt olarak down-regüle edilir (82). MiR-155 ekspresyonu, sitokin sinyallemeye supresörü 1 (SOCS)'i hedefleyerek IL-2 sinyal yolağının kontrolünde Foxp3 ile regüle edilen düzenleyici T (Treg) hücre proliferatif etkinliğinin sürdürülmesi için gereklidir (83). MiR-155 gibi, miR-146a'da sadece doğal bağışıklık sistemi ile ilgili olmayıp, aynı zamanda adaptif bağışıklık sisteminde de kritik role sahiptir.

miRNA'lar ile otoimmün hastalıklar arasında ilişki olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bunlara örnek verilecek olursa;

Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)'nin patogeneğinde IFN yolağında miR-146a(84) miR-126 ve hastalığın şiddeti ile miR-155 ekspresyon düzeyinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (85).

Sjögren sendromunda (SjS), Ro/SS-A ve La/SS-B mRNA'larını hedefleyen let-7b, miR-16, miR-181a, miR-200b-3p, miR-200b-5p, miR-223, miR483-5p ve miR-768-3p'nin disregüle olduğu gösterilmiştir (86).

Romatoid Artrit (RA)'te, Th17 hücrelerinin transkripsiyon faktörlerini düzenleyen miR-146a, miR-155 ve miR-16'nın disregüle olduğu, antiromatizmal ilaç tedavisi sonrası erken evrede serumda disregülasyonların düzelme eğiliminde oldukları saptanmıştır (87).

Sistemik sklerozda (SS), miyofibroblast proliferasyonunun ve apoptoz direncinin indüksiyonunda miR-15b, miR-16, miR-27a, miR-27b, miR-132, miR-150 ve miR-335 önemli bir rol oynarken ; miR-21, miR-92a, miR-133, miR-142-3p, miR-200a / b ve miR-590'ın fibrozisi baskıladığı gösterilmiştir (88).

**Tablo-1: Otoimmün hastalıklarda miRNA disregülasyonu (89).**

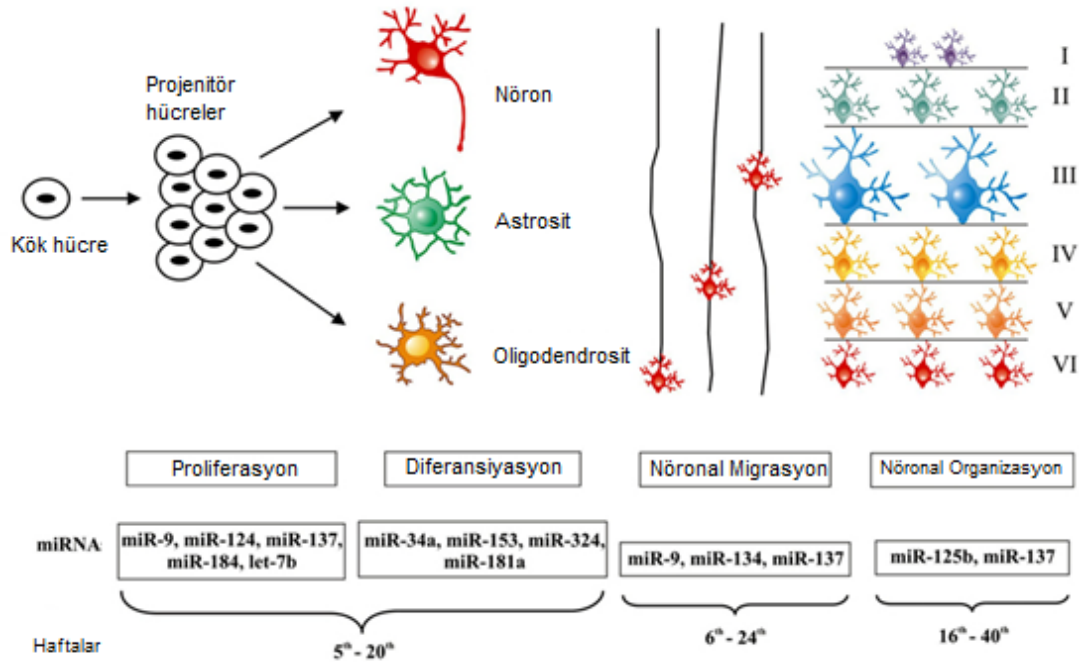
|                 |                                     | <b>DİSREGÜLASYON</b>                                                                   |                                                             |                                                                        |                                                                |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Hastalık</b> | <b>Örnekleme</b>                    | <b>Up-Regülasyon</b>                                                                   |                                                             | <b>Down-Regülasyon</b>                                                 |                                                                |
| <b>SLE</b>      | Periferik kan mononükleer hücreleri | miR-21<br>miR-78<br>miR-189<br>miR-298<br>miR-342<br>miR-410<br>miR-516a-3p<br>miR-629 | miR-61<br>miR-142-3p<br>miR-198<br>miR-299-3p<br>miR-525-5p | miR-17-5p<br>miR-126<br><b>miR-146a</b><br>miR-184<br>miR-383          | miR-112<br>miR-141<br><b>miR-155</b><br>miR-196a<br>miR-409-3p |
|                 | T hücresi                           |                                                                                        |                                                             | miR-26a                                                                |                                                                |
|                 | serum                               | miR-130b-3p<br>miR-148-3p                                                              |                                                             |                                                                        |                                                                |
|                 | Üriner ekzosom                      | <b>miR-146a</b>                                                                        |                                                             |                                                                        |                                                                |
| <b>SjS</b>      | Küçük tükrük bezleri                | hsa-miR-768-3p<br>miR-16                                                               |                                                             | hsa-miR-574                                                            |                                                                |
|                 | Tükrük bezi epitel hü.              | miR-200b-3p                                                                            |                                                             |                                                                        |                                                                |
|                 | Periferik kan mononükleer hücre     | miR-146a/b<br><b>miR-155</b><br>miR-181a miR-223<br>miR-483-5p                         |                                                             | <b>miR-155</b><br>miR200b-5p                                           |                                                                |
|                 | Monositler                          | miR-34b-3p miR-300<br>miR-609 miR-877-3p<br>miR-3162-3p miR-4701-5p                    |                                                             |                                                                        |                                                                |
| <b>RA</b>       | Periferik kan mononükleer hücre     | <b>miR-146a</b> <b>miR-155</b><br>miR-301a-3p                                          |                                                             |                                                                        |                                                                |
|                 | Serum                               | miR-223                                                                                |                                                             | miR-16 <b>miR-146</b><br><b>miR-155</b>                                |                                                                |
|                 | Sinovyal doku                       | miR-16 miR-132<br><b>miR-146a</b> miR-223<br><b>miR-155</b>                            |                                                             | miR-188-5p                                                             |                                                                |
|                 | CD4+ T hücreleri                    | <b>miR-146a</b>                                                                        |                                                             | miR-363<br>miR-498                                                     |                                                                |
|                 | Makrofajlar                         | miR-223                                                                                |                                                             | miR-99a miR-100<br>miR-125 miR-152<br>miR-199-3p miR-199-5p<br>miR-214 |                                                                |
| <b>SS</b>       | Serum                               | miR-21 miR-92a<br>miR-133 miR-142-3p<br>miR-200a/b miR-590                             |                                                             | miR-15b miR-16<br>miR-27a/b miR-132<br>miR-150 miR-335                 |                                                                |
|                 | Fibroblast                          |                                                                                        |                                                             | miR-29a<br>miR-135b<br>miR-193b                                        |                                                                |
| <b>MS</b>       | Periferik kan mononükleer hücre     | miR-21<br>miR-27a<br><b>miR-146a/b</b><br><b>miR-155</b><br>miR-326                    |                                                             | miR-214<br>miR-140-5p<br>miR-572                                       |                                                                |
|                 | BOS                                 | miR-150                                                                                |                                                             |                                                                        |                                                                |

SLE:Sistemik Lupus Eritamatozus, AFAS:Antifosfolipit antikor sendromu, SjS:Sjögren Sendromu, RA:Romatoid artrit, SS:Sistemik Skleroz, MS:Multiple Skleroz

#### 3.3.1.4 Sinir sistemi hastalıkları ve miRNA

miRNA'lar beyin gelişiminde ve fizyolojik işlevlerde önemli role sahiptir. Tüm organizmadaki miRNA'ların en az %70'inin beyinde ekspresyonunun saptanmış olması organizma ve beyin arasındaki karmaşık ilişkiyi göstermektedir. Ayrıca bazı miRNA'lar da santral sinir sistemine özgüdür. Örneğin; miR-9, -101, -124, -125, -127, -128, -132, -219 ve let-7 ailesinin üyesi miRNA'lar beyin dokusuna özgü veya beyinde diğer dokulardan çok daha yüksek oranda ekspresyonları saptanmıştır. Bu alanda yapılan bir çalışmada miR-10a'nın özellikle fare medulla oblongata ve spinal korda daha fazla eksprese olduğu belirtilmiştir (90). Ayrıca santral sinir sistemi hücre tipleri arasında (miR-124 ve miR-128'in nörona , miR-23'ün astrosite ve miR-9'un ise oligodendrosite özgü olduğu), hücrelerin fonksiyonel görevleri arasında (dopaminerjik nöronlarda miR-133b) ve hatta hücrenin soma ve dentritik bölgeleri arasında (83 miRNA her iki bölgede, 16 miRNA somada ve 5 miRNA dendritte) bile miRNA'lar arasında ekspresyon farklılıkları olduğu belirtilmiştir (91-94). Lokasyon ve hücre tipine özgü ekspresyon oranları miRNA'ların özel beyin işlevleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu alanda yapılan şempanze beyni ile insan beyinde eksprese edilen miRNA'ların karşılaştırıldığı bir çalışmada kesişim kümesi sadece %8 saptanmış ve bu farkın insandaki bilişsel fonksiyonlar ve yüksek kortikal işlevlerde beynine özgü miRNA'ların rol aldığını öngörmüştür (95).

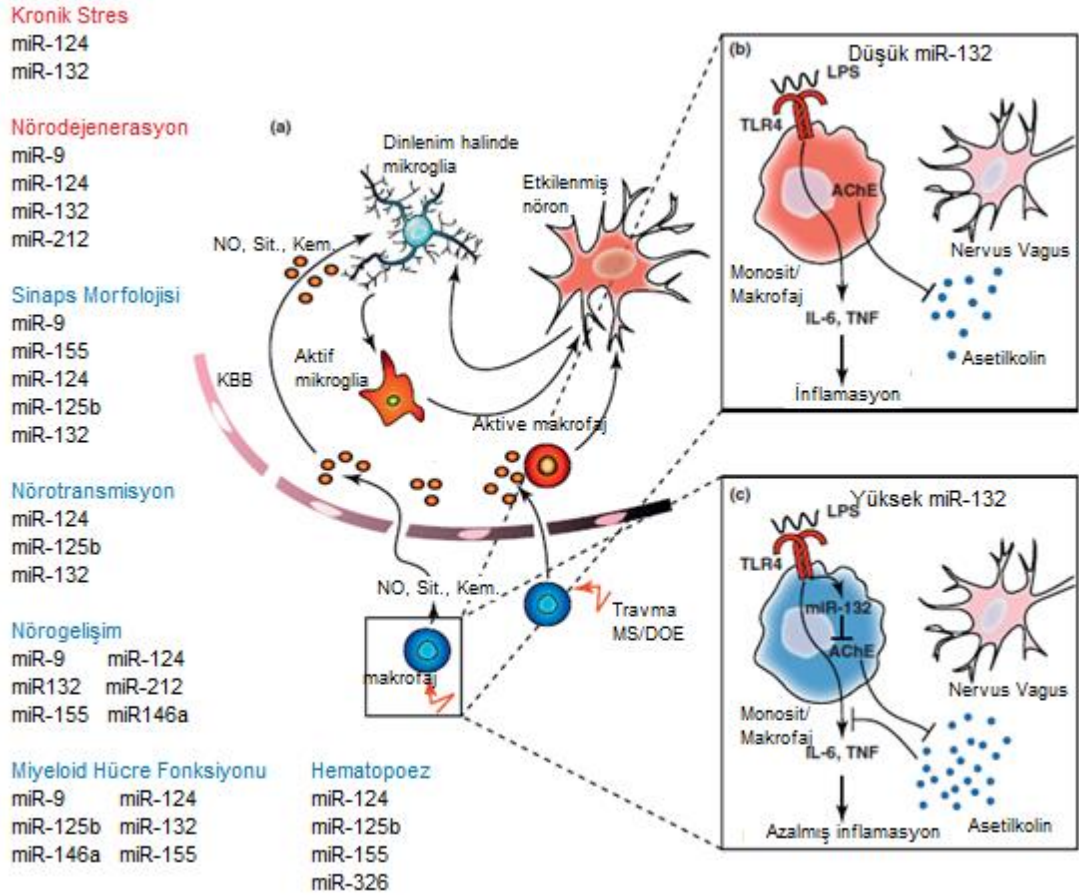
miRNA'ların nöronal gelişiminde farklı aşamalarda düzenleyici rol aldıkları düşünülmektedir. Hematopoetik sistem üzerinde olduğu gibi santral sinir sistemi gelişimi üzerinde de 3 ayrı dönem ve 4 ayrı gelişim basamağında rol alırlar. İntrauterin dönemde organizmanın gelişiminin 5-20. haftalarında progenitör hücrelerin poliferasyonu ve farklılaşması üzerine miR-9, -124, -137, -184 ve let-7b, 6-24. haftalarda migrasyon üzerine miR-9, -134, -137, 16-40. haftalarda nöronal organizasyonda ise mir-125b ve mir-137'nin düzenleyici rolleri saptanmıştır.



**Şekil-6:** mikroRNA'lar ve santral sinir sistemi gelişimi (96).

Epilepsi ile ilgili yapılan çalışmalarda mezial temporal skleroz, hücre migrasyon defektleri, nöronal aktivasyon ve sinaptik plastisite, astrosit ilişkili inflamatuvar süreç gibi miRNA'ların farklı epileptogenetik aşamalarda görev alabilecekleri belirtilmiştir.

Santral sinir sisteminin doğal immun sistem üyeleri tarafından başlatılan ve SSS'de bulunan veya SSS'yi infiltre eden lökositler tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, kompleman faktörleri, reaktif oksijen türevleri ve diğer ajanlardaki artışları içeren, edinsel immunité tarafından yönlendirilen ve diğer taraftan travma ve yaşlanma ile periferik immün değişikliklerin tetiklenerek merkezi sinir sistemine etkidiği, nöroinflamasyonun ön planda olduğu Alzheimer, Multiple Skleroz, Parkinson ve ALS gibi hastalıkların etyolojilerinde bu perifer – merkezi sinir sistemi etkileşiminde miR-132'nin kolinerjik anti-inflamatuvar yolu düzenlediği belirtilmektedir(97).



**Şekil-7:** Periferik otoimmün sistem ve santral sinir sistemi arasındaki inflamatuvar etkileşim basamakları (98).

Beyin, nörotransmitterleri, nöropeptitleri ve hormonları kullanarak immün sistemin işlevlerini ve proinflamatuvar sitokinler gibi inflamasyonu düzenleyici maddeleri modüle ederek periferde inflamasyonu algılar ve pozitif/negatif etki ile inflamatuvar süreci güçlendirebilir veya ona karşı koyabilir(99). Merkezi sinir sistemi ile periferik sistem arasındaki iletişimde arabuluculuk görevinde esas rol, monosit / makrofaj ailesinden miyeloid hücre kökenli mikrogliya hücreleridir (100). SSS ve periferik sistem arasındaki bu etkileşimli bölmelerin nöronal gelişim, plastisite ve fizyolojik reaksiyonlar da dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlarda ortak miRNA'ları paylaştıkları düşünülmektedir (101).

Bu miR'lerin santral ve periferik sinir sistemi ve diğer sistemlerdeki birliktelikleri, hem merkezi sinir sisteminde inflamasyonda hem de periferik

sistemdeki inflamasyonun santral düzenlenmesinde fonksiyona sahip olduklarını , bu nedenle iki yol tarafından paylaşılan bir miRNA'nın ifadesinin değişmesi, bu sistemlerin birinde veya her ikisinde gen ekspresyonunu değiştirebildiği düşünülmektedir. miRNA'ların düzenleyici rolleri nedeniyle bu tür değişiklikler çoğunlukla beyin veya periferel lökositlerdeki inflamasyona reaktif transkriptleri değiştirmekte (102), periferde kompleman faktörleri, adezyon molekülleri, reaktif oksijen türevleri ve proinflamatuvar sitokinler ile kan-beyin bariyeri geçirgenliğini değiştirecek ve sinir iletimi, sinaps morfolojisi ve nörogenez gibi geniş bir nöronal süreç spektrumunu etkileyecektir (103). Bununla ilişkili olarak bozulan miR düzeyleri ile hematopoez, epilepsi veya Alzheimer hastalığı (AD) gibi birçok hastalığın otoimmün etiyolojisi arasında ilişkili saptanmıştır (104-106).

Santral sinir sisteminde zengin olarak bulunan ve spinal kolumnar organizasyonu destekleyen miR-9, Huntington hastalığında (107) ve transkripsiyon faktörü FoxP1'i düzenleyerek spinal musküler atrofi (SMA) hayvan modelinde disregüle olarak gözlemlenmiştir (108).

Perifer ve merkezi sinir sistemi arasındaki düzenlemenin yanında miRNA düzeylerine bağlı otoimmün hücesel değişiklikler nöronlardaki genleri düzenleyerek veya glial hücrelerin desteklenmesini etkileyerek dolaylı olarak nöronal işlevleri etkileyebilir (109). Alzheimer hastalığında beyinde upregülasyonu gözlemlenen ve inflamasyonu baskılayan kompleman faktör H (CFH)'ı hedefleyerek NF-kB bağımlı inflamasyonda rol alan miR-146a'dır (106). Ayrıca miR-146a, hem temporal lob epilepsi tanılı hastalarının hipokampusunda hem de sıçan epilepsi modelinde disregülasyonu gözlemlenmiştir (105).

X kromozomunda bulunan MECP2 geni ve buradan üretilen MeCP2 (methyl cpb binding protein 2) proteini sinir hücrelerinin işleyişi için hayati öneme sahiptir. Birçok sinirsel aktivitenin gerçekleşmesi için anlık/dönemlik olarak inaktif olması gereken bazı genlerin kapatılması veya baskılanmasında kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir. MiR-155a'ya benzer şekilde, miR-146a da MeCP2 ile ilişkilidir (110). MeCP2 bellek ve öğrenme süreçlerinde de rol almakta ayrıca miRNA'ların ekspresyonunu

düzenlemekte; miR-146a'nın IL-1 sinyal proteini IRAK1'i hem nöronlarda hem de miyeloid hücrelerde down-regüle edip IL-1'in nöroimmün çapraz-ilişkiye katılmasını sağlamaktadır (111).

Nöroinflamatuvar süreçlerle birlikte artmış nöron ölümü ve nörodejenerasyonla da miRNA ilişkisi saptanmıştır. Örneğin, Parkinson hastalığında , mutasyona uğramış LRRK2, miRNA aracılı süreçleri hücresel olarak etkilerken, Let-7, fibril oluşturan protein a-synuclein'i hedef alır (112).

Amyotrofik lateral sklerozda (ALS)'de ise miR-206'nın upregüle edilmesi, hasar görmüş nöromusküler kavşakları histon deasetilaz 4'ü hedef olarak reinerve ettiği gösterilmiştir (113).



**Tablo-2: Farklı Nörolojik patolojilerle ilgili miRNA'lar**

| miRNA    | NÖROPATOLOJİ               | DİSREGÜLASYON   | HEDEF                         | FİZYOLOJİK SONUÇ                                                                                                                   |
|----------|----------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| miR-9    | Huntington Hastalığı       | Down-regülasyon | REST                          | Nöronal gen ekspresyonunun kesintiye uğraması                                                                                      |
|          | SMA                        | Down-regülasyon | Ağır nörofilament subünitleri | Aksonal hücre iskeletinin kesintiye uğraması                                                                                       |
|          | Alzheimer Hast.            | Down-regülasyon | ?                             | ?                                                                                                                                  |
| miR-124  | DOE                        | Down-regülasyon | C/EBP- $\alpha$               | Mikroglia aktivasyonu ve makrofaj infiltrasyonu                                                                                    |
| miR-125b | Alzheimer Hast.            | Up-regülasyon   | ?                             | ?                                                                                                                                  |
| miR-132  | Huntington Hastalığı       | Up-regülasyon   | ?                             | ?                                                                                                                                  |
|          | Alzheimer Hast.            | Down-regülasyon | ?                             | ?                                                                                                                                  |
|          | Şizofreni/Bipolar bozukluk | Up-regülasyon   | ?                             | ?                                                                                                                                  |
| miR-146a | Alzheimer Hast.            | Up-regülasyon   | CFH                           | Neokorteks ve hipokampüste gelişmiş inflamatuvar cevap                                                                             |
|          | Epilepsi                   | Up-regülasyon   | ?                             | ?                                                                                                                                  |
|          | HIV ensefaliti             | Up-regülasyon   | MCP-2                         | Viral enfektif süreçte inflamatuvar cevabın düzenlenmesi                                                                           |
|          | Rett Sendromu              | Down-regülasyon | IRAK-1                        | ?                                                                                                                                  |
|          | MS / DOE                   | Up-regülasyon   | CD47,SHIP1                    | Dentitik hücreler aracılığı ile Th0 hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşması ve anormal makrofaj/mikroglia fagositoz sinyalleri |
| miR-212  | Şizofreni/Bipolar bozukluk | Up-regülasyon   | ?                             | ?                                                                                                                                  |
|          | Alzheimer Hast.            | Down-regülasyon | ?                             | ?                                                                                                                                  |
| miR-326  | MS / DOE                   | Up-regülasyon   | Cd47, Est-1                   | Th0 hücrelerinin Th17 hücrelerine direkt dönüşümü ve anormal makrofaj/mikroglia fagositoz sinyalleri                               |

miRNA alanında araştırmalar son on yılda oldukça kapsamlı geniş bir alana yayılmış durumdadır. Bununla birlikte, miRNA'ların çoklu işlevsellikleri, farklı yolaklardaki görevleri, özellikle nöroimmün hastalıkların patogenezinde rol alan miRNA'ların etkilerinin tam kapsamını anlamamızdaki ilerlemeyi yavaşlatmaktadır. Hem evresel hem de merkezi bağışıklık hakaretlerinin nöronlarda, onları çevreleyen glia, mikroglia ve infiltre eden lökositlerde veya periferik lökositlerde çeşitli miRNA'ları disregüle olduğu gösterilmiştir. miRNA'ların hem merkezi kontrol nedeniyle hem de periferik bağışıklık hücrelerinden geriye mesajları göndererek nöroimmün işlevleri düzenlemede rol almaktadırlar. Bu tür mesajlar merkezi komuta uyarı getirir ve karmaşık bir çift yönlü geribildirim sonuçlarına yol açar. Sinir ve bağışıklık sistemlerinde çoklu rolleri olduğu için, miRNA'lar hem sağlıklı durumda hem de hastalıkta bu tür iletişim kaskadlarını başlatabilir. Dolayısı ile bu tür miRNA'ların tespiti tanısıl açıdan ve manipülasyonları ise terapötik açıdan yararlı olabilir.

### **3.4 Multiple Skleroz ve MikroRNA**

#### **3.4.1 Multiple skleroz patogenezi ve miRNA**

Multiple skleroz muhtemelen çevresel uyaran (rn; enfeksiyon), yatkınlık genleri (nöroinflamasyona yatkınlık sağlayan genlere sahip bireyler) ve belirleyici genler (yatkın bireylerdeki hastalık fenotipi) arasındaki etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca miRNA aracılı gen düzenlenmesi gibi epigenetik mekanizmalar ise bireydeki hastalığa yatkınlığı ve hastalık şiddetini belirleyebilmektedir.

İnsan bağışıklık sisteminde, miRNA'lar, bakteriler, virüsler ve diğer patojenlere karşı doğal bağışıklık cevaplarının modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. İmmün hücrelerin işgalci patojenlere karşı oluşturdukları bu enflamatuar yanıtlar etkin ve sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. miRNA'lar adaptif bağışıklık sisteminin gelişimini ve düzenlenişini de etkiler. T ve B hücrelerinin biyolojik aktiviteleri, spesifik miRNA'lardan etkilenir. Daha spesifik olarak, miRNA'lar, Treg hücrelerinin aracılı olduğu pro-inflamatuar yanıtlara ilaveten, B ve T hücreleri gelişimini ve farklılaşmasını düzenlemektedir. MS'in kompleks patofizyolojisi ve buna doğal/edinsel

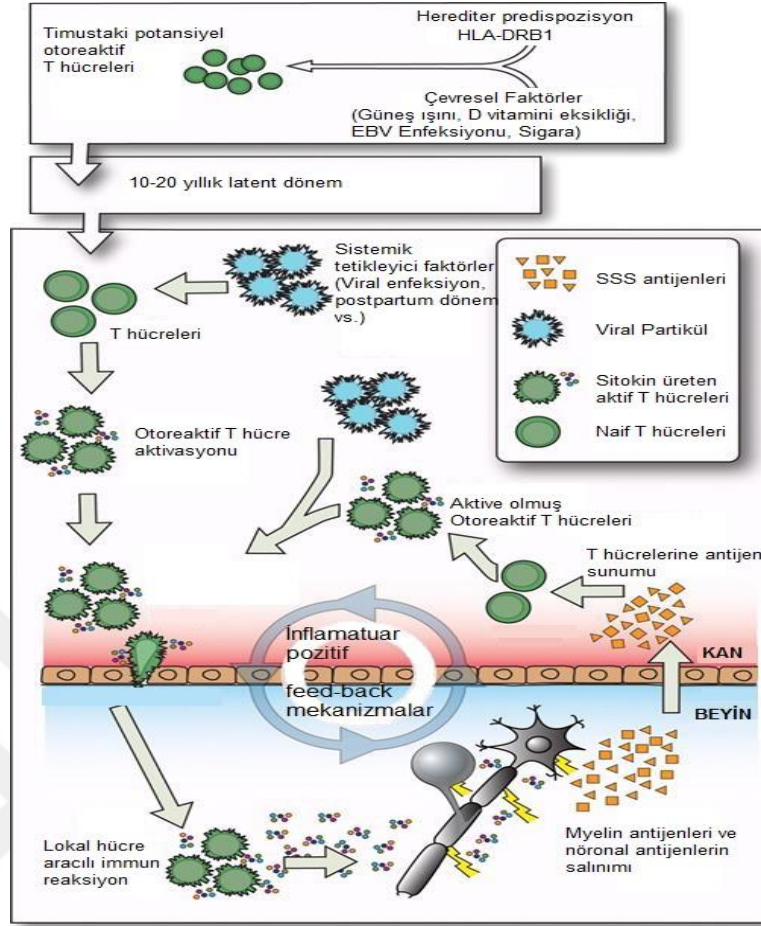
başıklıklağın dahil edilmesi göz önüne alındığında, spesifik başıklık hücre alt gruplarındaki miRNA profillerinin incelenmesi, potansiyel yeni biyolojik belirteçleri açığa çıkarabilir ve altta yatan mekanizmaları daha da aydınlatılabilir.

Klinik ve patolojik bulguları çeşitlilik göstermesi, doku hasarında farklı yollarla etken olduğunun bir göstergesidir. İmmunpatogeneze, santral sinir sisteminin miyelin komponenti ve ilişkili diğer proteinlere karşı T hücre aracılı inflamasyon ile başlar. Bu süreçte B lenfositlerin de görev alır. Sonraki basamakta mikrogial aktivasyon ön plana geçtiği ve kronik nörodejeneratif bir seyirle hastalık sürecinin devam ettiği üzerinde genel görüş birliği oluşturulmuştur (114). MS patogenezinde hem hemostaz değişikliklerine hızlı cevap veren doğal immün sistem, hem de daha uzun bir süreçte devreye giren ancak daha etkin ve özgül bir yanıt oluşturan edinsel immünite görev almaktadır (71).

T hücrelerinin aktivasyonu antijen sunumu ile gerçekleşir. Bu sunum sonucunda hafıza T hücreleri ve efektör T hücreleri (CD4+ ve CD8+) gelişir. CD4+ T hücreleri makrofajların fonksiyonlarının düzenlenmesi, B hücrelerinin antikor sentezi ve CD8+ T hücre yanıtının artırılması gibi immün sistemde regülasyon/süpresyon görevleri vardır (115). Antijenle uyarılan naif CD4+ T hücreleri T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17) ve indüklenebilir T regülatör (i Treg) hücrelerine farklılaşır. Th1 ve Th17 pro-inflamatuar sitokin üretimi yaparken Th2 anti-inflamatuar sitokinleri üretir.

MS patogenezinde yoğunluk Th1 ve Th17 hücrelerindedir. MS ve deneysel otoimmün ensefalomyelitte (DOE) Th1/Th2 aksı önemli olmakla birlikte Th17 keşfi ile MS'in Th1/Th17 aracılı otoimmün inflammatuar bir hastalık olduğu ve erken fazda Th17 rol almakta iken inflamasyonun daha geç fazlarında Th1'in rolü olduğu düşünülmektedir (116-118). MS patogenezinde en temel unsur CD4+ T hücreleridir. Ancak CD8+ T hücreleri, nöron ve oligodendrosit gibi MHCI/antijen eksprese eden hücreler üzerinde hasar oluşturarak, sitotoksik granülleri salınımı ile Fas gibi yüzey moleküllerinin aktive edip apoptozu tetikleyerek veya direk transeksiyon yolu ile aksonal hasarı oluşturarak patogenezin bazı basamaklarında rol

almaktadırlar (119). KBB'nin bozulmasında Th17 hücreleri tarafından üretilen IL-17 (IL-17A) anahtar rol oynar. IL-17 immun hücrelerin santral sinir sistemine göç etmesine neden olur. Hücrel infiltrasyonu, astrosit ve mikroglialardan inflamatuvar mediatörlerin üretimini artırır. Yüksek düzeyde sitolitik granzim B eksprese eder ve endotelial hücreler arasında reaktif oksijen ürünlerinin toplanmasına yol açarak KBB'nin bozulmasında önemli rol üstlenir(120)(121). Deneysel otoimmun ensefalomyelit çalışmalarında Th17 hücrelerinin ensefalojenik patogeneizde temel unsurun makrofaj ve dendritik hücrelerde farklılaşma ve aktivasyonunda rol oynayan granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF) olduğunu göstermektedir (120). MS hastalarının BOS ve plaklarında yüksek IL-17 düzeyleri saptandığı ve hastalığın evlerinde KİS'te Th17 ve IL-17A düzeylerinin sağlıklı kontrol gruplarına göre birkaç kat arttığı gösterilmiştir (117,122). Tedavide kullanılan İnterferon- $\beta$  (IFN-  $\beta$ ) naif CD4+ hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşümünü inhibe etmesine rağmen DOE'de yapılan IL-17 nötralizasyonunun hastalığı tamamen ortadan kaldırmadığını dolayısı ile karmaşık birçok yolağın patogeneizde rol aldığı düşünülmüştür (123,124). MS tedavisinde kullanılan IFN- $\beta$  ve glatiramer asetat'ın etki mekanizmalarından biri Treg hücre sayısı ve IL-10 düzeyini artırmak ve proinflamatuvar sitokin düzeyini süprese etmektir. T reg hücreler periferel dolaşıma çıkan otoreaktif T hücrelerinin baskılanmasını sağlamaktadır.



**Şekil-8:** Multiple Skleroz immunpatogenezi (125).

MS immunopatogeneziinde antijen sunan hücrelerinde etkin rolü olmaktadır. T hücreleri tarafından tanınan ve otoimmunitiyi tetikleyen en önemli antijenler; MBP, MOG ve PLP'dir. Multiple sklerozda myelin reaktif CD4+ T ve B hücreleri, çevresel bir ajanın (muhtemelen virüs) komşu aktivasyon veya moleküler taklit yoluyla sistemik lenfoid organlarda süreci başlatır. Buradaki antijen sunan hücreler MHC sınıf 2 aracılığı ile yabancı antijenleri T hücrelerine sunar. Ayrıca AŞH'da bulunan kositumilatör, T hücre reseptörü ile etkileşir ve T hücre aktivasyonu gerçekleşir. Periferde aktive olan CD4+Th hücreleri KBB'de vasküler alandan yuvarlanma, aktivasyon, adhezyon, sürünme ve son olarak migrasyon basamakları ile perivasküler alana oradan da kemotaksis ile beyin parankimine geçerler. Merkezi sinir sisteminde immun kompartmanda AŞH tarafından (en çok mikrogliya) MHC sınıf 2 aracılığı ile tekrar antijen sunumu gerçekleşir. Otoreaktif hücrelerin

reaktivasyonu gerçekleşir. T,B ve monositlerden oluşan inflamatuvar kaskat başlar. Mikroglia devamlı aktivasyonu ile myelin hasarı oluşur. Myelin yıkımı ile ortaya çıkan ürünler self reaktif T hücreleri için tekrar hedef haline gelir. Buna 'epitope spreading' denir ve relaps/remisyonlar şeklinde giden hastalık sürecini oluşturur (126).

MS'te gelişen immunopatogenezi özetleyecek olursak:

Periferde ;

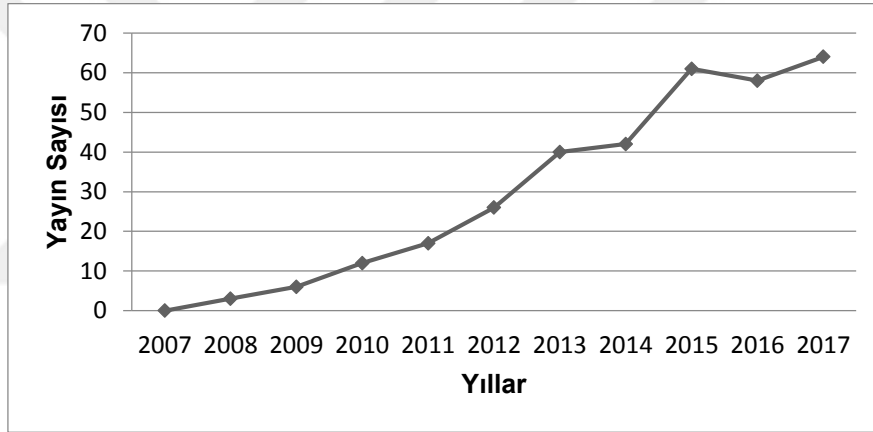
- 1-Naif CD4+ T hücrelerine antijen sunumu; proinflamatuvar Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşma
- 2-Proinflamatuvar sitokin salınımı
- 3-Adezyon moleküllerinin up-regülasyonu
- 4-KBB'nin bozulması
- 5-MSS'ye T hücre göçü
- 6-B hücre aktivasyon ve proliferasyonu, MSS'ye göçü
- 7-Treg disfonksiyonu

Santralde;

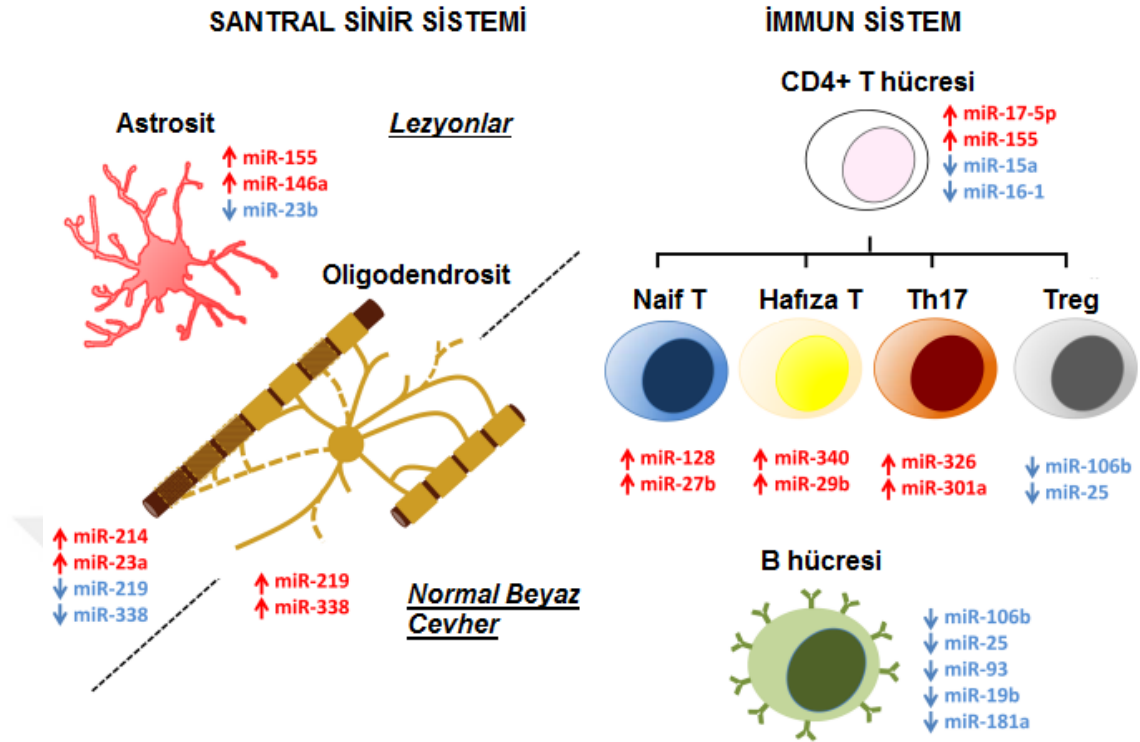
- 8-MSS antijenlerinin T hücrelerine sunumu ve reaktivasyonu
- 9-CD8+ T, B, Monosit, Makrofaj ve mikroglia gibi diğer inflamatuvar hücrelerin toplanması
- 10- Sitokin ve komplemanların yol açtığı hasar, oksidatif strese bağlı mitokondri disfonksiyonu ve antikor aktivitesi sonucu miyelin, oligodendrosit ve aksonlarda hasar gelişmesi (126).

Bu alanda ilginin artması ile çalışmalar multiple skleroz hastalığının patogenezinde miRNA'ların fonksiyonları üzerine özellikle odaklanmaya başlamıştır. İnsanlarda ve deneysel olarak hayvan modellerinde organizmanın çeşitli alanlarında birçok miRNA araştırılması yapılmış örneğin miR-21, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b, miR-155 ve miR-326 (127), miR-15a, miR-19a, miR-22, miR-210 ve miR-223'ün upregülasyonu, miR-15b,

miR-181c ve miR-328 gibi bazı miRNA'ların ise anlamlı downregülasyonu saptanmıştır. Mir155 ve mir-326'nın ise tanısal markır düzeyinde anlamlılığının olduğu ortaya atılmıştır (128). Bir başka çalışmada ise normal beyaz cevher gelişimi ile beyaz cevherde otoimmün inflamatuvar gelişimde miRNA'lar aracılığı ile posttranskripsiyonel değişimlerin olup olmadığı santral sinir sisteminde sınırlı bir alan olan beyin omurilik sıvısında incelenmiş ve multiple skleroz tanısı almış olgularda miR-223 anlamlı düzeyde upregüle saptanırken; miR-191, miR-29c, miR-449b, mir-125b, miR-324-5p, miR-99a, miR-532-3p, miR-132, miR-151-3p, miR-421, miR-1914, miR-485-5p anlamlı düzeyde downregüle saptanmıştır (129).



**Şekil-9:** Yıllara göre Multiple Skleroz ile ilişkili miRNA yayınları



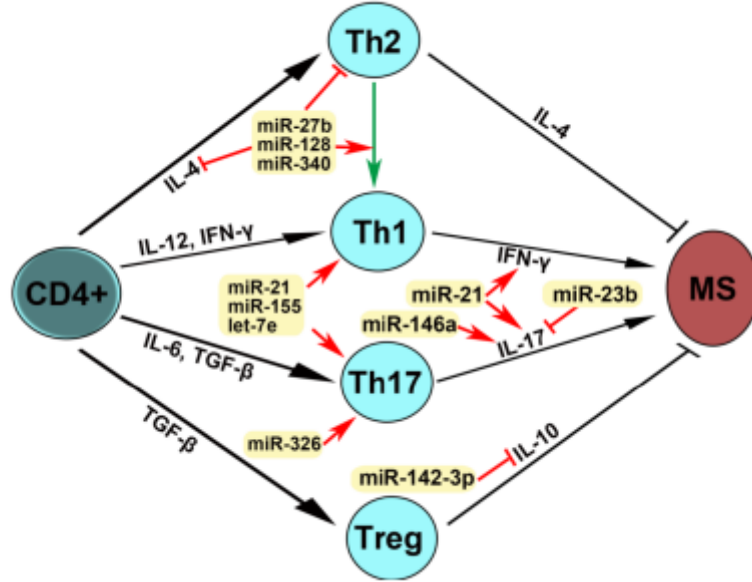
**Şekil-10:** Multiple Skleroz hastalarında immün sistem hücrelerinde ve santral sinir sistemi lezyonlarında miRNA disregülasyonları (62).

\*Disregülasyon, SSS'de astrosit ve oligodendrosit ve immün sistemde naif T hücreleri, hafıza T hücreleri, Th17 hücreleri, Treg hücreleri ve B hücreleri ile ilişkilidir. **Kırmızı**; up-regülasyon, **Mavi**; down-regülasyon

Th17 hücreleri, MS de dahil otoimmün hastalıklarda iltihaplanma ve doku hasarına katkıda bulunan efektör T hücrelerinin bir alt grubudur. Th17 hücre farklılaşması birkaç sitokin ve büyüme faktörü tarafından kontrol edilir, ancak miRNA'lar için roller tanımlanmamıştır. Patofizyolojide miRNA'ların etki mekanizmalarını inceleyen çalışmalarda ise özellikle Th17'yi hedefleyen miRNA'ların up-regülasyonunun aktif MS lezyonlarında makrofaj aracılı hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (102).

miR-155'in deneysel olarak SSS'de MS lezyonlarına spesifik nörosteroid sentezi ile ilişkili birkaç proteini düzenlediği, Th1,Th2 gelişimini indüklediği, CD47 ekspresyonunu azaltarak makrofaj salınımı ve miyelin fagositozuna yol açtığı, Th1 ve Th17 hücrelerinin gelişimini artırdığı saptanmıştır(130). Ayrıca miR-155, IL-1 $\beta$  / IFN- $\gamma$ 'ya yanıt olarak in vitro

üretileen astrosit ilişkili sitokinleri, sitokin üretiminin negatif düzenleyicisi olan SOCS1'i down-regüle ederek beyindeki sitokin üretimini teşvik eden bir rolü olduğu düşünölmektedir (131).



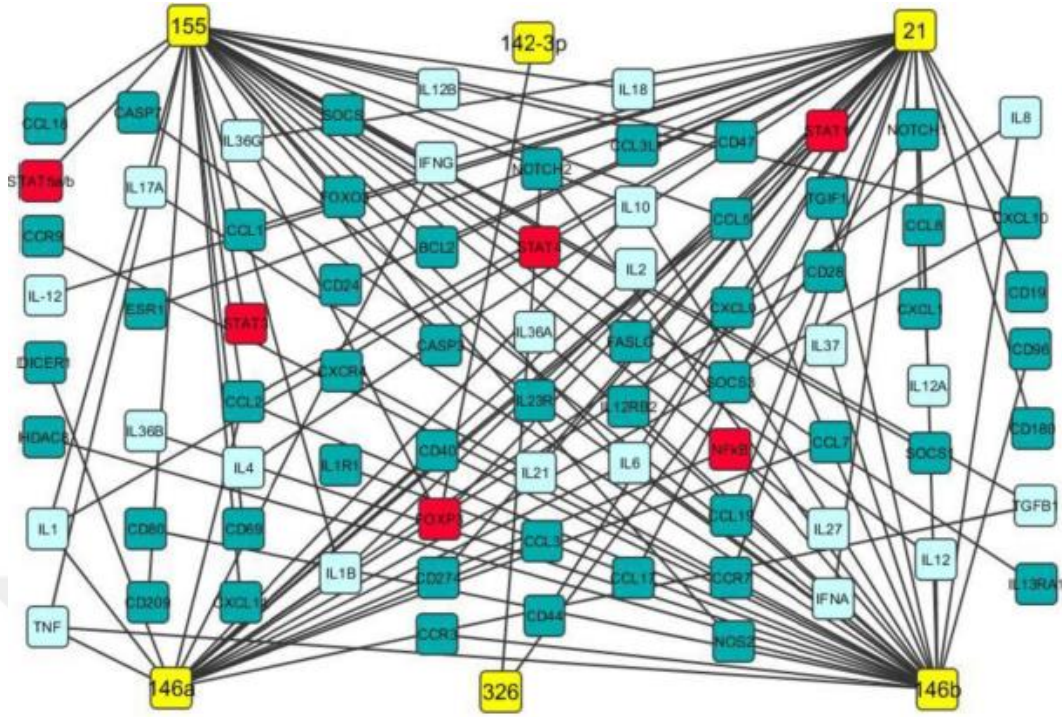
**Şekil-11:** Multiple Sklerozda miRNA'ların disregölasyon aktiviteleri (128).

miR-146a ayrıca aktif MS lezyonlarında, EAE'de ve diğeer otoimmün hastalıklarda yüksek seviyede ekspresyon seviyeleri sergilemektedir. NF-κβ ile uyarılan miR-146a, başlangıçta, IRAK1'in hedeflenmesiyle monositlerde doğal immün cevabı düzenleyen önemli bir negatif geri besleme döngüsü oluşturduğu gösterilmiştir. IRAK1'i inhibe ederek IL-17 üretimini arttırdığı, IL-6 ve COX-2'yi hedefleyerek de astrosit ilişkili nöroinflamatuvar yanıtta rol aldığı ve dolayısı ile RA ve psöriazisteki görevine benzer şekilde MS'te reaktivasyon ve proinflamasyon basamaklarında görev aldığı belirtilmiştir (132-135). Bununla birlikte, daha yakın tarihli veriler, IRAK1'in miR-146a aracılı down-regölasyonunun, IRAK2'nin indüklediği NF-κβ aktivasyonunun güçlendirilmesi ve insan astroglial hücrelerinde sürekli bir enflamatuvar yanıt ile ilişkili olduğu ileri sürölmüştür (136). miR-146a'nın beyindeki pro-inflamatuvar rolünde bir diğeer yol ise beyin iltihabının negatif bir düzenleyicisi olan kompleman faktör H (CFH)'nın ekspresyonunu down-regüle etmesidir

(106). miR-146b'nin ise NF- $\kappa$ B yolunu aktive ederek ve proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretiminin inhibisyonuna yol açtığı saptanmıştır (137).

Multiple skleroz hastalarında miR-10a ile ilgili ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Multiple skleroz patofizyolojisi ile ilgili ayrıca miR-21'in IFN- $\gamma$  ve IL-17A aracılığı ile (138), miR-27b'nin Th2'den Th1 sitokinlerine kaymaya yol açarak, miR-27a'nın ise Th17 hücre farklılaşmasını sağlayarak (139), miR-34a'nın CD47 ekspresyonunu azaltarak (134), miR-125a-5p'nin KBB'deki endotel hücrelerinin sıklığını ve bariyerden immun hücre effuxunu bozarak (140), miR-140-5p'nin Th1 farklılaşmasının baskılanmasına yol açarak (141), miR-142-3p'nin T regülatör hücrelerini baskılayıp IL-10 ekspresyon inhibisyonu (142) ve ayrıca beyindeki D1 dopamin reseptörü üzerinden nöronal büyüme ve gelişimi baskılayarak (143), miR-191'in oligodentrosit myelinizasyonunu TGF- $\beta$  sinyal yolağında nöron gelişimi ve sinaptogenez ile ilişkili SOX4, ubiquitin proteolizi ve nörodejenerasyonla sonuçlanan inflamatuvar yanıtı yol açan astrositlerde NO salınımını sağlayarak MS patofizyolojisinde rol aldığı çalışmalarda belirtilmiştir. Yine birkaç çalışmada miR-223'ün oligodentrosit ve mikroglia fonksiyonlarının değişmesine, glutamat ilişkili exitoksisite üzerinden de nörodejenerasyona yol açtığı hastalığın progresyon aşamasında rol aldığı, miR-326'nin ise CD47 ekspresyonunu azaltarak makrofaj aktivasyonunu ve miyelin fagositozunu tetiklediği, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını ve sayısını artırarak (144) patofizyolojinin farklı basamaklarında rol aldıkları belirtilmiştir.



**Şekil-12:** miR-21, miR-142-3p, miR146a, miR155 ve miR326'nın potansiyel gen hedefleri Kemokinler (yeşil), sitokinler (açık yeşil), transkripsiyon faktörleri (kırmızı) (128).

MS lezyonlarındaki miRNA disregülasyonu, MS'deki inflamasyonun altında yatan moleküler mekanizmaya önemli katkı sağladığı görülmektedir. Bu en iyi örneği, miR-155 gibi pro-enflamatuar miRNA'ların up-regülasyonu ve anti enflamatuar miR-23b'nin down-regülasyonudur. Bu değişiklikler, özellikle astrositlerde gözlemlenmektedir. Ayrıca, normal miRNA ekspresyonunda gelişen değişikliklerin hem demiyelinizasyon, hem remiyelinizasyon hemde aksonal dejenerasyona yol açabileceği görülmektedir. Henüz gösterilememesine rağmen akson dejenerasyonunda ve aktive mikroglia'da gösterilmesi muhtemel miRNA disregülasyonları, MS'e fonksiyonel katkıda bulunan yeni miRNA'ları tanımlanmasına katkıda bulunabilir (62).

Daha detaylı olarak Relapsing remitting MS, primer progresif MS ve sekonder progresif MS hastalarının periferik kan ve mononükleer hücrelerinde, T ve B lenfosit hücreleri alt gruplarında ve MS lezyonlarında

miRNA ekspresyon farklılıkları ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, miRNA ekspresyon farklılıklarının hastalığın aktivasyonu, tedavi alıp almaması veya relaps varlığı ile değişkenlik gösterdiği saptanmış ve bu konuda daha fazla kohort çalışmalarına gereklilik duyulduğu belirtilmiştir.

### **3.4.2 Multiple Sklerozda biyobelirteçler ve tanısal belirteç veya tedavi hedefi olarak miRNA**

Çalışmalarda miRNA'ların 12 farklı vücut sıvısında analiz edilip biobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir(145). Bu alanda yapılan çalışmalar taranan miRNA çeşitliliği tatmin edici düzeylerde olsada olgu sayısı olarak genellikle yüksek seviyelere ulaşamamıştır. Örneğin 2013 yılında yapılan bir çalışmada sağlıklı ve MS tanısı olan hasta grubu karşılaştırmalı değerlendirilmiş 46 MS tanılı olgunun periferik kan mononükleer hücrelerinde toplam 297 miRNA eksprese edilmiş, ancak miRNA-145 upregülasyonu açısından belirgin anlamlılık saptanırken, alt gruplarda RRMS'te ise miR-744 ve Let-7d'nin anlamlı sayılabilecek upregülasyonu saptanabilmiş ve miR-145 açısından ek çalışmalar ile desteklenmesi halinde tanısal önemi olabileceği vurgulanmıştır (146).

Son yirmi yılda MS'te biyolojik belirteç bulma konusunda büyük ilgi var. Bu nedenle, birçok yayınlanmış aday biyolojik belirteç vardır. Bununla birlikte, bazı istisnalar dışında, birçok önerilen biyolojik belirteç, korelatiftir ve henüz yararlı prognostik kabiliyete sahip oldukları gösterilmemiştir. Buna ek olarak, bir dizi belirtilen inflamatuvar belirteç MS için spesifik olmayan belirteçlerdir.

MS için biyolojik belirteçlerle ilgili üç ana hedef vardır;

- 1- MS gelişme riski altındaki bireyleri öngörebilen hastalığa özgü biyolojik belirteçlerin belirlenmesi,
- 2- Ciddi atak veya progresif hastalık gelişme riski yüksek bireyleri öngörebilen progresif biyolojik belirteçlerin belirlenmesi,
- 3- Belirli tedavilere yanıt verebilen bireylerin tanımlanması böylece kişiselleştirilmiş tedavilerin etkinliğini en yükseğe, yan etkileri ise en aza indirmesini sağlanması.

**Tablo-3:** Multiple Skleroz tanı potansiyeli olan biyobelirteçler

|                                            | Belirteç                                                                  | Kaynak                                                                                  |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Klinik Biyobelirteçler</b>              | Oligoklonal bantlar<br>MRI<br>JC viral titres                             | BOS<br>-<br>Serum                                                                       |
| <b>MSS/Nörodejenerasyon Belirteçleri</b>   | NFI, GFAP, MBP, S100B ,<br>Ferritin, Tau , NCAM, NGF,<br>CNTF             | BOS                                                                                     |
| <b>Aktivasyon/inflamasyon Belirteçleri</b> | sCD163<br>YKL-40<br>CXCL13<br>OPN<br>Myelin-reactive T cells<br>Signaling | Serum/BOS<br>BOS<br>Serum/BOS<br>Serum/BOS<br>Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) |
| <b>RNA</b>                                 | <b>miRNA</b><br><b>mRNA transkriptom</b>                                  | PKMH /Serum/BOS<br>PKMH /Serum/BOS                                                      |
| <b>Antikorlar/Otoantikorlar</b>            | MRZR<br>KIR4.1                                                            | BOS<br>Serum                                                                            |
| <b>Mikrobiyal</b>                          | Lipid 654                                                                 | Serum                                                                                   |

MS tanı ve tedavisinde günümüzde OKB, MR ve JV virus titreleri kullanılmaktadır. MS tanısı ve tedavi yönetiminde ilk olarak kullanılan biyolojik belirteçlerden olan oligoklonal bantlar ilk 1983'te tanı kriteri olarak tanımlanmış (147), 2001 ve 2005 McDonald kriterlerinde yer alırken 2010 McDonald kriterlerinde RRMS için tanı kriteri olmaktan çıkartılmış, 2017 de ise tekrar tanı kriterlerinde yerini almıştır (148).

Uzun yıllar yapılan çalışmalarda MS'te potansiyel biyobelirteç olarak; MSS Nörofilamentleri ve GFAP, sCD163, YKL-40 (Chitinase-3-like 1), CXCL13, Anti-mikrobiale antikorlar, miRNA and mRNA, myelin-reaktif T hücreleri, KIR4.1 antikorları, serum osteopontin, mikrobiom ilişkili lipopeptidler, genetik ince haritalama, sinyalizasyon kaskadlarında genetik yatkınlık ve değişiklikler, immuno-çip, PICS(Probabilistic Identification of Causal SNPs) analizi olarak belirtilmiştir. MS tanılı hastaları erken tedavi etme ve doğru tedavi yöntem seçimi, hastalık progresyon, kötü seyir ve

tedaviye yanıtları tahmin edebilen yararlı prognostik biyobelirteçlerin olmamasından dolayı engellenmektedir. Ek olarak, yeni ilaçların klinik denemeleri, 1-2 yıllık bir deneme süresince tedaviye cevabı öngörebilen biyolojik belirteçleri gerektirir. Bu biyolojik belirteçlerin hızlı, nispeten ucuz, birden çok merkezde ve klinisyenlerin çoğunluğunun erişebilir olarak uygulanması gerekir. Bugüne kadar MS için potansiyel biyolojik belirteçlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, yalnızca seri MR'lar prospektif çalışmalarda klinik yarar sağlayacak şekilde ortaya çıkmıştır. Küçük kapsamlı kohort, kesitsel, orta dereceli uzun süreli kohort çalışmaları MS için olası biyobelirteçlerden oluşan bir panel sağlamıştır. Bir sonraki aşamada soru yeterince güçlendirilmiş çok merkezli bir çalışmada bu potansiyel belirteçlerin hem tarama hem de progresyon açısından değerlendirilmesi ile optimal biyolojik belirteçlerini kesin olarak belirlemektir (149).

Bu konuda yapılmış çalışmalarda hem MS hem de DOE olgularında miR-155 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı saptanmış ve miR-155'in MS'li hastalar için bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşünülmüştür (144,150). miR-145 için de benzer şekilde MS hastaların mononükleer hücrelerinde dramatik bir şekilde arttığından ve MS hastalarının sağlıklı kontrollerden ayrımında iyi bir tanısal biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğinden bahsedilmiştir (146-151). Küçük gruplarda yapılan diğer birkaç çalışmada ise miR-21, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b ve miR-326'nın MS etyopatogenezinde upregüle olmasının tanısal belirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (128).

Bu araştırmalar, miRNA'ların tedavi hedefi olarak kullanılıp kullanılamayacağı sorusunda gündeme getirmiştir. MS hastalığında myelin onarımı, gliogenez ve nörogenez endojen doku onarım mekanizmaları özgül miRNA'lar tarafından sağlanabilmektedir. Bu onarım mekanizmalarının geliştirilmesi tedavide önemlidir. Deneysel hayvan modellerinde miR-155 ekspresyonunun baskılanması ile Th17 ve Th1 in gelişiminin ve deneysel ensefaloomyelitin önlenebileceği gösterilmiş ve MS gelişimde gelecekte tedavi hedefi açısından kayda değer bir hedef olduğu öngörülmüştür

(144,152). Yine miR-326'nin hedeflenerek Th17 inhibisyonu ile deneysel ensefalomyelitin önlenebildiği (153,154), miR-155 ve miR-326 yolakları ile NF-κB yolu üzerinde birleşen, IL-17 etkisini artıran miR-23b'nin deneysel modellerde tedavi açısından anlamlı bir hedef olduğu objektif olarak gösterilmiştir (155). Diğer yandan miR-125a-5p'nin kan beyin bariyeri düzenleyici rolü ile miR-124'ün hipokampal demiyelinizasyon üzerindeki etkileri göz önüne alındığında tedavi hedefi olabileceği öngörülmüştür. miR-27b, miR-128 ve miR-340'ın deneysel çalışmalarda Th1/Th2 oranında artışta rol aldığı, IL-4 ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca bu üç miRNA için oligonükleotit mikro-RNA inhibitörlerinin in vitro ortamda verilmesi ile MS hastalarındaki Th2 yanıtlarının tekrar düzenlendiği gösterilmiştir (156).

### **3.4.3 miR-10a, miR-146a ve miR-155**

#### **3.4.3.1 miR-10a**

miR-10a ve çeşitli hastalıkların etiyopatogenezleri ile ilgili yayınlar kısıtlı olmasına karşın literatürde son 7-8 yılda bu konuda çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda miR-10a'nın gastrik hücrelerde tümör süpresör görevi gördüğü, DNA metilasyonunu regüle ettiği ve mide kanserinde teşhis veya terapötik hedefi olarak anlamlılığının olduğu (157), böbrek hasarında üriner miR-10a'nın potansiyel bir biyomarker olabileceği (158), serviks kanserinde kanser proliferasyonunu baskıladığı (159), farelerde santral sinir sisteminde BDNF-TrkB sinyal yolağı ile hipokampal nöronlarda remodeling ve nöronal hücre proliferasyonu ve apoptoziste görev alarak Alzheimer hastalığının patogenezinde rol aldığı (160), PI3K/Akt/mTOR yolağı ile meme kanseri gelişimini baskıladığı (161) ve retinoik asit ile bu etkisinin düzenlenebildiği (162), sinoviyositlerde down-regülasyonu ile eklem inflamasyonunu kontrol ettiği (163), T-box 5'i hedefleyerek kardiyak hipertrofi gelişimini azalttığı (164), RA'da NF-κB/YY1 üzerinden proinflamatuvar sitokinlerden TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, ve MCP-1'in fibroblast benzeri sinoviyositlerden salınarak inflamasyonun düzenlenmesinde görev aldığı (165), down-regülasyonunun özefagus kanserinin patogenezinde rol aldığı (166) ve son olarak alkol bağımlılıklarında stress ile ilişkili alkol tüketiminde (167) rolü olduğu

belirtilmiştir. Bu çalışmaların yanında kanser tedavisinde ilaç direnci ile de ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (168).

miR-10a'nın otoimmün sistemde ise Treg hücrelerinde eksprese edilirken diğer timosit alt grup T hücrelerinde eksprese edilmediği, Treg hücrelerinin stabilizasyonu ve fonksiyonu için çok önemli olduğu ve in vitro ortamda miR-10a ekspresyonunun inhibisyonunun FoxP3 ekspresyon seviyelerinin azalmasına yol açtığı saptanmıştır (169). Ayrıca birkaç çalışmada miR-10a'nın mikrobiyotada başlayan otoimmün inflamatuvar süreçte Th17 ve Treg hücre farklılaşmasında önemli rolü olduğu belirtilmiştir (80,170).

#### **3.4.3.2 miR-146a**

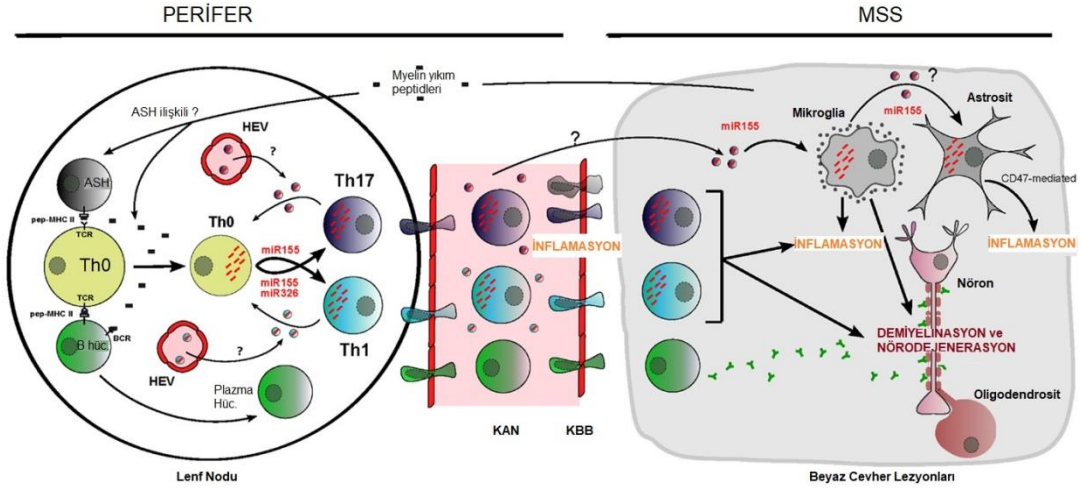
miR-146a doğal bağışıklık yanıtlarında rol oynayan bir miRNA'dır ve ekspresyonu kronik inflamasyon ile prezente olan hastalıklarda artmaktadır (171). Alzheimer hastalığında miR-146a'nın beyinde inflamatuvar yanıtın önemli bir baskılayıcı molekülü olan kompleman faktör H'nin(CFH) translasyonunu baskılayarak nöroinflamasyon ve oksidatif stress süreçlerinde rol aldığı, postmortem AH olgularının hastalıktan etkilenen hipokampus, temporal korteks ve medial frontal girus gibi beyin bölgelerinde miR-146a'nın ekspresyonu artarken CFH'nin azaldığı belirtilmiştir (106). İn vitro, huntington hastalığında(HH) kortikal birikimi gözlemlenen Tata Binding Protein (TBP) traslasyonunu baskılayan miR-146a'nın ekspresyonunun azaldığı (172), deneysel epilepsi ve prion nörodejenerasyonu modellerinde ise nöroinflamasyon ile miR-146a'nın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (105,173). HIV ensefalopatisi modellemelerinde ise miR-146a'nın HIV'in T lenfosit içine girişte kullandığı CCR5 kemokin reseptörünün ligandı olan ve girişi bloke eden CCL8/MCP2 kemokin translasyonunu baskıladığı ve lenfosit içine girişi kolaylaştırdığı, HIV ensfalopatisinde kronik inflamasyonun devamında miR-146a ekspresyon artışının rolü olduğu düşünülmektedir (174).

Multiple skleroz'da ise aktif MS lezyonlarında immun yanıtla ilişkili olarak beyaz cevherde miR-155 ve miR-146a ekspresyonlarında, inaktif lezyonlarda ise miR-155 ve miR-326 ekspresyonlarında belirgin artış

saptanmıştır. miR-146a'nın TLR ve sitokin reseptörü sinyallemelemlerinin endojen düzenleyicisi ve T hücre nesillerinin korunmasında en çok role sahip Treg hücrelerde en çok eksprese edilen miRNA olduğu belirtilmiştir (175). miR-146a antiapoptotik faktör olarak aktivasyon-indüklenmiş hücre ölümüne aracılık etmekte, TCR birleşimi ile indüklenen aktivatör protein-1 (AP-1) aktivitesini ve IL-2 üretimini azaltarak ve birleşim sonrası NF-kB ekspresyonunu artırarak edinsel immun sistemde rol almaktadır. Ayrıca TRAF6 ve IRAK1 ekspresyonlarını azaltarak TLR ve inflamatuvar sitokin sinyallemesini düzenlediğı saptanmıştır (176).

### **3.4.3.3 miR-155**

miR-155, 2004 yılında ilk olarak burkitt lenfoma tanılı çocuklarda yüksek düzeyde ekspresyonunun gözlemlenmesi üzerine bu miRNA üzerinde çalışmalar başlamıştır (177). Takip eden süreçte invitro deneysel üveit modellerinde (178), koroner kalp hastalıklarında biyomarkır potansiyeli olduğu (179) 11 farklı kanser türünde (serviks, meme, mesane, kolorektal, safra kesesi, akciğer, renal, pankreas, hepatosellüler ve KLL) sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı düzeyde ekspresyonlar saptandığı (180) belirtilmiştir. miR-155 B hücresi entegrasyon kümesi geni (Bİc) bölgesinde kodlanır. Endojen miR-155'in disregölasyonu insan kanserlerinin patogeneğinde rol oynar. Yakın zamanda, romatoid artrit (RA), multipl skleroz (MS) ve sistemik lupus eritematosus (SLE) dahil birçok otoimmün hastalıklarda da miR-155'in anormal ifadesi gözlenmiştir. Fonksiyonel analizler, miR-155'in, spesifik mRNA'ları hedefleyerek immun sistemde düzenleyici potansiyelinin olduğu göstermiştir. Bu görevi değiştirilmiş immun hücreler otoimmün hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığından, miR-155'in çok yönlü bir terapötik hedef olabileceğı belirtilmiştir.

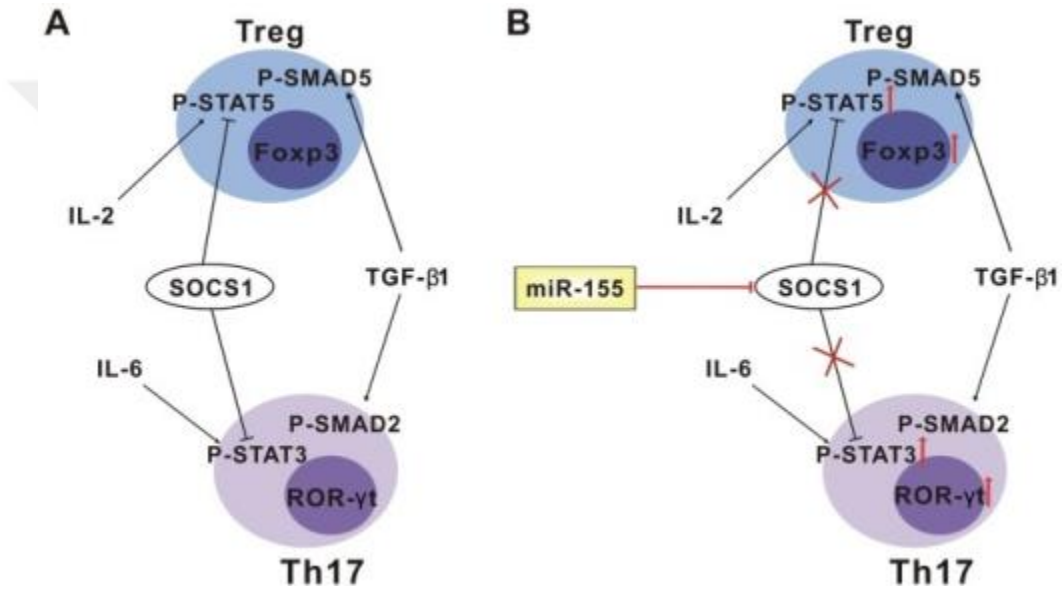


**Şekil-13:** Multiple skleroz'da miR-155'in inflamasyondaki rolü(181).

miR-155 disregülasyonu germinal ve ektrafoliküler merkezde B hücre eksikliğine yol açar ve mevcut B hücrelerinden de Ig-G1 antikorları üretilmez. Hematopoetik sistemde miR-155 'in hedefi olan SHIP-1 düzeylerinin azalması durumunda spontan germinal merkez oluşumu ve antikor sınıfı değişimi bozulur. miR-155, bağışıklık hücrelerinde birçok özel mRNA'yı hedefleyerek güçlü düzenleyici işlevlere sahiptir. MiR-155\* IRAKM'i hedefleyip IFN $\alpha$  ve IFN $\beta$  ekspresyonunu artırarak antijen sunan dendritik hücrelerde inflamatuvar cevabın yoğunluğunun kontrolünü sağladığı, up-regülasyonunun ise apoptozu indükleyebildiği ve dendritik hücrelerde IL-1 sinyal yolağını negatif olarak modüle edebildiği, eksikliğin ise IgG1 üretiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.

İmmun sistemde gelişen hafıza bilgisinin de miR-155 yokluğunda bozulduğu düşünülmektedir. B hücreleri, özellikle sistemik lupus eritematosus (SLE) ve romatoid artrit (RA) otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. MiR-155'in up-regülasyonu, bu hastalıkların hedef organlarındaki pro-inflamatuvar cevapların oluşmasını destekleyebilir. miR-155 sağlayan Bic gen bölgesinden yoksun CD4+ T hücleri değerlendirildiğinde Th2/Th1 oranında, Th2 sitokinleri ve IL-4 miktarında artış geliştiği gözlemlendi. Deneysel olarak farelerde miR-155 üreten gen lokusu çıkartıldığında (miR-155 -/-) IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  ve Th17 hücre üretiminin azaldığı, IL-17A'nın hatalı üretildiği saptandı. IFN- $\gamma$  üreten Th1 ve IL-17

üreten Th17 hücreleri bir çok organa özgü otoimmün hastalıkların patogeneziyle ilişkilidir. Th17 hücre ile ilişkili inflamatuvar sitokinlerin seviyesi, miR-155 tarafından dolaylı olarak artırılabilir. Treg hücreleri otoimmünitenin önlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır ve fonksiyon bozukluğu otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunur. MiR-155 eksikliği Treg hücrelerinin sayısının azalmasına neden olur. Yüksek miR-155 ekspresyonu Treg hücre çoğalma potansiyelini korumasını sağlarken Treg hücrelerinin baskılayıcı aktivitelerini engellemez.



**Şekil-14:** miR-155'in SOCS1 aracılığı ile Th17 ve Treg hücre farklılaşmaları düzenlenmesi(182).

Sonuç olarak tüm etkiler göz önüne alındığında immün hücrelerdeki miR-155, patojenik bir potansiyele sahiptir ve yüksek ekspresyonu otoimmün yanıtları tetikleyip otoimmün hastalıklara neden olabilir. RA, SLE, ÜK gibi otoimmün hastalıklarda sinovyal hücrelerde, fibroblastlarda, kolon mukozasında ve periferik mononükleer hücreler gibi hastalığın ilişkili olduğu dokularda miR-155 ekspresyon disregülasyonları saptanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1 Gereç

#### 4.1.1 Çalışma Grubu

Bu çalışma, T.C. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde (U.Ü. Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulundan 29.09.2015 tarih ve 2015-17/18 karar no ile onay alınarak), Helsinki Deklarasyonu Kurallarına uygun olarak yapılmıştır. 01.10.2015 - 01.04.2018 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda, revize McDonald 2017 kriterlerine uygun olarak KİS, RİS ve RRMS tanısı alan, sırasıyla 15,6,61 olmak üzere toplam 82 hasta ve 32 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Bireylerden alınan numuneler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda ileri analizler ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya katılan her birey çalışmanın içeriği, amacı ve uygulanışı konusunda bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı. Çalışmaya alınma ve çalışmadan dışlanma kriterleri tabloda özetlenmiştir.

**Tablo-4:** Dışlama kriterleri

#### Çalışmaya Alınma Kriterleri

- 18 yaşını doldurmuş olması
- Revize McDonald 2017 kriterlerine göre KİS,RİS ve RRMS tanısı konulması
- Tanı almış başka nörolojik/otoimmün hastalığın olmaması

#### Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- Son 40 gün içinde hastalığa ait atak öyküsü olması
- Son 40 gün içinde antibiyoterapi almış olması
- Son 40 gün içinde yüksek doz antiinflamatuvar tedavi almış olması (örneğin >500mg metilprednizolon)

#### 4.1.2 Materyal

Çalışmadaki her bir bireyden bir kez 5 ml kan örneği ve özel ağız sızdırmaz kapaklı uygun tampon içeren kaşıklı dışkı kabına 6 sürümlük dışkı

örnekleri alındı. Kan örnekleri, gönüllülerin dışkı numunelerini polikliniğe getirdiği veya ziyaretlerde alındığı andan itibaren standart flebotomi işlemlerine göre 5 ml etilendiamintetraasetik asit tüpleri içine toplandı. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika boyunca x1000g 'de santrifüje tabi tutuldu. Plazma toplandı ve cryovial tüplerde dağıtıldı. Bir tüp RNA ekstraksiyonu için derhal kullanılırken diğer kısımlar -80 °C 'de etiketlendi ve muhafaza edildi. Numune alımından sonra ilk 3 saat içinde -80 °C 'de depolama yapıldı.

## **4.2 Çalışmada Kullanılan Ölçekler ve Yöntemler:**

### **4.2.1 Kandan RNA İzolasyonu**

Total kandan RNA izolasyonu gerçekleştirmek için Trizol Reagent® kullanıldı. Kit protokolüne göre kan hücrelerinin lizis edilmesi için 1 ml trizol ve 300 µl kan bir ependrofa alınarak vorteks yapıldı. Buz üzerinde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 200 µl kloroform eklenerek 10 sn vorteks edildi. 4°C'de x12.000g 'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan üst fazın %80'i yeni ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µl izopropanol eklenerek 10 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sounda x12.000g 'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Yıkama aşaması için 1000 µl %70 etanol eklendi. Sonrasında örnekler x7500g 'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Ependrof içerisinde elde edilen RNA'lar üzerinden %70'lik alkol uzaklaştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk kurumaya bırakıldı. 40 µl nuclease free su RNA pelleti üzerine eklendi.

Elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları 260/280 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) ile ölçüldü ve RNA örnekleri miRNA ekspresyon analizleri yapılncaya kadar -80°C de saklandı.

### **4.2.2 Gaytadan RNA İzolasyonu**

Gaytadan RNA izolasyonu gerçekleştirmek için Rneasy® PowerMicrobiome™ Kit (QIAGEN,Germany) kullanıldı. Kit protoküle göre gaytadan yeterli miktarda alınarak beads içeren tüplere aktarıldı. Homojen hale gelene kadar vorteks işlemi uygulandı. PM1 solusyonu 55°C'de 10 dk ısıtıldı. Herbir örnek için 650 µl PM1 içerisine 6,5 µl β-merkaptotanol

eklendi. Bu karışım örneklerin üzerine ilave edilerek maximum 10 dk süre ile vorteks işlemi uygulandı. x13.000g 'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant 2 ml'lik temiz tüpe aktarıldı. Üzerine 150 µl İRS solüsyonu eklendi. 4°C'de 5 dk inkübe edildi. Örnekler x13.000g 'de 1 dk santrifüj edildikten sonra üzerine PM3 ve PM4 solüsyonları eklendi. Üst kısımda bulunan süpernatant filtreli tüplere aktarıldı ve x13.000g'de 1 dk santrifüj edildi. Filtreli kısımda kalan RNA'ların üzerine PM5 solüsyonu eklendi ve DNase-I uygulandı. 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Sonrasında yıkama aşaması gerçekleştirildi. Filtreye 40 µl RNase'dan arındırılmış su eklenerek 5 dk inkübe edildi. Filtreli Spin Column'lar temiz ependrof tüplere geçirildi. x13.000g'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'lar elde edildi.

Elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları 260/280 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) ile ölçüldü ve örnekler -80°C de saklandı.

#### **4.2.3 Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini**

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 260 nm dalga boyunda ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/µL veya µL/ml düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA'nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA'nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA'nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır (Total RNA (ng/ µl ) = 260 nm'deki absorbans x 50 x Dilüsyon faktörü).

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 µl/ml'de karşılık geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerde bilindiği gibi 280 nm'de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm'de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oranın 2,00 olması gerekmektedir.

Çalışmamızda izole edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesi nanodrop cihazında ölçülerek ekspresyon analizleri için uygunluğu değerlendirildi.

Gaytadan ve Kandan İzole Edilen RNA konsantrasyonları ile ilgili Nanodrop Ölçümleri ekte sunulmuştur (EK-2, EK-3).

#### 4.2.4 Kan ve Gaytadan cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA sentezlemek için miRCURY LNA™ Universal RT microRNA Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Danimarka) kullanıldı. Kit protokolüne göre RT reaksiyonu Tablo-5'de belirtilen koşullarda soğuk blok üzerinde hazırlandıktan sonra 42°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk ve 4°C'de inkübe edildikten sonra cDNA'lar elde edildi. cDNA'lar 1:50 -1:500 oranında nuclease free su ile dilüe edildikten sonra -20°C'de saklandı.

**Tablo-5:** miRNA ekspresyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

| RT-PCR karışımı     |        |
|---------------------|--------|
| 5x Reaksiyon buffer | 2.0 µL |
| Nuclease-free su    | 4.5 µL |
| Enzim               | 1.0 µL |
| RNA spike           | 0.5 µL |
| RNA                 | 2.0 µL |
| Toplam hacim        | 10 µL  |

#### 4.2.5 Ekspresyon Analizi

Araştırdığımız hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-155-5p'nin ekspresyon analizleri için miRCURY LNA™ Universal RT-PCR primer mix (Exiqon, Danimarka) kullanıldı. Kontrol olarak RNU6 kullanıldı. Tablolarda belirtilen koşullarda RT-PCR karışımı ve PCR koşulları gerçekleştirildi. RT-PCR analizi Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre) sisteminde analiz edildi.

Elde edilen veriler "RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5." (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programda 2<sup>-ΔΔCT</sup> metodu ile değerlendirildi.

**Tablo-6:** miRNA ekspresyonu için RT-PCR reaksiyonunun hazırlanması

|                                 | 1 reaksiyon |
|---------------------------------|-------------|
| ExiLENT SYBR® Green master mix, | 5 µl        |
| PCR primer mix                  | 1 µl        |
| Dilüe cDNA                      | 4 µl        |
| Toplam hacim                    | 10 µl       |

**Tablo-7:** miRNA ekspresyonu için RT-PCR koşulları

| Aşamalar                            | Sıcaklık (°C) | Süre  |
|-------------------------------------|---------------|-------|
| Polimeraz Aktivasyonu/ Denatürasyon | 95            | 10 dk |
| Amplifikasyon                       | 95            | 10 sn |
| (45 döngü)                          | 60            | 1 dk  |
| Erime eğrisi analizi                | 95            | 1 dk  |
|                                     | 60            | 2 dk  |
|                                     | 95            | ∞     |

#### 4.2.6 RT-PCR Tabanlı MikroRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

RT-PCR Analizi, negatif kontrolleri de kapsayacak şekilde gerçekleştirildi. miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar Ct metodu kullanılarak hesaplandı. Referans seviyeleri olarak verilerin normalizasyonu için endojen kontroller olan RNU6 kullanıldı. miRNA ekspresyonları için RT-PCR cihazının yazılım programında örneklerin başlangıç kopya sayısı ve Ct değerleri belirlendi. Ham verilerden elde edilen ortalama Ct değerleri house keeping gen olan RNU6 ile normalize edildi.

#### 4.2.7 Klinik Değerlendirme

Elde edilen miRNA ekspresyon düzeyleri çalışmaya dahil edilen bireylerin yaşı, cinsiyeti, kullandığı immunomodülatör tedavi, çalışmaya kadar geçirdiği toplam atak sayısı, yıllık atak oranları ve hastalığın özürülük düzeyini gösteren genişletilmiş özürülük durum ölçeği; EDSS (Expanded Disability Status Scale) parametreleri ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi (EK-1).

### 4.3 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kan ve gaytadan izole edilen miR-10a, miR-146a ve miR-155 ekspresyon seviyelerindeki değişimler farklı istatistiksel testler kullanılarak hesaplandı. Grupların demografik verileri Mann-whitney Testi ile analiz edildi. Takip süresi ilk tanı tarihi ile numune alım arasındaki süreler dikkate alınarak belirlendi. RRMS, KİS, RİS ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar ve miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların RRMS tanılı hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için Independent Sample T Test, Mann-whitney Test ve Kruskal Wallis Testi uygulandı. Değişkenler arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak açıklamak için ise miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ile hasta gruplarının tamamı Reciever Operator Characteristics Curve (ROC) çözümleme yöntemi ile tanı testi potansiyeli değerlendirildi. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS 17.00 paket programı kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## BULGULAR

### 5.1 Demografik Veriler

Çalışmaya dahil edilen RRMS tanılı 61 hastanın yaşları 20 ile 65 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 39,9, KİS tanılı 15 hastanın ortalama yaşı 31 ve RİS tanılı hastaların ortalama yaşı 35.8 dir. RRMS hastalarına ait takip süresi 2 ay ile 25 yıl arasında değişmektedir. Ortalama takip süresi ise ~7,5 yıldır değerlendirilen tüm hasta gruplarına ait bulgular tablo-8’de, RRMS hastalarına ait özellikler ise tablo-9’da verilmektedir.

**Tablo-8:** Tüm grupların demografik özellikleri

|                   | Kontrol         | RRMS            | KİS            | RİS           |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|
| Hasta sayısı      | 32              | 61              | 15             | 6             |
| Yaş ortalaması    | 36,4 ± 7,3*     | 39,9 ± 9,7*     | 31 ± 6,4*      | 35.8 ± 7,7*   |
| Cinsiyet K/E n(%) | 22(68) / 10(32) | 47(77) / 14(23) | 11(73) / 4(27) | 3(50) / 3(50) |

**Tablo-9:** RRMS grubu demografik özellikleri

| Hasta sayısı (%)   |                          |          |
|--------------------|--------------------------|----------|
| Cinsiyet           |                          |          |
| Erkek              | n: 14(23)                |          |
| Kadın              | n: 47(77)                |          |
| Tanı alma yaşı     |                          |          |
| <20 yaş            | Ortalama<br>32,47 ± 9,03 | n:4(6)   |
| 20-40 yaş          |                          | n:46(75) |
| >40 yaş            |                          | n:11(19) |
| Takip süresi       |                          |          |
| 0-5 yıl            | Ortalama: 75<br>(2-300)  | n:25(40) |
| 5-10 yıl           |                          | n:18(30) |
| >10 yıl            |                          | n:18(30) |
| Toplam atak sayısı |                          |          |
| 1-2                | n:22(36)                 |          |
| 3-5                | n:26(43)                 |          |

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| >5                           | n:13(21) |
| <b>Yıllık atak oranı</b>     |          |
| <0,5                         | n:29(54) |
| 0,5-1                        | n:18(33) |
| >1                           | n:7(13)  |
|                              | n:8**    |
| <b>EDSS</b>                  |          |
| 0-2                          | n:24(39) |
| 2,5-4,5                      | n:28(46) |
| >4,5                         | n:9(15)  |
| <b>İmmunmodülatör Tedavi</b> |          |
| Interferon β-1               | n:19(44) |
| Glatiramer Asetat            | n:13(30) |
| Fingolimod                   | n:7(16)  |
| Natalizumab                  | n:4(9)   |
| Diğer                        | n:19***  |

\* Standart sapma \*\* Bir yılı doldurmamış hastalar grup içine dahil edilmemiştir. \*\*\* Diğer immün modülatör tedavi alanlar grup içine dahil edilmemiştir. (teriflunamid, dimetrlfumarat, alemtuzumab, mitoxantrone vs.)

## 5.2 MikroRNA Ekspresyon Ortalamaları

61 RRMS, 15 KİS, 6 RİS ve 32 sağlıklı kontrol grubundan elde edilen kan ve gayta materyellerinin değerlendirildiği çalışmamızda kandan elde edilen sonuçlarımız tablola-10-14'te verilmiştir. Gaytadan elde edilen ekspresyon sonuçları miRNA ekspresyonunun feçes materyali için çok düşük olması nedeniyle ileri analizlere ihtiyaç duyulduğundan bu çalışmamıza eklenmemiştir. Detaylı bilgi tartışma kısmında açıklanmıştır.

**Tablo-10:** Tüm grupların miRNA ekspresyon Ct değerleri ve standart sapmaları

|          | Ortalama Delta(Ct) |       |        |        | Standart Sapma |       |       |       |
|----------|--------------------|-------|--------|--------|----------------|-------|-------|-------|
|          | Kontrol            | RRMS  | KİS    | RİS    | Kontrol        | RRMS  | KİS   | RİS   |
| mir-146a | -2,614             | 0,56  | -0,695 | -2,26  | 3,242          | 3,004 | 3,296 | 1,914 |
| mir-10a  | 5,993              | 8,909 | 9,114  | 8,431  | 3,92           | 4,443 | 4,206 | 2,33  |
| mir-155  | -3,064             | 1,052 | -0,189 | -1,568 | 3,576          | 3,211 | 3,195 | 2,202 |

**Tablo-11:** Tüm grupların miRNA ekspresyon ortalama 2<sup>-DeltaCt</sup> değerleri

|          | 2 <sup>^(-Ort.(DeltaCt))</sup> |          |          |          |
|----------|--------------------------------|----------|----------|----------|
|          | Kontrol Grup                   | RRMS     | KİS      | RİS      |
| mir-146a | 6,123579                       | 0,678302 | 1,619259 | 4,789915 |
| mir-10a  | 0,015696                       | 0,002079 | 0,001804 | 0,002896 |
| mir-155  | 8,366867                       | 0,482051 | 1,140237 | 2,965619 |

**Tablo-12: RRMS Alt Grup miRNA Ekspresyon Ortalamaları**

|      |                    |                   | Ortalama 2 <sup>-ΔCT</sup> |         |         |
|------|--------------------|-------------------|----------------------------|---------|---------|
|      |                    |                   | miR-146a                   | miR-10a | miR-155 |
| RRMS | Tanı Yaşı          | <20               | 0,4                        | 0,18    | 0,23    |
|      |                    | 20-40             | 0,28                       | 0,10    | 0,12    |
|      |                    | >40               | 0,05                       | 0,06    | 0,03    |
|      | Takip süresi       | 0-5 yıl           | 8,07                       | 0,24    | 6,27    |
|      |                    | 5-10 yıl          | 18,17                      | 0,23    | 15,04   |
|      |                    | >10 yıl           | 5,96                       | 0,23    | 5,88    |
|      | Toplam atak sayısı | 1-2               | 8,89                       | 0,25    | 5,89    |
|      |                    | 3-5               | 0,2                        | 0,33    | 1,28    |
|      |                    | >5                | 31,4                       | 0,02    | 28,5    |
|      | Yıllık atak oranı  | <0,5              | 6,21                       | 0,27    | 6       |
|      |                    | 0,5-1             | 17,5                       | 0,03    | 13,98   |
|      |                    | >1                | 3,44                       | 0,004   | 2,21    |
|      | EDSS               | 0-2               | 5,45                       | 0,02    | 4,14    |
|      |                    | 2,5-4,5           | 16,17                      | 0,35    | 12,37   |
|      |                    | >4,5              | 5,83                       | 0,46    | 9,74    |
|      | Kullanılan ilaç    | Interferon β-1a   | 5,02                       | 0,11    | 4,92    |
|      |                    | Glatiramer Asetat | 9,3                        | 0,32    | 6,91    |
|      |                    | Fingolimod        | 0,6                        | 0,04    | 0,72    |
|      |                    | Natalizumab       | 80,8                       | 0,06    | 66,5    |

### 5.3 RRMS, KİS, RİS ve Kontrol Grubu Tanımlayıcı Verileri ve Anlamlılık Değerleri

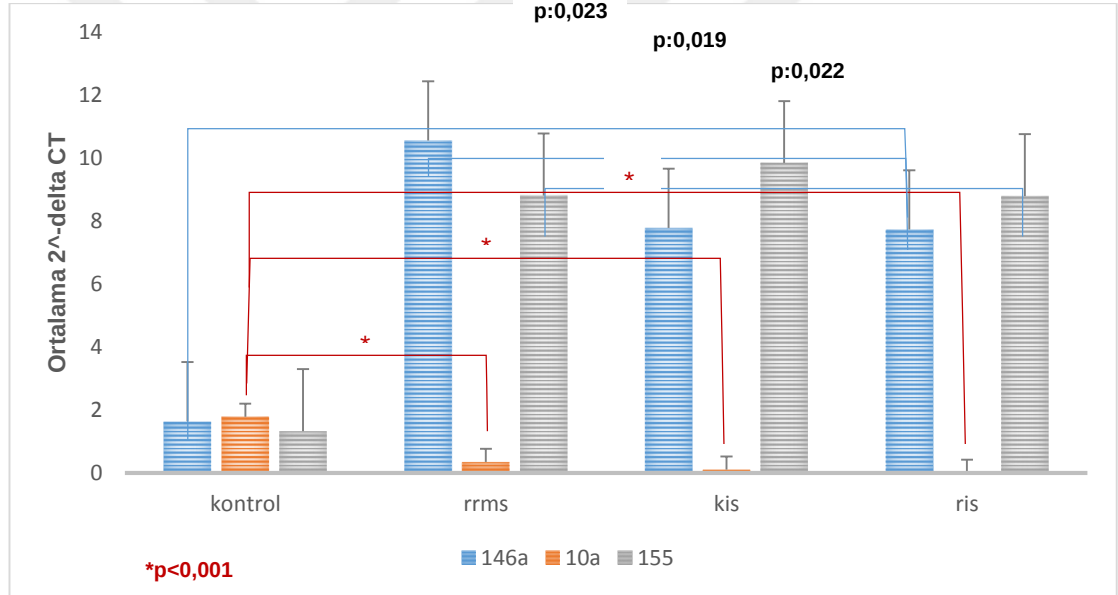
**Tablo-13: Tanımlayıcı veriler**

|                |                    | miR-146a               | miR-10a                 | miR-155                 |
|----------------|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>RRMS</b>    | Median (Min.-Max.) | 0,47<br>(0,014-321,79) | 0,001<br>(0,00001-5,89) | 0,373<br>(0,003-265,02) |
| <b>KİS</b>     | Median (Min.-Max.) | 2<br>(0,02-30,9)       | 0,002<br>(0,00001-1,5)  | 0,87<br>(0,05-75,58)    |
| <b>RİS</b>     | Median (Min.-Max.) | 5,94<br>(0,47-24,42)   | 0,003<br>(0,0003-0,038) | 2,17<br>(0,52-35,75)    |
| <b>KONTROL</b> | Median (Min.-Max.) | 0,86                   | 1,02                    | 1,13                    |

|  |       |               |               |                |
|--|-------|---------------|---------------|----------------|
|  | Max.) | (0,0064-22,1) | (0,003-44,94) | (0,0031-24,59) |
|--|-------|---------------|---------------|----------------|

**Tablo-14:** Anlamlılık değerleri

|              |          | miR-146a | miR-10a | miR-155 |
|--------------|----------|----------|---------|---------|
| RRMS-Kontrol | p değeri | 0,775    | <0,001  | 0,555   |
| KİS-Kontrol  | p değeri | 0,178    | <0,001  | 0,584   |
| RİS-Kontrol  | p değeri | 0,023    | <0,001  | 0,172   |
| RRMS-KİS     | p değeri | 0,146    | 0,924   | 0,173   |
| RRMS-RİS     | p değeri | 0,019    | 0,513   | 0,022   |
| KİS-RİS      | p değeri | 0,302    | 0,494   | 0,205   |



**Şekil-15:** 2<sup>-ΔCT</sup> değerlerine göre tüm grupların karşılaştırılması

## 5.4 Klinik Özelliklere Göre Analizler

**Tablo-16:** Gruplar arası anlamlılık değerleri

|      |              | miR-146a | miR-10a | miR-155 |
|------|--------------|----------|---------|---------|
| RRMS | Cinsiyet     | 0,81     | 0,096   | 0,764   |
|      | Takip süresi | 0,011    | 0,938   | 0,010   |
|      | Tanı yaşı    | 0,015    | 0,501   | 0,031   |
|      | Atak Sayısı  | 0,037    | 0,311   | 0,046   |

|            |                               |       |       |       |
|------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
|            | Yıllık atak oranı             | 0,385 | 0,308 | 0,290 |
|            | EDSS                          | 0,896 | 0,585 | 0,856 |
|            | İmmunomodülatör ilaç tedavisi | 0,720 | 0,817 | 0,832 |
| <b>KİS</b> | Cinsiyet                      | 0,665 | 0,456 | 1     |
| <b>RİS</b> | Cinsiyet                      | 0,418 | 0,456 | 0,487 |

**Tablo-17:** RRMS alt gruplar arası anlamlılık değerleri

| RRMS |              |                     | miR-146a     | miR-155      |
|------|--------------|---------------------|--------------|--------------|
|      | Takip süresi | 0-5 yıl -- 5-10 yıl | <b>0,005</b> | <b>0,004</b> |
|      |              | 0-5 yıl -- >10 yıl  | 0,649        | 0,631        |
|      |              | 5-10 yıl -- >10 yıl | <b>0,017</b> | <b>0,020</b> |
|      | Tanı yaşı    | <20 -- 20-40        | 0,457        | 0,457        |
|      |              | <20 -- >40          | <b>0,026</b> | <b>0,026</b> |
|      |              | 20-40 -- >40        | <b>0,008</b> | <b>0,018</b> |
|      | Atak sayısı  | 1-2 -- 3-5          | 0,438        | 0,501        |
|      |              | 1-2 -- >5           | 0,098        | <b>0,045</b> |
|      |              | 3-5 -- >5           | <b>0,007</b> | <b>0,020</b> |

61 RRMS, 15 KİS, 6 RİS tanılı toplam 82 hastanın ve herhangi bir tanısı olmayan 32 sağlıklı hastanın total kan materyalinde RNA izolasyonları tamamlandıktan sonra 3 miRNA'nın ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular hastalara ait klinik özellikler karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Değerlendirilen hasta gruplarının dağılımları tablo-17'de verildi. İstatistiksel analizler gerçekleştirilmeden önce RRMS, KİS ve RİS hastalarına ait herbir sonuç sağlıklı kontrol grubu ekspresyonları ele alınarak normalize edildi.

Yapılan istatistiksel sonuçlarda RRMS, KİS, RİS ve Kontrol grubu arasındaki değişimin anlamlılığı U6 kontrolü ile normalize edilen  $2^{-\Delta CT}$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre RRMS, KİS, RİS grupları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmalı değerlendirildiğinde miR-10a ekspresyonunda ( $p<0,001$ ), RİS ve RRMS ( $p=0,019$ ) veya sağlıklı kontrol ( $p=0,023$ ) grubu arasında miR-146a ekspresyonunda ve RRMS ve RİS grubu arasında ( $p=0,022$ ) miR-155 ekspresyonunda anlamlı olarak

disregülasyon saptandı. RRMS alt grupları değerlendirildiğinde ise takip süreleri, tanı yaşı ve atak sayıları ile miR-146a ve miR155 ekspresyonlarında anlamlı disregülasyon saptanırken, cinsiyet, yıllık atak oranı, EDSS, immunomodülatör ilaç tedavisine göre gruplar içinde her üç miRNA içinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Alt gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde tanı alma süresi ilk 5 yıl içinde olan hastaların miRNA ekspresyonlarında herhangi bir fark bulunmazken 5-10 yıl arası takip süresinde miR-146a ve miR-155 için anlamlı disregülasyonun geliştiği ancak 10 yıldan daha uzun süreçte bu anlamlılığın kaybolduğu gözlemlendi. 20 yaşından daha erken veya 20-40 yaş arasında tanı alan hastaların miRNA ekspresyonlarında anlamlı farklılık gözlemlenmezken, ileri yaşta gelişen yani 40 yaş sonrası tanı alan RRMS olgularında miR-146a ve miR-155 ekspresyonlarında anlamlı disregülasyon saptandı. Son olarak ise atak sayıları ile yapılan değerlendirmede hastalık süresi boyunca toplam beşten fazla atak geçirmiş olan hasta grubunda özellikle miR-155 'te belirgin olmak üzere miR-155 ve miR-146a ekspresyonlarında anlamlı düzeyde disregülasyon saptandı.

## 5.5 ROC Analizleri

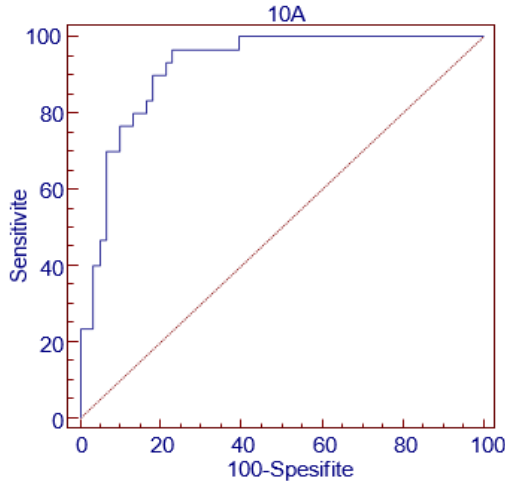
Gruplar arasında miRNA ekspresyon değişimlerinde anlamlılık saptanan gruplar arası farklılıkların biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirebilmek için ROC analizi yapıldı.

**Tablo-18:** ROC analizi yapılan anlamlılık değerleri

|                     |          | <b>miR-146a</b> | <b>miR-10a</b>   | <b>miR-155</b> |
|---------------------|----------|-----------------|------------------|----------------|
| <b>RRMS-Kontrol</b> | p değeri |                 | <b>&lt;0,001</b> |                |
| <b>KİS-Kontrol</b>  | p değeri |                 | <b>&lt;0,001</b> |                |
| <b>RİS-Kontrol</b>  | p değeri | <b>0,023</b>    | <b>&lt;0,001</b> |                |
| <b>RRMS-RİS</b>     | p değeri | <b>0,019</b>    |                  | <b>0,022</b>   |

Yapılan analizler sonucunda miR-10a'nın RİS, KİS ve RRMS her üç grupta da kontrollerle ayırırda yüksek düzeyde ( $p<0,0001$ ), miR-146a'nın RRMS-RİS ve RİS-Kontrol gruplarının ayırırında ( $p<0,001$   $p=0,0046$ ) biyobelirteç olabilecek potansiyelde anlamlılık düzeyinin olduğu ancak miR-

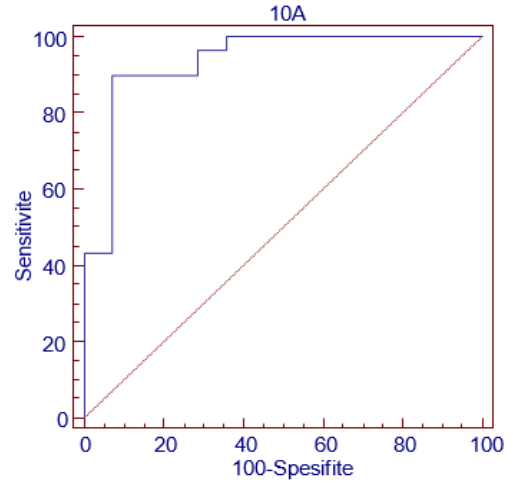
155'te RRMS-RİS grupları arasında gözlemlenen disregülasyon farkının biyobelirteç olarak anlamlı olmadığı saptandı.



A **RRMS-KONTROL**

Sensitivite: 96,67 Spesifite: 77,05

\*AUC:0,920 p<0,0001

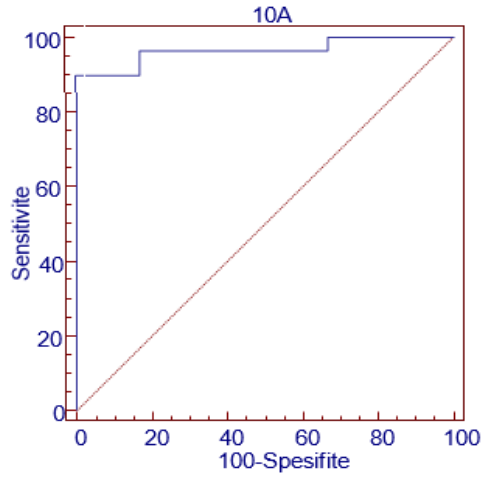


B **KİS-KONTROL**

Sensitivite: 90 Spesifite: 92,86

AUC:0,936 p<0,0001

\*AUC: Eğri altında kalan alan

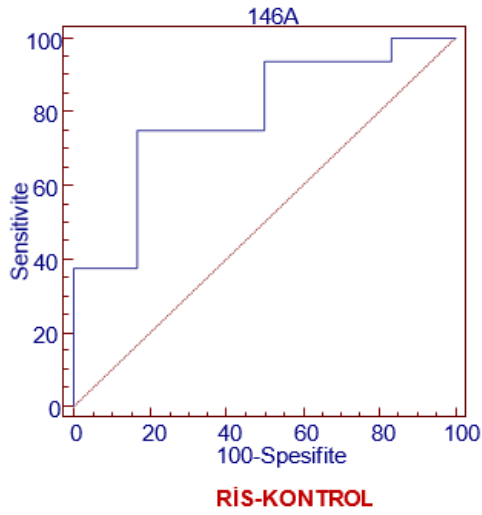


C **RİS-KONTROL**

Sensitivite: 90 Spesifite: 100

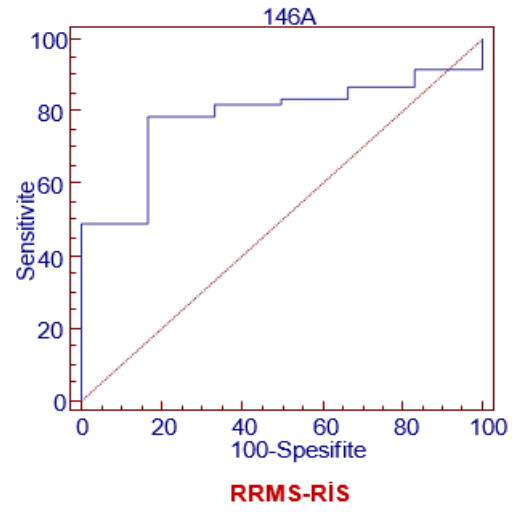
AUC:0,967 p<0,0001

**Şekil-16:** miR-10a'nın tüm gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları. A: RRMS-Kontrol, B: KİS-Kontrol, C: RİS-Kontrol grubu arası



Sensitivite: 75 Spesifite: 83

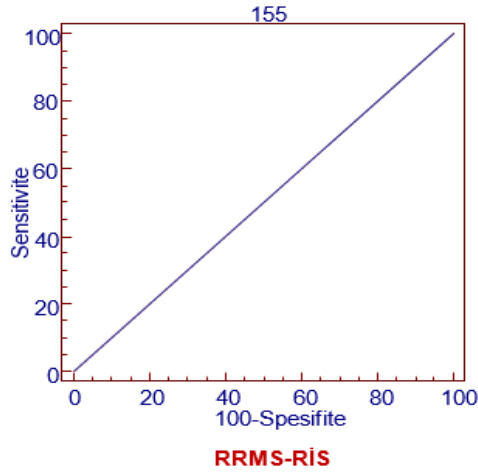
AUC:0,792 p:0,0046



Sensitivite: 78,69 Spesifite: 83,3

AUC:0,797 p<0,0001

**Şekil-17:** miR-146a'nın RİS grubu ile sağlıklı kontrol grubu ve RRMS grubu arasındaki anlamlı farklılıkları



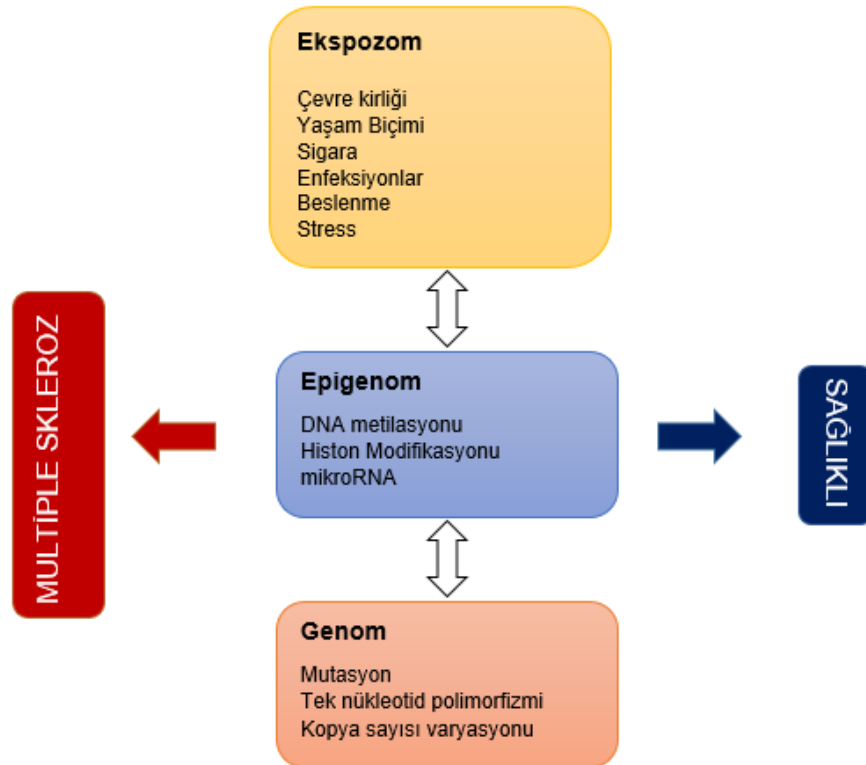
p:1

**Şekil-18:** miR-155 ile anlamlı fark gözlemlenmemiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Multiple Skleroz (MS) santral sinir sistemini tutan, optik sinir, beyin ve omurilikte enflamasyon ve demiyelinizasyonun neden olduğu ataklar ve/veya progresyon ile seyreden, multifaktöriyel etyopatogenezi olan ve sıklıkla genç erişkin nüfusu etkileyen kronik bir hastalıktır (1).

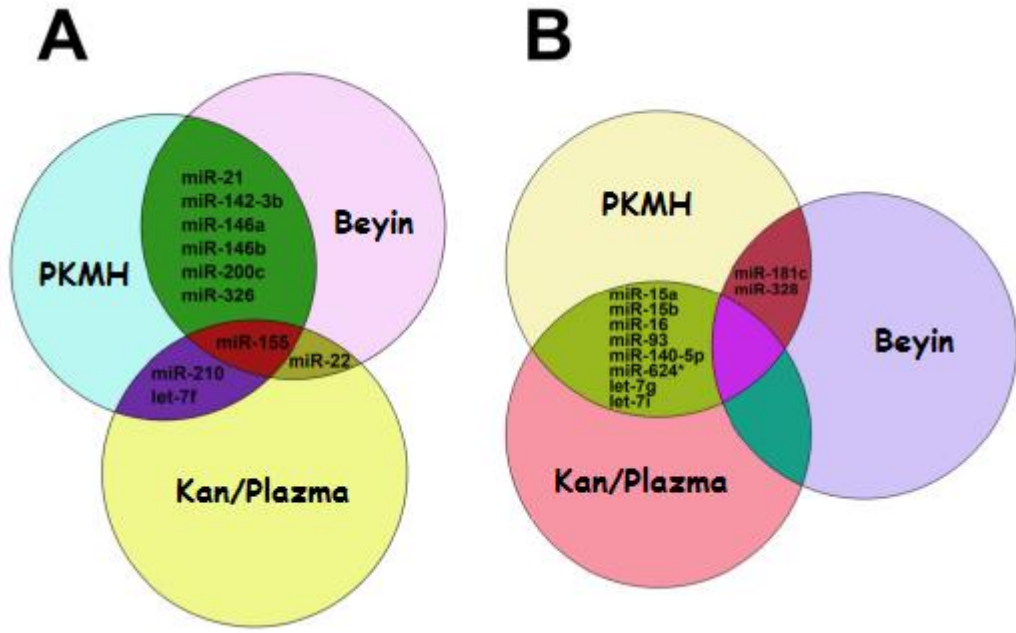
Multiple skleroz etiyolojisi multifaktöriyeldir. Otoimmunité, genetik faktörler, D vitamini, sigara ve geçirilmiş EBV enfeksiyonunun etyolojide rol aldığı birçok çalışmada belirtilmiştir. Hastalığın etyopatogenezinde, muhtemelen çevresel uyaran (örn; enfeksiyon), yatkınlık genleri (nöroinflamasyona yatkınlık sağlayan genlere sahip bireyler) ve belirleyici genler (yatkın bireylerdeki hastalık fenotipi) arasındaki etkileşimler rol oynamaktadır. Ayrıca miRNA aracılı gen düzenlenmesi gibi epigenetik mekanizmalar ise bireydeki hastalığa yatkınlığı ve hastalık şiddetini belirleyebilmektedir.



**Şekil-19:** Multiple Skleroz gelişimi ile ilişkili faktörler

miRNA, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu gerçekleştiren, genomun posttranskripsiyonel basamakta ekspresyonunu etkileyen, kodlama fonksiyonu olmayan yani protein translasyonu yapmayan, ortalama 22 nükleotid büyüklüğünde, esas olarak tek iplikli gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan fonksiyonel bir RNA türüdür (62). İnsan genlerinin %30'undan fazlasını düzenleme yeteneğine sahiptirler.

miRNA'lar ile ilgili otoimmün hastalıkların etyopatogenezinde yapılan çalışmalar yıllar içinde artmakta olup multiple skleroz gelişimi ile ilgili miRNA çalışması ülkemizde ve dünyada oldukça az sayıdadır. Yapılan çalışmalarda materyal olarak serum ve plazmada (183-186), periferik kan mononükleer hücrelerinde (183,187-189), CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde (190)(191)(156), B lenfositlerde (192,193), serebral beyaz cevher lezyonlarında, hipokampüste (150,194,195) tanı almış insanlar ve laboratuvar ortamında DOE geliştirilen hayvanlarda (196,155) incelenmiş ve ekspresyonlarında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu konudaki çalışmalarda yeni nesil sekanslama teknikleri (183), mikroarray analizler (184), PCR array analizleri (185), gerçek zamanlı PCR çalışması (144) gibi geliştirilen çalışma yöntemleri uygulanmış ve farklı miRNA'ların keşfi ve görevlerinin daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. Bu çalışmaların büyük bir kısmında periferik inflamasyon ile ilişki üzerinde durulduğundan materyal olarak mononükleer hücreleri veya izole lenfosit alt grupları kullanılmıştır. Biz çalışmamızda RRMS gelişimi ile miRNA'lar arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek, non invaziv biyobelirteç potansiyelini değerlendirebilmek, barsak florası değişimlerinin gelişen inflamasyon ile ilişkili olup olmadığını ve hastalık progresyonu ile ilişkisini saptayabilmek için klinik pratikte kullanım daha kolay olan tam kan ve gaytadan qRT-PCR analiz tekniği ile miRNA ekspresyon düzeylerini değerlendirdik.



**Şekil-20:** MS hastalarının kan, plazma, pkmh ve beyin dokularında disregülyasyonu saptanan miRNA'lar. A: Up-regülyasyon, B: Down-regülyasyon (128).

Çalışmamızda McDonald 2017 revize kriterlerine göre 61 RRMS, 15 KİS, 6 RİS tanılı olgu ve 32 sağlıklı kontrol grubu değerlendirilmiştir. RRMS tanılı olgularımızın seçiminde, hastalığın relaps döneminde olması, özellikle kortikosteroidler başta olmak üzere anti inflamatuvar, immunsüpresif ve antibiyotik tedavisi etkisinde olunmasının miRNA ekspresyon düzeylerini değiştirebileceğinden (197) son 40 gün içinde atak öyküsünün olmaması ve belirtilen tedavileri almamış olması dikkate alınmıştır. Olgularımızın demografik özellikleri cinsiyet ayrımı açısından literatür ile uyumlu olup kadın/erkek cinsiyet oranı 3,35 (47/14)'tir. Yine benzer şekilde hastalığın başlangıç yaşı literatür ile uyumlu olarak çoğunlukla 20-40 yaşları arasındadır (%75)(9). Tanı sonrası takip süreleri ise benzer dağılımda olup ilk 5 yıllık tanı süresinde olan hasta grubumuz diğer gruplara göre bir miktar fazladır(%40). Mevcut dönemde kullanılan İmmunmodülatör tedavilere baktığımızda ise 1. basamak tedavi (interferon-beta 1, Glatiramer Asetat) alan hasta sayımız diğer gruplara göre yine literatürle uyumlu olarak daha fazladır(%74) (46).

Multiple skleroz gelişimi ile ilişkili miRNA çalışmalarında bir çok miRNA incelenmiş olup; özellikle miR-155, miR-146a ve miR-326

disregülasyonlarının, periferik inflamasyonun santral sinir sistemine yansımalarındaki rollerine vurgu yapılmıştır. Birkaç çalışmada ise özellikle miR-155'in bu açıdan bir biyobelirteç olabileceği üzerinde durulmuştur. Çalışmamızda Multiple skleroz gelişiminde inflamasyon ve nörodejenerasyonla ilişkilendirilen miR-155 ve miR-146a ve ayrıca bu hasta grubunda daha önce çalışması olmayan ancak farelerde santral sinir sisteminde BDNF-TrkB sinyal yolağı ile hipokampal nöronlarda remodeling ve nöronal hücre proliferasyonu ve apoptoziste görev alarak Alzheimer hastalığının patogeneğinde rol aldığı gösterilen (160), mikrobiota ve immun sistem ilişkisi birkaç çalışmada vurgulanan ve ayrıca farelerde beyin sapı ve medulla spinaliste daha fazla eksprese olduğu gösterilen (90) miR-10a değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda bu üç miRNA'nın tercih edilme sebebi özellikle mikrobiotadan kaynaklı gastrointestinal, hematopoetik ve immun sistem arasındaki etkileşimlerde farklı yollar üzerinden etkin rol almalarıdır (80,170).

Tam kandan elde edilen ekspresyon verilerimizi değerlendirdiğimizde; RRMS, KİS ve RİS tanılı hastalardan elde edilen miR-146a ve miR-155 ekspresyon düzeyleri ile sağlıklı kontrol grubundan elde edilen ekspresyon oranları karşılaştırıldığında miR-146a ve miR-155'te gruplar arası herhangi bir ilişki saptanmazken miR-10a ekspresyonunun sağlıklı gruplara göre cinsiyetten bağımsız olarak oldukça anlamlı düzeyde disregülasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Multiple Skleroz kliniğinde veya gelişim basamaklarında, miR-10a ilişkisi ile ilgili literatürde herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın özgün değeri yüksektir. Radyolojik İzole Sendrom tanılı olgularımın sayısının az olmasına karşın (n:6) hem RİS hem KİS hemde RRMS tanılı hastalarımızdan elde edilen miR-10a ekspresyonlarının sağlıklı kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermesi, ancak RRMS tanılı olgularımızda klinik özellikleri ile karşılaştırmalı değerlendirmemizde miR-10a ekspresyon düzeylerinde herhangi bir değişim gözlemlenmemesi bu disregülasyonun hastalığın gelişimi ile ilişkili basamaklarda görev aldığını ancak hastalığın progresyonu ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca her üç hasta grubu ile yapılan diğer

analizlerde miR-10a'nın disregüle saptanmasının bu açıdan non invaziv biyobelirteç potansiyeli olduğunu düşündürmektedir. Ancak literatürde miR-146a ve miR-155 ile yapılan çalışmalarda her ikisinin de normale göre disregüle saptandığı özellikle T lenfosit alt gruplarında, periferik mononükleer hücrelerinde ve beyin lezyonlarında saptanmış olup çalışmamızda bu disregülasyon gösterilemiştir. Çalışmamızın tam kan materyalinde yapılmış olması ve RRMS tanılı olgularımızın immunmodülatör tedavi alıyor olmalarının bu ekspresyon değişimlerinin farklı olmasını açıklayabilir. Ancak immun modülatör tedavi almayan RİS ve KİS olgularımızda da herhangi bir farklılık olmaması da bu açıklamanın en azından bu gruplarda geçerli olmadığını düşündürmektedir. Bu ifade farkının genetik olarak türk toplumunda veya epigenetik olarak başka faktörlerle oluşabildiğini düşündürmektedir. Bu konunun aydınlatılabilmesi için özellikle ülkemizde tedavi almayan ve farklı tedaviler alan hastaların incelendiği başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

RRMS tanılı hastaların klinik özelliklerine göre saptadığımız her üç miRNA ekspresyonlarında cinsiyet, yıllık atak oranı, EDSS, immunmodülatör tedavi kullanımı ile herhangi anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu konu ile ilgili literatürde benzer şekilde cinsiyet ayrımı olmazken özellikle relaps ve remisyon dönemleri karşılaştırılmış miR-155 ile relaps arasındaki ilişki olduğu belirtilmiştir (198,199). EDSS ile ilgili miRNA yayınları kısıtlı olup biyobelirteç potansiyellerinin de değerlendirildiği yayınlarda farklı miRNA disregülasyonlarının hastalığın progresif sürecinde farklı basamaklarda disregüle saptandığı belirtilmiştir. Çalıştığımız üç miRNA türü bu çalışmada değerlendirilmemiştir (200). Ancak hastalığın şiddeti ile CD4+ Th17 hücre farklılaşması ile ilişkili olduğu ve bu farklılaşmada miR-155'in etkin rol oynadığı belirtilmekte olup, kötü progresyon açısından miR-155 disregülasyonun anlamlı olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (201). Ayrıca DOE ile yapılan çalışmalarda miR-155 ekspresyon düzeylerinin azaltılmasının hastalığın şiddetini azalttığı gösterilmiştir (193). Bu çalışmalarda lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesi saptanan disregülasyon ile hastalığın progresyonunun korelasyonu optimize ettiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda materyal olarak tam kan kullanmış olmamız veya hastalarımızın immunmodölatör tedavi almış olmaları bu farklılığı açıklayabilir.

RRMS tanılı hastalarda değerlendirdiğimiz diğer parametrelerde ise hastalığın süresi, hastalığın gelişim yaşı ve toplam atak sayıları ile miR-146a ve miR-155 arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Hastalığın ilk 5 yılında ve 10 yıldan daha fazla süredir tanısı olan olgularda herhangi bir farklılık saptanmazken 5-10 yıllık süre içerisinde olan hasta grubumuzda anlamlı düzeyde farklılık gözlemledik. Hastalığın progresif dönem uzadıkça ve atak sıklıkları azaldıkça belirtilen miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde normalize olduğu yorumu yapılabilir. Tanı yaşını değerlendirdiğimizde 40 yaşından sonra tanı alan olgularda anlamlı ekspresyon farklılığı gözlemlenmiştir. İleri yaşta gelişen multiple skleroz tablosundaki bu epigenetik değişimin altında multifaktöryel etmenler olabilir. Bu konuda ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Multiple sklerozda kullanılan immunmodölatör tedaviler ile miRNA'lar arasındaki etkileşim ile ilgili literatürde yayın sayısı az, elde edilen veriler kısıtlıdır. İmmunmodölatör tedavilerden GA ve IFN tedavisinin miR-146a ve miR-155 ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri ile ilgili birkaç çalışma mevcuttur. Literatürde miR-10a üzerine etkisini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

İnterferon-beta'lar, anti-viral, anti-proliferatif ve immünmodulator özelliklere sahiptir. Klinik olarak atak sıklık ve şiddetini, radyolojik olarak da yeni plak gelişimini ve lezyon yükünü azaltıcı etkileri gösterilmiştir. IFN- $\beta$  1b ve IFN  $\beta$ -1a olmak üzere iki tip rekombinant insan IFN- $\beta$  ürünü vardır. Enjeksiyon yeri, uygulama sıklığı ve uygulanan doz açısından farklılıklar gösterebilir de her iki IFN  $\beta$ -1a ürününün fiziksel yapısı ve özellikleri özdeşdir. Copolimer adıyla da bilinen Glatiramer asetat (GA) polipeptid yapıda doğal 4 aminoasidin (L-glutamik asit, L-alanin, L-tirozin, L-lizin) sentetik bileşimidir. İmmunomodulator ve nöroprotektif etkileri bildirilmektedir. Klinik olarak atak sıklık ve şiddetini, radyolojik olarak da yeni plak gelişimini ve lezyon yükünü azaltıcı etkileri gösterilmiştir. IFN  $\beta$ -1 tedavisi ile miR-16-5p, miR-342-5p, miR-346, miR-518b, miR-760, let-7a-5p and let-7b-5p, miR-27a-5p, miR-29a-

3p, miR-29b-1-5p, miR-29c-3p, miR-95, miR-149-5p, miR-181c-3p, miR-193a-3p, miR-193-5p, miR-423-5p, miR-532-5p, miR-708-5p ve miR-874 ekspresyon değişimlerini gösteren (202) bir çalışma , miR-155-5p, miR-27a-3p, miR-9-5p ve miR-350-5p ekspresyon ilişkisini inceleyen bir çalışma (203) ve IFN tedavisi, GA tedavisi alan RRMS tanılı hastalarla ve sağlıklı grupların karşılaştırıldığı bir başka çalışma mevcuttur (188). Bu alışmalarda GA tedavisinin miR-146a'da anlamlı değişime yol açarken miR-155 ekspresyonlarında herhangi bir değişimin gözlemlenmediği, IFN tedavisi ile ise her iki miRNA değişimlerinin anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Çalışmamız literatür ile büyük oranda uyumlu olup çalıştığımız miR-146a'nın GA tedavisi ile de herhangi bir değişime uğramadığı saptanmıştır. Ayrıca literatürde çalışılmamış olan miR-10a'da da değişim gözlemlenmemiştir. Ancak bu konu ile ilgili tedavisiz RRMS tanılı hastalarında dahil edildiği daha geniş hasta sayısına sahip çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu alışmalar ileride ayrıca miRNA'ların hastalık gelişiminde hangi immunolojik yolaklarda görevler aldığı ve tedavi hedefinde miRNA'ların bu yolakların düzenlenmesindeki görevlerinin faydaları aydınlatılmış olacaktır.

Fingolimod (FTY720) doğal sfingozinin bir yapısal analogudur. İn vivo sfingozin kinaz ile fosforile olmakta, beş S1P reseptöründen dördüne bağlanarak (S1P1, S1P3, S1P4 ve S1P5) lökosit dolaşımında, nörojenez ve nöral hücre işlevlerinde, endotel hücre işlevlerinde, vazoreğülasyonda ve kardiyovasküler gelişimde rol oynar(204). Fingolimod MS hastalarının dolaşımındaki IL-17 üreten TH17 bellek T-hücre sayısını belirgin olarak azaltır (205). Bu durumda proinflatuar TH17 hücrelerin MSS'ye geçişleri de belirgin olarak azalacaktır. Fingolimod lenfositleri yok etmeden redistribüsyona yol açar. Fingolimod ile ilgili ise literatürde tek yayın olup miR-15b, miR23a ve miR-223 ekspresyon değişimleri incelenmiştir (206). Çalışmamızda fingolimod tedavisi ile diğer tedaviler karşılaştırılmış ancak çalışılan üç miRNA için de anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Natalizumab, adezyon moleküllerini bloke edip aktive lökositin kan beyin bariyerini geçişini engelleyen monoklonal antikor yapıda bir maddedir. FDA ve Sağlık Bakanlığı tarafından MS hastalığında immunomodulator

tedavi olarak onaylanmıştır. Çok aktif durumdaki RRMS hastalarında önerilir. Siklofosfamid neoplastik ve otoimmün hastalıklarda 1966'dan beri kullanılmakta olan alkali özellikte antiproliferatif immünsupressif ajandır. DNA yapısı üzerine direkt etkilidir. İmmün kompedan hücrelerin ölümüne yol açar. Temelde genel immünsupresyona yol açmakla birlikte, immünmodülatör etkilerinden de bahsedilmektedir. Kontrast tutan lezyonu olan yada relapslar ile birlikte hızla kötüleşen MS vakalarında etkilidir. İmmunmodülatör tedaviler ve miRNA arasında ilişki en çok natalizumab'ta incelenmiş olup mir-20b (207), mir-17, mir-126 (208), özellikle B-lenfositlerden eksprese edilen diğer birkaç miRNA (193) ile ilgili çalışma mevcuttur. Diğer bir yönüyle tedavi altındaki hastalarda PML gelişimi açısından polyomavirus'a özgü ve virusun insan immün sisteminde yol açtığı immün değişikliklere reaktif miRNA ekspresyon değişiminin PML gelişimi açısından tanısal önemi olduğu (209-212) ortaya atılmıştır. Ancak literatürde natalizumab tedavisi ile mir-155 ekspresyon değişimleri gösterilen tek çalışma olup (213) miR-146a ve miR-10a ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu alanda da özgündür. Çalışmamızda natalizumab tedavisi ile diğer tedavi grupları arasında her üç miRNA'da da herhangi bir farklılık saptanmamıştır.

Radyolojik İzole Sendrom tanılı hastalar ile sağlıklı kontrol grubumuz arasında miR-146a ekspresyonunda ve RİS tanılı hastalar ve RRMS tanılı hastalar arasında miR-146a ve miR-155 ekspresyonlarında anlamlı disregülasyon saptanmıştır. Ancak RİS tanısının saptadığımız disregülasyonlar ile ilişkisi, bu tanıyı almış hasta sayısının çalışmamızda düşük olmasından dolayı (n=6) anlamlılık düşük olup bu konu ile ilgili daha çok hasta sayısına sahip çalışmaların planlanması öngörülmektedir.

Çalıştığımız her üç miRNA için Multiple Skleroz gelişiminde non invaziv biyobelirteç potansiyeli değerlendirilmiştir. Tüm hasta gruplarımızın sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmasında sadece miR-10a ekspresyonunda anlamlı disregülasyon saptanmış olup MS gelişiminde miR-10a'nın önemli olduğu ve belirteç olma potansiyeli taşıdığını düşünmekteyiz. RRMS grubu hastalarımızın immünmodülatör tedavi alıyor olmaları bu potansiyel değişimi etkileyebileceği düşünülse de tedavi almayan KİS ve RİS grubumuzda da

anlamli düzeyle bu farkın korunmuş olması biyobelirteç potansiyeli açısından miR-10a'nın dikkate değer olduğunu göstermektedir. Ancak miR-146a ekspresyon düzeyinin R S-sağlıklı kontrol grubu ve ilaveten miR-155 ekspresyon düzeyinin de R S-RRMS grubu arasında anlamli disregüle olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Bu değişimlerinde biyobelirteç potansiyeli taşıdığını vurgulamakla beraber R S tanılı olgularımızın sayısının azlığı anlamlılığı azalmaktadır. Bu konuda ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

miRNA'ların keşfedilmesi ve gen ekspresyonunu düzenleme konusundaki kritik rollerinin anlaşılması, genetik mekanizmaların kontrolü hakkında düşünme biçimimizi değiştirmiştir. Son on yıldıki araştırmalar, miRNA'ların hücre gelişimini ve farklılaşmasını nasıl düzenlediğini ortaya koymaktadır. miRNA'ların immün sistem yanıtlarını modüle etmedeki merkezi rolü de fark edilmekle birlikte yanıtlanacak çok sayıda bilinmeyen mevcuttur. Özellikle otoimm nitedeki miRNA'ların işlevleri son birkaç yıldır ilgi konusu olmakta, sirkülasyondaki veya farklı hücrelerdeki ve dokulardaki belirli miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler çeşitli otoimmün koşulları doğurmakta ve muhtemelen hastalık gelişimine katkıda bulunduğu d ş n lmektedir. Bu moleküllerin bir kısmı farklı otoimmün bozukluklara özgü yeni ve çekici biyolojik belirteç olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, işlevsel deneysel çalışmalar, bozuk ifade edilen miRNA'lar ile hastalığın gelişimi arasındaki nedensel ilişkiyi doğrulamak ve oluşturmak için gereklidir. Merkezi sinir sisteminin demiyelinizan, otoimmun, sıklıkla relaps ve remisyonlarla giden progresif bir hastalığı olan multiple skleroz gelişimi ile ilgili bilgilerimiz yıllar geçtikçe artmakta ve dönüşmektedir. Otoimmünite, genetik faktörler, D vitamini, sigara ve geçirilmiş EBV enfeksiyonunun etyolojide rol aldığı birçok çalışmada belirtilmesine rağmen, halen kanıtlanabilmiş otoimmünite süreci netlik kazanamamıştır. Tahminler hastalığın çevresel uyaran, yatkınlık genleri ve belirleyici genler arasındaki etkileşimler sonucu ortaya çıktığını öngörmektedir. Bu epigenetik mekanizmalardaki miRNA'ların rolleri son yıllarda ortaya konulmuştur. miRNA'ların bağışıklık düzenleyici mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve miRNA SNP'lerin haritalanması ve karakterizasyonu, otoimmün koşulların patogenezi aydınlatmanın yanı sıra

immünolojik hastalarda kompleks terapötik yaklaşımların gelişmesine de yardımcı olabilir. Çalışmamız bu alanda özellikle mikrobiota ile MS gelişimi açısından önemli rolleri olabilecek miR-146a, miR-10a ve miR-155 mikroRNA'larının araştırılması, ayrıca hastalığın tanı ve seyrinde miR-10a'nın rolü ve non invaziv biyobelirteç değeri açısından gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dörr J, et al. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-field strength magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol*. 2012;69:739–45.
2. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2013;50:42–8.
3. Friedland RP. Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;349:–62.
4. Béraud D, Maguire-Zeiss KA. Misfolded  $\alpha$ -synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disorders*. 2012;18:17-20.
5. Bodea L-G, Wang Y, Linnartz-Gerlach B, et al. Neurodegeneration by Activation of the Microglial Complement-Phagosome Pathway. *J Neurosci*. 2014;34:8546–56.
6. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*. 2015;77:607–15.
7. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*. 2009;183:6041–50.
8. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. In: *Brain Pathology*. 2007;210–8.
9. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM JJ. *Neurology in clinical practice*. Fifth edition. 2008;1159-87
10. Waxman SG. Membranes, myelin, and the pathophysiology of multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. United States; 1982 ;306:1529–33.
11. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurology*. 2016;36:115–27.
12. Conlon P, Oksenberg JR, Zhang J, Steinman L. The immunobiology of multiple sclerosis: An autoimmune disease of the central nervous system. *Neurobiology of Disease*. 1999;149–66.
13. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, et al. Multiple sclerosis. *Immunological Reviews*. 2005; 208–31.
14. Ebers GC. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*. 1996;155–8.

15. Willer CJ, Dymment DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Maternal-offspring HLA-DRB1 compatibility in multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2005;66:44–7.
16. McElroy JP, Oksenberg JR. Multiple Sclerosis Genetics 2010. *Neurologic Clinics*. 2011;219–31.
17. Zuvich R, Mccauley J, Pericak-Vance M, Haines J. Genetics and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Natl Institutes Heal* 2009;21:328–33.
18. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan S V. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2010;156–66.
19. Correale J, Gaitán MI. Multiple sclerosis and environmental factors: The role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2015;46–55.
20. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: A meta-analysis. *Mult Scler J*. 2013;19:162–6.
21. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. United States; 2004;62:60–5.
22. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. United States; 2006;296:2832–8.
23. Ascherio A, Munger KL, White R, et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol*. United States; 2014;71:306–14.
24. Zahoor I, Haq E. Vitamin D and Multiple Sclerosis: An Update. In: Zagon IS, McLaughlin PJ, editors. *Brisbane (AU)*; 2017.
25. Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain* 2013;136:2298–304.
26. Tremlett H. Epidemiology in multiple sclerosis has had its day: There are no more unanswered questions - No. Vol. 18, *Multiple Sclerosis Journal*. 2012;138–9.
27. Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, et al Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136:3609–17.
28. Akdemir N, Terzi M, Arslan N, Onar M. Prevalence of Multiple Sclerosis in the Middle Black Sea Region of Turkey and Demographic Characteristics of Patients. *Noro Psikiyatr Ars* 2017;54:11–4.

29. Recep Alp, Seren İlhan Alp. Multipl Skleroz Prevelansı: Türkiye'nin Kuzey Doğusunda Epidemiyolojik Saha Çalışması. *Nöro Psikiyatr Arşivi* 2012;49:272–5.
30. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*. 2014;278–86.
31. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72:800–5.
32. Forslin Y, Granberg T, Jumah AA, et al. Incidence of radiologically isolated syndrome: A population-based study. *Am J Neuroradiol*. 2016;37:1017–22.
33. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, et al. Unexpected multiple sclerosis: follow-up of 30 patients with magnetic resonance imaging and clinical conversion profile. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:195–8.
34. Okuda DT, Siva A, Kantarci O, et al. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014;9.
35. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, et al. Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients. *Arch Neurol*. 2009;66:841–6.
36. Miller D, Barkhof F, Montalban X, et al. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol*. 2005;4:281–8.
37. McAlpine D, Compston A. McAlpine's Multiple Sclerosis. In: McAlpine's Multiple Sclerosis. 2005;83–91.
38. Jacobi C, Hähnel S, Martinez-Torres F, et al. Prospective combined brain and spinal cord MRI in clinically isolated syndromes and possible early multiple sclerosis: Impact on dissemination in space and time. *Eur J Neurol*. 2008;15:1359–64.
39. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67:1242–9.
40. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol Elsevier Ltd*; 2012;11:157–69.
41. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292–302.
42. Tintore M, Rovira A, Arrambide G, et al. Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010;75:1933–8.

43. Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, et al. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One*. 2009;4:11.
44. Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, et al. The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PLoS One*. 2010;5:8.
45. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Is Hypovitaminosis D One of the Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis? *Brain* 2010;133:1869–88.
46. Sorensen PS. New management algorithms in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2014;27:246–59.
47. Frank D, St Amand A, Feldman R, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13780–5.
48. Dominguez-Bello MG, Costello EK, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2010;107:11971–5.
49. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* [Internet]. 2009;9:123.
50. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
51. ÇELEBİ G. miRNA Gelişimi. *GATA Gastroenteroloji Bilim Dalı Dergisi* Ankara, 2010;3
52. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*. 2009;139:485–98.
53. Kim D, Zeng MY, Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Exp Mol Med* 2017;49
54. Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* 2017;28:548
55. WHO. Atlas Multiple Sclerosis resources In The World 2008. WHO Press. 2008;56.
56. Swank RL, Lerstad O, Strøm A, Backer J. Multiple Sclerosis in Rural Norway. *N Engl J Med*. 1952;246:721–8.
57. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* . 2008;456:507–10.

58. Esposito S, Bonavita S, Sparaco M, Gallo A, Tedeschi G. The role of diet in multiple sclerosis: A review. *Nutr Neurosci*. Taylor & Francis; 2017;0:1–14.
59. Tarallo S, Pardini B, Mancuso G, et al. MicroRNA expression in relation to different dietary habits: A comparison in stool and plasma samples. *Mutagenesis*. 2014;29:385–91.
60. Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*. 2005;19:1–15.
61. Farr RJ, Joglekar M V, Hardikar AA. Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential Biological Relevance. *Exp Suppl* . 2015;106:215–44.
62. de Faria O, Moore CS, Kennedy TE, Antel JP, Bar-Or A, Dhaunchak AS. MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Front Genet*. 2013;3:1–6.
63. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
64. Lagos-Quintana M. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*. 2001;294:853–8.
65. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15–20.
66. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*. 2012;160:198–206.
67. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clinical Immunology*. 2010;6:1–15.
68. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research*. 2011;157:163–79.
69. Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:116–25.
70. Xu X-M, Zhang H-J. miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World J Gastroenterol*. United States; 2016;22:2206–18.
71. Weissert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013;8:857–66.
72. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.

73. Santegoets KCM, Van Bon L, Van Den Berg WB, Wenink MH, Radstake TRDJ. Toll-like receptors in rheumatic diseases: Are we paying a high price for our defense against bugs? *FEBS Letters*. 2011;585:3660–6.
74. Mogensen TH, Paludan SR. Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *Journal of Molecular Medicine*. 2005;83:180–92.
75. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:12481–6.
76. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)* . 2007;179:5082–9.
77. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med [Internet]*. 2005;201:1367–73.
78. Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, et al. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* . 2005;202:261–9.
79. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, et al. Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B Lymphocyte Lineage. *Cell*. 2008;132:860–74.
80. Runtsch MC, Round JL, Connell RMO. MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. 2014;5:1–10.
81. Honardoost MA, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Etemadifar M, Salehi M. MiR-326 and miR-26a, two potential markers for diagnosis of relapse and remission phases in patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Gene . Elsevier B.V.*; 2014;544:128–33.
82. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2009;106:2735–40.
83. Lu LF, Thai TH, Calado DP, et al. Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein. *Immunity*. 2009;30:80–91.
84. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, et al. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1065–75.
85. Liu Y-J, Fan W-J, Bai J-Z. microRNA-126 expression and its

- mechanism of action in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* . 2015;19:3838–42.
86. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2011;63:535–44.
  87. Tang X, Yin K, Zhu H, Tian J, Shen D, Yi L, Correlation Between the Expression of MicroRNA-301a-3p and the Proportion of Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2016;39:759–67.
  88. Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;15:1171–80.
  89. Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. Vol. 15, *Autoimmunity Reviews*. 2016;15:1171–80.
  90. Bak M, Silahdaroglu A, Møller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* . 2008;14:432–44. 91. Smirnova L, Gr??fe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*. 2005;21(6):1469–77.
  92. Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, et al. Identification of Dynamically Regulated MicroRNA and mRNA Networks in Developing Oligodendrocytes. *J Neurosci* . 2008;28:11720–30.
  93. Kim J, Inoue K, Ishii J, et al. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 2007;317:1220–4.
  94. Kye M-J, Liu T, Levy SF, Xu NL, Groves BB, Bonneau R, et al. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* . 2007;13:1224–34.
  95. Berezikov E, Thuemmler F, Van Laake LW, et al. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet*. 2006;38:1375–7.
  96. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci* . 2013;7.
  97. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010;140:918–34.
  98. Soreq H, Wolf Y. NeurimmiRs: MicroRNAs in the neuroimmune interface. *Trends Mol Med*. 2011;17:548–55.
  99. Tracey KJ. Erratum: Understanding immunity requires more than immunology. *Nature Immunology* 2010;11:561-564
  100. Boulanger LM. Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity. *Neuron*. 2009;64:93–109.

101. Li X, Jin P. Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2010;11:329–38.
102. Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis* . 2011;2011:1–27.
103. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6:393–403.
104. Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10: 837–41.
105. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2010;31:1100–7.
106. Lukiw WJ, Zhao Y, Jian GC. An NF- $\kappa$ B-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem*. 2008;283:31315–22.
107. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci*. United States; 2008;28:14341–6.
108. Haramati S, Chapnik E, Sztainberg Y, et al. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci* . 2010;107:13111–6.
109. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WSJ, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*. 2010;33:607–19.
110. Urduingio RG, Fernandez AF, Lopez-Nieva P, et al. Disrupted microrna expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics*. 2010;5:656–63.
111. Szulwach KE, Li X, Smrt RD, et al. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*. 2010;189:127–41.
112. Asikainen S, Rudgalvyte M, Heikkinen L, et al. Global microRNA expression profiling of caenorhabditis elegans Parkinson's disease models. *J Mol Neurosci*. 2010;41:210–8.
113. Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* . 2009;326:1549–54.
114. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2015;5:9.
115. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol* . 2010;28:445–89.

116. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 Cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011;74:1–13.
117. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH. Circulating immune cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* . 2017;187:193–203.
118. Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci*. 2013;333:76–87.
119. Wu GF, Alvarez E. The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* . 2011 ;29:257–78.
120. Dos Passos GR, Sato DK, Becker J, Fujihara K. Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. Vol. 2016, *Mediators of Inflammation*. 2016.
121. Mesquita D, Cruvinel WM, Câmara NOS, Kállas EG, Andrade LEC. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;42:476–86.
122. Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2008;125:161–9.
123. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol*. 2009;183:5418–27.
124. Haak S, Croxford AL, Kreyenborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, et al. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:61–9.
125. Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G. Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull* . 2010;95:79–104.
126. Meral MİRZA. Multiple Skleroz Etiyopatogenezi Türkiye Klinik J Neurol-Special Top 2017;10:292-9.
127. Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, et al. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* . 2011;504:9–12.
128. Ma X, Zhou J, Zhong Y, et al. Expression, regulation and function of MicroRNAs in multiple sclerosis. *Int J Med Sci*. 2014;11:810–8.
129. Guerau-de-Arellano M, Liu Y, Meisen WH, Pitt D, Racke MK, Lovett-Racke AE. Analysis of miRNA in Normal Appearing White Matter to Identify Altered CNS Pathways in Multiple Sclerosis. *J autoimmune Disord* . 2015;1:1–14.
130. Zhang J, Cheng Y, Cui W, Li M, Li B, Guo L. MicroRNA-155 modulates

- Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2014;266:56–63.
131. Tarassishin L, Loudig O, Bauman A, et al Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155. *Glia.* 2011;59:1911–22.
  132. Xia P, Fang X, Zhang ZH, et al. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions. *Immunol Lett.* 2012;148:151–62.
  133. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, et al. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS One.* 2012;7:9.
  134. Junker A, Krumbholz M, Eisele S, et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain.* 2009;132:3342–52.
  135. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of MicroRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1284–92.
  136. Cui JG, Li YY, Zhao Y, et al. Differential regulation of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF- $\kappa$ B in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2010;285:38951–60.
  137. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 2013;110:11499–504.
  138. Ando Y, Yang GX, Kenny TP, et al. Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- $\beta$  receptor type II mouse. *J Autoimmun.* 2013;41:111–9.
  139. Ahmadian-Elmi M, Bidmeshki Pour A, et al. miR-27a and miR-214 exert opposite regulatory roles in Th17 differentiation via mediating different signaling pathways in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Immunogenetics.* 2016;68:43–54.
  140. Reijerkerk A, Lopez-Ramirez MA, van Het Hof B, et al. MicroRNAs regulate human brain endothelial cell-barrier function in inflammation: implications for multiple sclerosis. *J Neurosci .* 2013;33:6857–63.
  141. Guan H, Singh UP, Rao R, et al. Inverse correlation of expression of microRNA-140-5p with progression of multiple sclerosis and differentiation of encephalitogenic T helper type 1 cells. *Immunology.* 2016;147:488–98.
  142. Tobón KE, Chang D, Kuzhikandathil E V. MicroRNA 142-3p Mediates Post-Transcriptional Regulation of D1 Dopamine Receptor Expression. *PLoS One.* 2012;7:11.

143. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep.* 2009;10:180–5.
144. Zhang J, Cheng Y, Cui W, Li M, Li B, Guo L. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;266:56–63.
145. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56:1733–41.
146. Søndergaard HB, Hesse D, Krakauer M, Sørensen PS, Sellebjerg F. Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2013;19:1849–57.
147. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* [Internet]. 1983;13:227–31.
148. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology.* 2017
149. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2015;161:51–8.
150. Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK. MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity Reviews.* 2012;11:174–9.
151. Keller A, Leidinger P, Lange J, et al. Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. *PLoS One.* 2009;4.
152. Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL. Silencing MicroRNA-155 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2011;187:2213–21.
153. Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2009;10:1252–9.
154. Junker A. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Letters.* 2011;585:3738–46.
155. Zhu S, Pan W, Song X, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- $\alpha$ . *Nat Med.* 2012;18:1077–86.
156. Guerau-De-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, et al. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. In: *Brain.* 2011;3575–86.

157. Jia H, Zhang Z, Zou D, et al. MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS One*. 2014;9.
158. Wang N, Zhou Y, Jiang L, et al. Urinary MicroRNA-10a and MicroRNA-30d Serve as Novel, Sensitive and Specific Biomarkers for Kidney Injury. *PLoS One*. 2012;7.
159. Zhai L, Li Y, Lan X, Ai L. MicroRNA-10a-5p suppresses cancer proliferation and division in human cervical cancer by targeting BDNF. *Exp Ther Med* . 2017;6147–51.
160. Wu B-W, Wu M-S, Guo J-D. Effects of microRNA-10a on synapse remodeling in hippocampal neurons and neuronal cell proliferation and apoptosis through the BDNF-TrkB signaling pathway in a rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol* . 2018;1–12.
161. Ke K, Lou T. MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol Lett*. 2017;14:5994–6000.
162. Khan S, Wall D, Curran C, Newell J, Kerin MJ,. MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. *BMC Cancer* ; 2015;15:1–8.
163. Hussain N, Zhu W, Jiang C, et al. Down-regulation of miR-10a-5p in synoviocytes contributes to TBX5-controlled joint inflammation. *J Cell Mol Med*. 2018;22:241–50.
164. Wang D, Zhai G, Ji Y, Jing H. microRNA-10a Targets T-box 5 to Inhibit the Development of Cardiac Hypertrophy. *Int Heart J* [Internet]. 2017;58:100–6.
165. Mu N, Gu J, Huang T,et al. A novel NF- $\kappa$ B/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Sci Rep* . Nature Publishing Group; 2016;6:20059.
166. Giansanti V, Piscitelli F, Camboni T, et al. Arylthioindoles: Promising compounds against cancer cell proliferation. *Oncol Lett*. 2010;1:109–12.
167. Beech RD, Leffert JJ, Lin A, et al. Stress-related alcohol consumption in heavy drinkers correlates with expression of miR-10a, miR-21, and components of the TAR-RNA-binding protein-associated complex. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38:2743–53.
168. Sun W, Ma Y, Chen P, Wang D. MicroRNA-10a silencing reverses cisplatin resistance in the A549/cisplatin human lung cancer cell line via the transforming growth factor- $\beta$ /Smad2/STAT3/STAT5 pathway. *Mol Med Rep*. 2015;11:3854–9.
169. Jeker LT, Zhou X, Gershberg K, et al. MicroRNA 10a marks regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7:1–8.

170. Luo A, Leach ST, Barres R, Hesson LB, Grimm MC, Simar D. The Microbiota and epigenetic Regulation of T Helper 17 / Regulatory T Cells : in Search of a Balanced immune System. 2017;8:1–14.
171. Li L, Chen XP, Li YJ. MicroRNA-146a and human disease. Vol. 71, Scandinavian Journal of Immunology. 2010;71:227–31.
172. Sinha M, Ghose J, Das E, Bhattacharyya NP. Altered microRNAs in STHdhQ111/HdhQ111cells: miR-146a targets TBP. Biochem Biophys Res Commun. 2010;396:742–7.
173. Saba R, Goodman CD, Huzarewich RLCH, Robertson C, Booth SA. A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. PLoS One. 2008;3(11).
174. Rom S, Rom I, Passiatore G, et al. CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. FASEB J [Internet]. 2010;24:2292–300.
175. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, et al. An emerging player in the adaptive immune response: MicroRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. Blood. 2010;115:265–73.
176. Fernández M, Montalban X, Comabella M. Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: Molecular players. Vol. 225, Journal of Neuroimmunology. 2010;225:5–12.
177. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes, chromosomes & cancer. United States; 2004;39:167–9.
178. Escobar T, Yu CR, Muljo SA, Egwuagu CE. STAT3 Activates miR-155 in Th17 Cells and acts in concert to promote experimental autoimmune uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54:4017–25.
179. Qiu X-K, Ma J. Alteration in microRNA-155 level correspond to severity of coronary heart disease. Scand J Clin Lab Invest [Internet]. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group; 2018;0:1–5.
180. Liua K, Zhaoa K, Wang L, Erlin Sunb. Prognostic value of microRNA-155 in human carcinomas: An updated metaanalysis. Clin Chim Acta 2018;479:171-80
181. Jagot F, Davoust N. Is it worth considering circulating microRNAs in multiple sclerosis? Front Immunol. 2016;7:1–11.
182. Yao R, Ma YL, Liang W, et al. MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1. PLoS One. 2012;7:10.
183. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation

- sequencing. *Mult Scler J*. 2014;20:295–303.
184. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, et al. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One*. 2010;5:8.
  185. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;73:729–40.
  186. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, et al. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2013;19:1938–42.
  187. Søndergaard HB, Hesse D, Krakauer M, Sørensen PS, Sellebjerg F. Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2013;19:1849–57.
  188. Waschbisch A, Atiya M, Linker RA et al. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One*. 2011;6:9.
  189. Yang D, Wang W-Z, Zhang X-M, et al. MicroRNA expression aberration in Chinese patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2014;52:131–7.
  190. Jernås M, Malmeström C, Axelsson M, et al. MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS). *BMC Immunol*. 2013;14:1.
  191. Lorenzi JCC, Brum DG, Zanette DL, et al. miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+T cells of multiple sclerosis relapsing patients. *Int J Neurosci*. 2012;122:466–71.
  192. De Santis G, Ferracin M, Biondani A, et al. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. Elsevier B.V.; 2010;226:165–71.
  193. Sievers C, Meira M, Hoffmann F, et al. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis. Towards a better understanding of treatment effects. *Clin Immunol*. 2012;144:70–9.
  194. Junker A. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. Federation of European Biochemical Societies; 2011;585:3738–46.
  195. Dutta R, Chomyk AM, Chang A, et al. Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR-124 and reduced AMPA receptors. *Ann Neurol*. 2013;73:637–45.
  196. Lescher J, Paap F, Schultz V, et al. MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions. *J*

Neuroimmunol. 2012;246:27–33.

197. Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Ravid R, Matute C. Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2006;21:154–64.
198. Niwald M, Migdalska-Sęk M, Brzezińska-Lasota E, Miller E. Evaluation of Selected MicroRNAs Expression in Remission Phase of Multiple Sclerosis and Their Potential Link to Cognition, Depression, and Disability. *J Mol Neurosci.* 2017;63:275–82.
199. Baulina N, Kulakova O, Kiselev I, et al. Immune-related miRNA expression patterns in peripheral blood mononuclear cells differ in multiple sclerosis relapse and remission. *J Neuroimmunol.* 2018;317:67–76.
200. Regev K, Paul A, Healy B, et al. Comprehensive evaluation of serum microRNAs as biomarkers in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation.* 2016;3:5.
201. Huynh JL, Casaccia P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: Implications for pathogenesis and treatment. *The Lancet Neurology.* 2013;12:195–206.
202. Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, et al. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14:16087–110.
203. 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.
204. Massberg S, von Andrian UH. Fingolimod and sphingosine-1-phosphate--modifiers of lymphocyte migration. *N Engl J Med. United States;* 2006;355:1088–91.
205. Mehling M, Johnson TA, Antel J, Kappos L, Bar-Or A. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011;76.
206. Fenoglio C, De Riz M, Pietroboni AM, et al. Effect of fingolimod treatment on circulating miR-15b, miR23a and miR-223 levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016;299:81–3.
207. Ingwersen J, Menge T, Wingerath B, et al. Natalizumab restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis and reveals a critical role for miR-20b. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2:43–55.
208. Meira M, Sievers C, Hoffmann F, et al. MiR-126: a novel route for natalizumab action? *Mult Scler. England;* 2014 ;20:1363–70.
209. Basnyat P, Virtanen E, Elovaara I, Hagman S, Auvinen E. JCPyV

- microRNA in plasma inversely correlates with JCPyV seropositivity among long-term natalizumab-treated relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2017;23:734–41.
210. Meira M, Sievers C, Hoffmann F, et al. Natalizumab-induced POU2AF1/Spi-B upregulation: A possible route for PML development. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation.* United States; 2016;3:223.
211. Giovannelli I, Martelli F, Repice A, Massacesi L, Azzi A, Giannecchini S. Detection of JCPyV microRNA in blood and urine samples of multiple sclerosis patients under natalizumab therapy. *J Neurovirol.* United States; 2015;21:666–70.
212. Munoz-Culla M, Irizar H, Castillo-Trivino T, et al. Blood miRNA expression pattern is a possible risk marker for natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* England; 2014 Dec;20:1851–9.
213. Mameli G, Arru G, Caggiu E, et al. Natalizumab therapy modulates miR-155, miR-26a and proinflammatory cytokine expression in MS patients. *PLoS One.* 2016;11:1–11.

## EKLER

### EK-1

#### **Genişletilmiş zrllk Durumu Skalası( Expanded Disability Status Scale ‘EDSS’)**

**0.0** Normal nörolojik muayene (Bütün fonksiyonel Sistemlerde (FS) grade 0)

**1.0** zrllk yok, bir FS’ de minimal belirtiler (grade 1)

**1.5** zrllk durumu olmaksızın birden fazla FS’ de minimal bulgular (birden fazla FS grade 1)

**2.0** Bir FS’ de minimal zrllk (Bir FS grade 2, diğerkleri 0 veya 1)

**2.5** İki FS’ de minimal zrllk (İki FS grade 2 diğerkleri 0 veya 1)

**3.0** Bir FS de orta derecede zrllk (bir FS grade 3 diğerkleri 0 veya 1) yada üç veya dört FS’ de hafif zrllk (/dört FS grade 2, diğerkleri 0 veya 1) hasta tamamen ambulatuvar

**3.5** Tam ambulatuvar hasta, bir FS de orta derecede zrllk (bir FS grade 3 ) ve bir veya iki FS grade 3 veya beş grade FS grade 2 (diğerkleri 0 veya 1)

**4.0** Tam ambulatuvar hasta. Bir FS’ de grade 4 (diğerkleri 0 veya 1)’den oluşan göreceli şiddetli zrllk. Hasta günün önemli bir bölümünde yardıma ihtiyaç duymaz. Geri kalan bölümünde hafif bir desteğe gereksinim duyar. Veya nceki basamakların limitlerini açan daha küçük grade’ lerin kombinasyonları. 500 metreden daha uzun mesafeyi yardım almadan ve dinlenmeden yürüyebilir. VIII

**4.5** Günün önemli bir bölümünde yardımsız olarak tam ambulatuvar, geri kısmında minimal düzeyde yardıma gereksinim duyar. Nispeten şiddetli zrllk söz konusudur. Genellikle bir FS grade 4 (diğerkleri 0 veya 1) veya önceki basamakların limitlerini açan daha küçük derecelerin kombinasyonları. Yardım almadan ve dinlenmeden 300 metre yürüyebilir.

**5.0** Yardımsız 200 metre yürüyebilir; zrllk tam günlük aktivitesini bozacak kadar şiddetli (zel nlem olmaksızın tam gün çalışabilme gibi). (genel olarak FS eşdeğerleri tek başına bir FS’ de grade 5, diğerkleri 0 veya 1) yada genellikle 4. basamağın özelliklerini açan daha küçük gradelerin kombinasyonları.

**5.5** Yardımsız veya dinlenmeksizin 100 metre yürüyebilir. zrllk tam günlük aktiviteleri engel olabilecek kadar şiddetli. (genel olarak FS eşdeğerleri bir FS’ de tek başına bir grade 5, diğerkleri 0 veya 1) yada daha önceki basamağın limitlerini açan daha küçük derecelerin kombinasyonları.

**6.0** Yaklaşık 100 metre dinlenerek veya dinlenmeden yürüyebilmek için aralıklı veya tek taraflı sürekli yardım (koltuk değneği, baston vb.) gerektirir (genel FS eşdeğerleri birden çok FS' de 3 veya daha fazla grade kombinasyonu).

**6.5** Dinlenmeden 200 metre yürüyebilmek için sabit iki taraflı destek (koltuk değneği, baston vb.) gerekir (genel FS eşdeğerleri ikiden çok FS' de 3 veya daha fazla grade' de bozukluk kombinasyonları).

**7.0** Yardımla bile 5 metrenin üzerinde yürüyemez, esasen tekerlekli sandalyeye muhtaç; standart tekerlekli sandalyeyi sürebilir ve tek başına yer değiştirebilir; günde 12 saatini tekerlekli sandalyede geçirir (genel FS eşdeğerleri birden fazla FS' de grade 4+ kombinasyonlarıdır; (çok nadiren, tek başına piramidal grade 5).

**7.5** Bir kaç adımdan fazlasını atamaz, tekerlekli sandalyeye bağımlı; yer değiştirmek için yardıma ihtiyacı olabilir; sandalyeyi sürebilir, fakat standart IX tekerlekli sandalyede tüm günü geçiremez, motorlu tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyabilir (genel FS eşdeğerleri birden fazla FS' de grade 4).

**8.0** Esas olarak yatak veya sandalyeye bağımlı yada tekerlekli sandalye ile hareket edebilir, fakat günün çoğunu yatak dışında geçirebilir; birçok işini kendisi görebilir; genellikle kollarını etkin kullanılabilir (genel FS eşdeğerleri birçok sistemde genellikle 4+ grade' lerin kombinasyonları).

**8.5** Günün büyük kısmında yatağa bağımlıdır; kolların bir miktar etkili kullanabilir. Bazı kendine bakma fonksiyonlarını devam ettirebilir (genel FS eşdeğerleri birçok sistemde genellikle grade 4+ kombinasyonları).

**9.0** Ümitsizce yatağa bağımlı; iletişim kurabilir ve yemek yiyebilir (genel FS eşdeğerlerinin çoğu grade 4+ kombinasyonları). **9.5** Tamamen çaresiz yatalak; etkin iletişim kurulamaz yada yiyemez, yutamaz (genel FS eşdeğerleri hemen hepsi grade 4+ kombinasyonları).

**10.0** MS' e bağlı ölüm.

## EK-2

Gaytadan İzole Edilen Rna Konsantrasyonları ile İlgili Nanodrop Ölçümleri

| ÖRNEK ID | Nükleik Asit konsantrasyonu | Ünite  | 260/280 | Örnek Tipi | Faktör |
|----------|-----------------------------|--------|---------|------------|--------|
| Hasta 1  | 10                          | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 2  | 11                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 3  | 41                          | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 4  | 12                          | ng/ µl | 1,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 5  | 16                          | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 6  | 13                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 7  | 13                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 8  | 13,5                        | ng/ µl | 1       | RNA        | 50     |
| Hasta 9  | 14                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 10 | 216                         | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 11 | 15                          | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 12 | 16                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 13 | 17                          | ng/ µl | 1,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 14 | 17                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 15 | 18                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 16 | 18                          | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 17 | 20                          | ng/ µl | 2,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 18 | 20                          | ng/ µl | 1,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 19 | 157                         | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 20 | 22                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 21 | 25                          | ng/ µl | 1,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 22 | 25                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 23 | 28                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 24 | 28                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 26 | 31                          | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 27 | 31                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 28 | 32                          | ng/ µl | 1,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 29 | 34                          | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 30 | 34                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 31 | 35                          | ng/ µl | 1,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 32 | 36                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 33 | 41                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 34 | 42                          | ng/ µl | 1,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 35 | 46                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 36 | 47                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 37 | 48                          | ng/ µl | 2,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 38 | 48                          | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 39 | 49                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 40 | 49                          | ng/ µl | 2,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 41 | 52                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 42 | 188                         | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 43 | 54                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 44 | 58                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 45 | 60                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 46 | 61                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 47 | 62                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 48 | 63                          | ng/ µl | 2,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 49 | 72                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 50 | 120                         | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 51 | 76                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 53 | 80                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 54 | 80                          | ng/ µl | 2,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 55 | 81                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 56 | 86                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 57 | 87                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 58 | 90                          | ng/ µl | 2,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 60 | 90                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 61 | 92                          | ng/ µl | 2,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 62 | 92                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |

|           |     |        |      |     |    |
|-----------|-----|--------|------|-----|----|
| Hasta 63  | 93  | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 64  | 98  | ng/ µl | 1,4  | RNA | 50 |
| Hasta 65  | 100 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 66  | 101 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 67  | 101 | ng/ µl | 1,6  | RNA | 50 |
| Hasta 68  | 104 | ng/ µl | 1,8  | RNA | 50 |
| Hasta 69  | 107 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 70  | 108 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 71  | 111 | ng/ µl | 1,9  | RNA | 50 |
| Hasta 72  | 113 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 73  | 119 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 74  | 120 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 75  | 122 | ng/ µl | 1,8  | RNA | 50 |
| Hasta 76  | 243 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 77  | 136 | ng/ µl | 1,7  | RNA | 50 |
| Hasta 78  | 140 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 79  | 142 | ng/ µl | 1,1  | RNA | 50 |
| Hasta 80  | 150 | ng/ µl | 1,5  | RNA | 50 |
| Hasta 81  | 150 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 82  | 151 | ng/ µl | 1,3  | RNA | 50 |
| Hasta 83  | 154 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 84  | 155 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 85  | 168 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 86  | 169 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 87  | 171 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 88  | 174 | ng/ µl | 1,9  | RNA | 50 |
| Hasta 89  | 178 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 90  | 190 | ng/ µl | 1,5  | RNA | 50 |
| Hasta 91  | 192 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 92  | 195 | ng/ µl | 2,07 | RNA | 50 |
| Hasta 93  | 200 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 94  | 200 | ng/ µl | 1,2  | RNA | 50 |
| Hasta 95  | 205 | ng/ µl | 1,3  | RNA | 50 |
| Hasta 96  | 218 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 97  | 221 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 98  | 221 | ng/ µl | 1,8  | RNA | 50 |
| Hasta 99  | 237 | ng/ µl | 1,9  | RNA | 50 |
| Hasta 100 | 239 | ng/ µl | 2    | RNA | 50 |
| Hasta 101 | 328 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 102 | 358 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 103 | 380 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 104 | 400 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 105 | 412 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 106 | 429 | ng/ µl | 1,9  | RNA | 50 |
| Hasta 107 | 510 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 108 | 578 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 109 | 592 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 110 | 604 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 111 | 659 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |
| Hasta 112 | 681 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 113 | 713 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 114 | 740 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 115 | 740 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 116 | 742 | ng/ µl | 2,2  | RNA | 50 |
| Hasta 117 | 757 | ng/ µl | 2,1  | RNA | 50 |

### EK-3

#### Kandan İzole Edilen Rna Konsantrasyonları ile İlgili Nanodrop Ölçümleri

| ÖRNEK ID | Nükleik Asit konsantrasyonu | Ünite  | 260/280 | Örnek Tipi | Faktör |
|----------|-----------------------------|--------|---------|------------|--------|
| Hasta 1  | 164                         | ng/ µl | 1.9     | RNA        | 50     |
| Hasta 2  | 102                         | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 3  | 50                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 4  | 431                         | ng/ µl | 1.9     | RNA        | 50     |
| Hasta 5  | 475                         | ng/ µl | 1.8     | RNA        | 50     |
| Hasta 6  | 348                         | ng/ µl | 1.3     | RNA        | 50     |
| Hasta 7  | 90                          | ng/ µl | 1.9     | RNA        | 50     |
| Hasta 8  | 78                          | ng/ µl | 2,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 9  | 104                         | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 10 | 645                         | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 11 | 50                          | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 12 | 54                          | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 13 | 355                         | ng/ µl | 1.4     | RNA        | 50     |
| Hasta 14 | 116                         | ng/ µl | 2,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 15 | 108                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 16 | 105                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 17 | 278                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 18 | 278                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 19 | 324                         | ng/ µl | 2.8     | RNA        | 50     |
| Hasta 20 | 213                         | ng/ µl | 1,7     | RNA        | 50     |
| Hasta 21 | 74                          | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 22 | 190                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 23 | 192                         | ng/ µl | 1,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 24 | 404                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 26 | 160                         | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 27 | 337                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 28 | 150                         | ng/ µl | 2,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 29 | 318                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 30 | 248                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 31 | 343                         | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 32 | 254                         | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 33 | 567                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 34 | 56                          | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 35 | 99                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 36 | 174                         | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 37 | 54                          | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 38 | 183                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 39 | 634                         | ng/ µl | 1,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 40 | 50                          | ng/ µl | 1,4     | RNA        | 50     |
| Hasta 41 | 180                         | ng/ µl | 2.0     | RNA        | 50     |
| Hasta 42 | 82                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 43 | 64                          | ng/ µl | 2,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 44 | 67                          | ng/ µl | 1,90    | RNA        | 50     |
| Hasta 45 | 219                         | ng/ µl | 1,3     | RNA        | 50     |
| Hasta 46 | 208                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 47 | 77                          | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 48 | 671                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 49 | 660                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 50 | 167                         | ng/ µl | 1,1     | RNA        | 50     |
| Hasta 51 | 57                          | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 53 | 80                          | ng/ µl | 2,5     | RNA        | 50     |
| Hasta 54 | 488                         | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 55 | 334                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 56 | 95                          | ng/ µl | 2,2     | RNA        | 50     |
| Hasta 57 | 83                          | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |
| Hasta 58 | 58                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 60 | 176                         | ng/ µl | 1,9     | RNA        | 50     |
| Hasta 61 | 132                         | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 62 | 60                          | ng/ µl | 1,6     | RNA        | 50     |
| Hasta 63 | 88                          | ng/ µl | 2       | RNA        | 50     |
| Hasta 64 | 103                         | ng/ µl | 1,8     | RNA        | 50     |

|           |     |        |     |     |    |
|-----------|-----|--------|-----|-----|----|
| Hasta 65  | 311 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 66  | 282 | ng/ µl | 1,8 | RNA | 50 |
| Hasta 67  | 128 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 68  | 161 | ng/ µl | 2,1 | RNA | 50 |
| Hasta 69  | 76  | ng/ µl | 1,5 | RNA | 50 |
| Hasta 70  | 197 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 71  | 51  | ng/ µl | 1,8 | RNA | 50 |
| Hasta 72  | 95  | ng/ µl | 1,6 | RNA | 50 |
| Hasta 73  | 142 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 74  | 226 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 75  | 395 | ng/ µl | 1,4 | RNA | 50 |
| Hasta 76  | 74  | ng/ µl | 1,5 | RNA | 50 |
| Hasta 77  | 94  | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 78  | 97  | ng/ µl | 1,4 | RNA | 50 |
| Hasta 79  | 99  | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 80  | 70  | ng/ µl | 1,7 | RNA | 50 |
| Hasta 81  | 548 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 82  | 254 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 83  | 176 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 84  | 228 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 85  | 80  | ng/ µl | 1,6 | RNA | 50 |
| Hasta 86  | 113 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 87  | 81  | ng/ µl | 2,1 | RNA | 50 |
| Hasta 88  | 281 | ng/ µl | 1,4 | RNA | 50 |
| Hasta 89  | 94  | ng/ µl | 1,8 | RNA | 50 |
| Hasta 90  | 71  | ng/ µl | 1,7 | RNA | 50 |
| Hasta 91  | 315 | ng/ µl | 1,5 | RNA | 50 |
| Hasta 92  | 656 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 93  | 121 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 94  | 100 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 95  | 111 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 96  | 162 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 97  | 115 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 98  | 178 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 99  | 537 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 100 | 300 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 101 | 125 | ng/ µl | 2,1 | RNA | 50 |
| Hasta 102 | 179 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 103 | 525 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 104 | 99  | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 105 | 394 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 106 | 106 | ng/ µl | 1,6 | RNA | 50 |
| Hasta 107 | 133 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 108 | 193 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 109 | 124 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |
| Hasta 110 | 148 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 111 | 101 | ng/ µl | 2,3 | RNA | 50 |
| Hasta 112 | 243 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 113 | 231 | ng/ µl | 1,5 | RNA | 50 |
| Hasta 114 | 220 | ng/ µl | 1,8 | RNA | 50 |
| Hasta 115 | 328 | ng/ µl | 1,8 | RNA | 50 |
| Hasta 116 | 103 | ng/ µl | 2   | RNA | 50 |
| Hasta 117 | 238 | ng/ µl | 1,9 | RNA | 50 |

## TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince ilgi, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen proje yürütüsü ve tezimin ilk danışmanı olan Doç. Dr. Özlem TAŞKAPILIOĞLU'na; güncel tez danışmanım Prof.Dr.Mehmet ZARİFOĞLU'na; tez sürecimde ortak çalışma prensibi ve özveri ile çalıştığımız özellikle Prof.Dr.Gülşah ÇEÇENER, Y.L.Öğr. Havva TEZCAN ve Tıbbi Biyoloji A.B.Dalı diğer çalışanlarında; uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan hocalarım Prof. Dr. İbrahim BORA, Prof. Dr. Ö. Faruk TURAN, Prof. Dr. Mustafa BAKAR, Prof. Dr. Necdet KARLI, Doç. Dr. Sevda ERER ÖZBEK'e ; sadece tez çalışmamda değil; dört yıl boyunca gece gündüz demeden, herkes ve her şey için telefonun hemen diğer ucunda olan Uzm. Dr. Aylin BİCAN DEMİR'e; tez çalışmama olan katkıları sebebiyle bölümümüzün değerleri hemşireleri Mergül ÇAVUŞOĞLU ve Nilgün TUNA'ya; birlikte çalışmanın onurunu yaşadığım Uzm.Dr.Dursun CEYLAN ve diğer özverili araştırma görevlisi arkadaşlarıma; Nöroloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hemşire, psikolog, teknisyen, tıbbi sekreter ve personelin şahsında çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

07/03/1989 Giresun-Espiye doğumluyum. İlköğrenimimi Erzurum ve Bursa'da 1994-2002 yılları arasında farklı ilköğretim okullarında tamamladım (Atatürk İlkokulu, Altıparmak İlköğretim Okulu, Hocailyas İlköğretim Okulu, İlbahar İlköğretim okulu). Lise öğretimimi Bursa Ali Osman Sönmez Fen lisesinde 2002 yılında tamamladım. Aynı sene Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde lisans öğrenimime başladım. İngilizce hazırlık ile birlikte toplam 7 yıllık lisans eğitimi sonrası 2012 yılında mezun oldum. Hakkari ili Şemdinli İlçe Devlet Hastanesi Acil Servisi ve Kütahya ili Domaniç Toplum Sağlığı Merkezi'nde devlet hizmet yükümlülüğü görevimi yaptım. 2013 yılı sonbahar dönemi tıpta uzmanlık sınavı yerleştirmesi ile Uludağ Üniversitesi Tıp fakültesi hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım.