

FERHAT GÜZEL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

**YÜKSEK LİSANS
TEZİ**

İSTANBUL-2015

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KUPRİZON İLE OLUŞTURULAN MS MODELİNDE,
AMPA ANTAGONİSTİ PERAMPANELİN ETKİLERİNİN
ARRAY TABANLI GEN EKSPRESYONU İLE TAYİNİ**

FERHAT GÜZEL

**DANIŞMAN
PROF.DR.ZELİHA YAZICI**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Lisansüstü Programında Ferhat GÜZEL tarafından hazırlanan Kuprizon ile Oluşturulan MS Modelinde, AMPA Antagonisti Perampanelin Etkilerinin Array Tabanlı Gen Ekspresyonu ile Tayini başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 04 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. A. Gökhan AKKAN İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Zeliha YAZICI (Danışman) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Atilla KARAALP Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
4.	
5.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



FERHAT GÜZEL

İTHAF

Ailem Tuncer, Fatma ve Duygu Güzel'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu uzun süreçte gösterdiği sabır, ilgi ve vermiş olduğu değerli bilgilerden dolayı danışmanım Prof.Dr.Zeliha YAZICI'ya teşekkür ederim.

Farmakoloji eğitimime katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım, Prof.Dr.Ahmet Gökhan AKKAN, Prof. Dr. Öner SÜZER, Prof.Dr.Cihat KÜÇÜKHÜSEYİN, Prof.Dr.Mustafa Aydın BARLAS, Prof.Dr.Dündar Okan YILLAR, Prof. Dr. Sibel ÖZMEN ÖZYAZGAN ve Doç.Dr.Gaye ERTEN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, her konuda destek veren Erdi KELEŞ'e teşekkür ederim.

DETAE Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlularından Ahmet KODAY'a yardımları için, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'den Ar.Gör.Dr.Gamze TANRIVERDİ'ye verdiği deneysel ve teorik bilgiler ve yardımları için teşekkür ederim.

Çalışmalarımız sırasında tecrübesinden ve bilgi birikiminden yararlanma fırsatı bulduğumuz değerli arkadaşım Timuçin AVŞAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımıza maddi ve manevi olarak katkı sunan, altyapısını kullandığımız Done Genetik ve Biyoinformatik Anonim Şirketi'ne teşekkür ederim.

Bu zamana kadar yaptığı ve yapacağı katkılardan dolayı Gentera Biyoteknoloji Limited Şirketi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarımız sırasında manevi desteğinden ve yardımlarından dolayı Hazal Ece Akpek'e teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan ve desteklerini hissettiğim sevgili aileme teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30435

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
4. BULGULAR.....	13
5. TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR	56
ETİK KURUL KARARI	59
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deney grupları ve hayvan sayıları.....	9
Tablo 4.1. Örnekler ve grupları.....	14
Tablo 4.2. Karşılaştırma grupları.....	18
Tablo 4.3. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemlerin listesi.....	18
Tablo 4.4. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemlerin listesi.....	19
Tablo 4.5. CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin listesi.....	21
Tablo 4.6. CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin listesi.....	22
Tablo 4.7. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemlerin listesi.....	23
Tablo 4.8. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemlerin listesi.....	24
Tablo 4.9. CPZ+Pera vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin listesi.	26
Tablo 4.10. CPZ+Pera vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin listesi.....	26
Tablo 4.11. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemlerin listesi.....	27
Tablo 4.12. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemlerin listesi.....	29
Tablo 4.13. CPZ+Serum vs N+Serum yukarı regüle problemlerin listesi.....	31
Tablo 4.14. N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemlerin listesi.....	32
Tablo 4.15. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemlerin listesi.....	33
Tablo 4.16. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	35
Tablo 4.17. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	36
Tablo 4.18. CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	38
Tablo 4.19. CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	40
Tablo 4.20. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	40
Tablo 4.21. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	40
Tablo 4.22. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	41
Tablo 4.23. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemler ile etkilenen yolaklar.....	41

Tablo 4.24. N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemler ile etkilenen yollar.....	41
Tablo 4.25. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemler ile etkilenen yollar.....	42
Tablo 4.26. Yukarı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi.....	42
Tablo 4.27. Aşağı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi.....	43
Tablo 4.28. Yukarı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi.....	45
Tablo 4.29. Alınan kesitlerin miyelin skorlama sonuçları.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Populasyonun her 100.000’inde MS prevalansı.....	4
Şekil 4.1. A-Sağlıklı, B-Kuprizonlu, C-Perampanel uygulanan farelerde haftalık olarak ortalama vücut ağırlığı değişimi.....	13
Şekil 4.2. PCA skorlama sonucu.....	15
Şekil 4.2. Remiyelinizasyon döneminde vücut ağırlığının haftalık olarak değişimi.....	15
Şekil 4.3. Kutu Çizim Gösterimi (Normalizasyon sonrası problemlerin gruplara göre sinyal dağılımı).....	15
Şekil 4.4. Gruplar baz alınarak yapılan kümeleme analizi;.....	16
Şekil 4.5. Gruplar baz alınarak yapılan kümeleme analizi (Problemleri gösterim).....	17
Şekil 4.6. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	19
Şekil 4.7. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	20
Şekil 4.8. CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	21
Şekil 4.9. CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	22
Şekil 4.10. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	24
Şekil 4.11. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	25
Şekil 4.12. CPZ+Pera vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	26
Şekil 4.13. CPZ+Pera vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	27
Şekil 4.14. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	29
Şekil 4.15. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	30
Şekil 4.16. CPZ+Serum vs N+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	31
Şekil 4.17. N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	32
Şekil 4.18. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası.....	34
Şekil 4.19. MAPK Yolağı.....	35

Şekil 4.20. MAPK Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi.....	36
Şekil 4.21. Makrofaj Belirteç Yolağı.....	37
Şekil 4.22. Makrofaj Belirteç Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi.....	37
Şekil:4.23. Statin Yolağı.....	37
Şekil 4.24. Statin Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi.....	38
Şekil 4.25. S1P Reseptör Sinyal Uyum Yolağı (Signal Transduction of S1P Receptor).....	39
Şekil 4.26. S1P Reseptör Sinyal Uyum Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi.....	39
Şekil 4.27. Apoptotik Süreçlerin Negatif Düzenlemesi Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiğı.....	43
Şekil 4.28. Fagositozun Pozitif Düzenlemesi Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiğı.....	44
Şekil 4.29. “Lizozim Aktivitesi” Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiğı.....	46
Şekil 4.30. Kesitlerin Histolojik Değerlendirme Sonuçları	47
Şekil 4.31. Histolojik değerlendirme sonuçları.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- MS: Multipl Skleroz
- CPZ: Kuprizon
- EAE: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit
- MR: Manyetik Rezonans
- MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi
- HLA: İnsan Lökosit Antijeni
- TMEV: Theiler's Fare Ensefalomyelit Virüs Modeli
- AD: Anlamlı Değil
- GO: Gen Ontolojisi
- PCA: Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis)
- FC: Kat değişimi (Fold Change, KD)
- 2410129H14Rik: Riken
- Hist1h2be: Histon Kümeleme 1
- Kcnab1: Voltaj Kapılı Potasyum Kanal Altbirimi 1
- Ppp1r14a: C-Kinaz Arttırılmış Protein Fosfataz-1 İnhibitör
- Tmem10: Opalin
- Cd68: Farklılaşma Kümesi 68
- LOC100047619: Çözücü Taşıyıcı Ailesi 7
- Clec7a: C Tipi Lektin
- Atf5: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 5
- Cd74: Farklılaşma Kümesi 74
- Klf2: Kruppel Benzeri Faktör 2
- Nupr1: Çekirdek Proteini 1
- Ccl4: Kemokin Ligand 4
- Apoe: Apolipoprotein E
- Sphk1: Sfingozin Kinaz 1
- Golga2: Golgi Kompleks Antijen2
- Edg8: Endotel Farklılaşması G-protein Bağlı Reseptör 8

Nckap1: NCK İlişkili Protein 1
Abca8a: ATP Bağlanma Bölgesi A Altıtipi
Cyba: Sitokrom B
Apoc4: Apolipoprotein C
Slamf9: SLAM Aile üyesi 9
Man2b1: Mannosidaz Alfa 2B
Cd52: Farklılaşma Kümesi 52
Laptm5: Lizozomal Transmembran Protein 5
Lyz: Lizozom
Slc11a1: Doğal Direnç İlişkili Makrofaj Proteini
Fcgr2b: FC fragment IgG
Tyrobp: Tirozin Kinaz Bağlanma Proteini
Centg1, PIKE: Fosfoinositid 3 Kinaz Güçlendirici
Pmch: Promelanin Konsantrasyon Hormonu
Atp2a1: Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz 1 enzimi
Tnni2: Troponin 1 Tip 2
Myl1: Miyozin Hafif Zincir 1
Tnnt1: Troponin T Tip 1
Sparc: Sisteince Zengin Asidik Matriks Protein
Oxt: Oksitosin
Ttr: Transtiretin
Zfp106: Çinko Katılma Protein
Six3: Homeobox Protein SIX
Mark2: Mark Mikrotübül Afinite Düzenleyici Kinaz 2
Odz4: Teneurin 4
Dbpht2: His-Thr Yapılı DNA Bağlanan Protein
Tmsb10: Beta Timozin 10
Ppp1r9b: Protein Fosfataz 1 Regülatör Alt Ünite 9 B
Kalrn: Kalirin
Fscn1: Fascin 1

- Ppp3ca: Protein Fosfataz 3
Ihpk2: Inositol Hekzakisfosfat Kinaz 2
Sipa111: Sinyal Arttırıcı Çoğalma İlişkili 1
Sepw1: Selenoprotein 1
Arhgdb: Rho GDP koparma İnhibitörü
Arf5: ADP Ribozilasyon Faktörü 5
Dlx1: Distal Homeobox 1
Rsrc2: Arjinin Serin Zengin Sarmal 2
Kcna1: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalı
Pgm211: Glikoz 1,6-bifosfat sentaz
Dek: Proto Onkogen
Rgs4: G proteini Sinyal Regülatörü
Ppp1r14a: Protein fosfataz 1 inhibitör 14a alt ünitesi

ÖZET

Güzel, F. (2015). Kuprizon ile Oluşturulan MS Modelinde, AMPA Antagonisti Perampanelin Etkilerinin Array Tabanlı Gen Ekspresyonu ile Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Amaç: Bu çalışmada, kuprizon ile oluşturulan MS modelinde, spesifik AMPA reseptör antagonisti olan perampanelin remiyelinizasyon sürecine etkilerinin genetik açıdan aydınlatılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 40 adet 8-10 haftalık C57BL/6 türü erkek fare kullanıldı. Kuprizon diyeti uygulanarak immün sistem etkisinden bağımsız Multipl Skleroz modeli oluşturuldu. Sağlıklı ve kuprizon diyeti uygulanan farelere 5. Haftanın sonunda 1,8 mg/kg dozda i.p. perampanel enjekte edildi. 2 haftalık remiyelinizasyon süreci sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Total beyinden korpus kallosum bölgesi çıkarılarak tüm genom gen ekspresyonu ve histolojik deneyler için ayrıldı. Tüm genom gen ekspresyon çalışmaları mikrodizin tabanlı sistemde gerçekleştirildi.

Bulgular: Vücut ağırlıkları kuprizon gruplarında anlamlı derecede azaldı. Perampanel uygulanan hayvanların vücut ağırlıklarında değişim saptanmadı. Kuprizonla daha önce yapılan çalışmalarda MBP, PLP ve MOG genlerindeki kuprizona bağlı görülen ekspresyon düşüşü, çalışmamızda mikrodizin platformunda doğrulandı. Çalışma sonucunda 7 farklı karşılaştırma grupları oluşturuldu ve gruplar arası ekspresyon farklılığı olan genler saptandı. Histolojik bulgular gen ekspresyon sonuçları ile paralellik gösterdi. Mikrodizin analizleri sonucu PIKE proteinin perampanel uygulaması ile artması remiyelinizasyonu arttıran bir etki olarak değerlendirildi. Histolojik değerlendirmede de perampanelin, remiyelinizasyonu arttırıcı etkisi görüldü. Perampanel, normal diyetle beslenen hayvanlarda 35 genin ekspresyon seviyesini değiştirerek beklenmeyen bir etki gösterdi.

Sonuç: Araştırmamızın sonuçları perampanelinin kuprizon ile oluşturulmuş demiyelinizasyon modelinde remiyelinizasyonu etkilediğini gösterdi. Farklılık oluşturan genler incelendiğinde, perampanelin, kuprizonun zararlı etkilerine karşı koruyucu olduğu, sağlıklı hayvanlarda ise zararlı olabilecek etkiler yarattığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: MS, Kuprizon, Mikrodizin, Ekspresyon, Perampanel

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30435

ABSTRACT

Güzel, F. (2015). Analysis of the AMPA antagonist perampanel affects by array-based gene expression in the model of cuprizone-induced multiple sclerosis. Istanbul University, Health Sciences Institute, Medical Pharmacology Dept. Master Thesis. Istanbul.

Aim: The aim of this study was to evaluate the effect of perampanel, a specific AMPA receptor antagonist on remyelination process with respect to genetics on cuprizone induced MS model.

Material and Method: In the following study, 40 male C57BL/6 mice of 8-10 weeks were used. Independent of immune system Multiple Sclerosis model was created by cuprizone diet. At the end of 5th week, healthy and cuprizone diet treated mice were injected 1.8 mg/kg perampanel intraperitoneally. All animals were sacrificed at the end of the 2 weeks remyelination period. Corpus callosum was separated from total brain for whole genome gene expression and histological studies. Whole genome gene expression studies were performed in microarray-based system.

Results: Body weight was significantly reduced in cuprizone diet groups. Perampanel treated animals showed non-significant change in body weight. In our study expression of MBP, PLP and MOG genes were down regulated in cuprizone diet group performed on microarray platform. At the end the experiment 7 different comparison groups were prepared and different genes expression were observed between the groups. Histologic findings were in accordance with gene expression. Microarray analysis showed that perampanel application increased remyelination and the PIKE protein. Histological evaluation also confirmed the perampanel induced remyelination. Perampanel showed unexpected results by altering the 35 genes expression of animals fed on normal diet.

Conclusion: Our experiment indicated that perampanel affected the remyelination on cuprizone induced demyelination model. Whereas examining the differentially expressed genes, perampanel is found to be harmful in healthy animals while protective against the deleterious effects of cuprizone.

Keywords: MS, Cuprizone, Microarray, Expression, Perampanel

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30435

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple Skleroz, santral sinir sisteminde yaygın görülen demiyelizan bir hastalıktır. Genetik ve çevresel faktörler, hastalığın ortaya çıkmasında birlikte neden olurlar (Hafler 2004).

Hastalık mekanizmasını anlayabilmek için yapılan çalışmalar hayvan modelleri ve hücre hatları üzerine yoğunlaşmıştır. Oluşturulan modellerden kuprizon modeli, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerini iyi tespit edip ayırabilmeyi ve immün sistem dışlandığı için daha sade ve yorumlanabilir veri elde edebilme açılarından tercih edilen bir modeldir (Skripuletz, Gudi et al. 2011). Bu çalışmada farmakolojik bir ajanın, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerini üzerine etkisini araştırmak amaçlandığı için kuprizon yöntemi seçildi.

Çalışmamızda daha önce nöroprotektif etkisi görülmüş olan perampanelin remiyelinizasyona nasıl katkı sağladığı ve tüm genlerin ekspresyonunu nasıl değiştirdiği incelenmiştir. MS çalışmalarında daha önce denenmemiş olan ve nöroprotektif etkisi gösterilmiş, Glutamat reseptör antagonistlerinden perampanel seçilmiştir (Szenasi, Vegh et al. 2008). Bu ilacın demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerine etkisi incelenmiş olup, olası yarar veya zararları ortaya konmaya çalışılmıştır. Beyin kesitleri ile yapılan histoloji çalışmaları ile bu bulgular desteklenmeye çalışılmıştır.

Epilepsi tedavisinde kullanılan perampanel (Fycompa, Eisai Co iyonotropik glutamat reseptörlerinin ana alt grubu reseptörlerinden AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropiyonik asit) reseptörlerinin seçici ve yarışmasız antagonistidir (Rogawski 2011; Rogawski and Hanada 2013). Glutamat beyinde yüksek konsantrasyonda bulunan ve merkezi sinir sisteminin en hızlı uyarıcı transmitteri olarak kabul edilen bir aminoasittir (Bleich, Romer et al. 2003). Yüksek konsantrasyonda glutamat sinir hücrelerin ölümüne neden olur. Nöronal ölüm, NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerinin aşırı uyarılması nöron içine aşırı Ca^{2+} girişi ile tetiklenir. Glutamat nörotoksisitesinin beyinde iskemi veya hipoglisemi sonrası oluşan hasarın nedeni olduğu düşünülmektedir (Herrling 1992). Nöral kök hücrelerden oluşan ve miyelin oluşturan oligodendrosit hücrelerinin öncül hücrelerine farklılaşabilen NG2 hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında, üzerinde bulundurduğu glutamat reseptörlerinin etkili olabileceği düşünülmektedir. NG2 hücreleri GABA A reseptörü ve glutamat reseptörlerinden AMPA alttipini ekspres eder. Bu reseptörler aksonlar miyelinlenmeden

önce nöronlarla yakın ilişki kurar. Sinaptik NG2 hücreleri nörondan salınan glutamat ve GABA'ya yanıt verir (Trotter, Karam et al. 2010). Nöral hücrelerin yenilenmesini arttırmak için yapılan çalışmalarda GABA A reseptörleri üzerine yoğunlaşmıştır. Fakat NG2 hücreleri üzerinde bulunan bir diğer reseptör olan AMPA reseptörlerinin koruyucu veya iyileşmeyi arttırıcı etkisi düşünülmemiştir. Çalışmamızda literatürde eksik olan ve remiyelinizasyon için önemli olduğu düşünülen NG2 hücrelerinin AMPA reseptörünü bloke etmesiyle iyileşmenin hızlanmasını sağlamak amaçlandı. Çalışma sonunda demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon fazlarının farkının histolojik ve genetik olarak ortaya konması beklenmektedir. Gruplar arasında olası farklılıkların nedenleri ve bu farklılıkların fenotipte beklenen etkileri sorgulanacak ve deneyde kullanılan değişken hakkında yorum yapılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Skleroz'un Tanım ve Tarihi

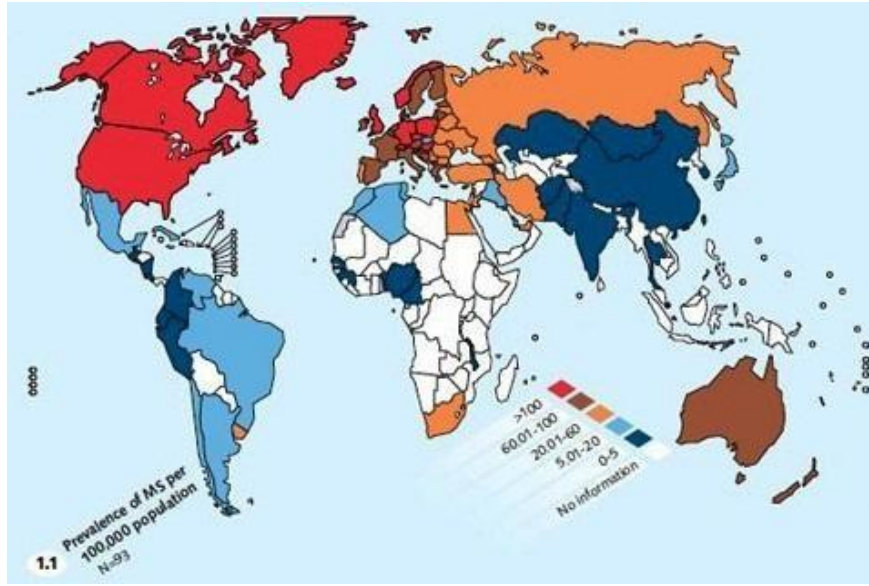
Multipl Skleroz (MS), santral sinir sisteminde görülen, beyaz cevherin demiyelizan ve inflamatuvar bir hastalığıdır. Mononükleer hücre infiltrasyonu, demiyelinizasyon ve skarlaşma (gliosis) gibi patojenik semptomlarla karakterizedir. Epizodik veya ilerleyici olabilir (Hafler 2004). Birçok vakada, yıllarca süren alevlenme ve iyileşmelerle karakterize ve santral sinir sisteminin farklı kısımlarını tutan nörolojik anomalilere sahiptir. Hastalığın nedeni ve patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Hastalık ile ilgili en önemli bulgu, miyelin kılıf ve/veya oligodriogial hücrelere T hücre aracılı bir hasar olmasıdır. Bu nedenle otoimmün bir hastalık olduğu söylenmektedir. Miyelin, merkezi ve periferik sinir sistemindeki geniş aksonları saran yalıtkan kılıftır. Akson potansiyelinin iletimi için gereklidir (Patel and Klein 2011). Geçerli olan görüş, kalıtsal ve çevresel etmenlerin otoimmünitenin oluşmasına birlikte katkı sağladığı yönündedir (Robbins, Kumar et al. 2010).

2.2. Multipl Skleroz'un Epidemiyolojisi

Erken ve orta erişkinlik döneminde ortaya çıkar ve prevalansı 35 yaşına kadar artar, sonra azalır. Kadınlarda erkeklere göre iki kat daha fazla görülür (Goodman 2011).

MS en yaygın demiyelizan bir hastalıktır. Avrupalı milletler ve ılıman iklimlerde ekvatoryal iklime göre daha sık görülür. Yüksek riskli bölgelerden düşük riskli bölgelere veya tersine göçlerde, 15 yaşından küçük olanlarda doğduğu yerin riski, 15 yaşından büyük olanlarda yeni vatanın riski söz konusudur. Bu durum MS gelişiminde hayatın erken evrelerinde çevresel etkilere maruz kalmanın önemli olduğunu gösterir (Robbins, Kumar et al. 2010).

Genellikle 15 ve 50 yaş arasında ortaya çıkan MS, ılıman iklimde yaşayan Avrupa kökenli bireylerde % 0,2 oranında görülür.(Murray 2009) MS çok yaygın bir nörolojik hastalıktır ve sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 350.000-400.000 birey MS tanısı almıştır (Drew, Xu et al. 2008).



Şekil 1.1. Populasyonun her 100.000'inde MS prevalansı

(http://www.medicinenet.com/multiple_sclerosis_pictures_slideshow/article.htm
01.05.2011)

2.3. Multiple Skleroz'un Moleküler Mekanizması

MS, merkezi sinir sisteminde bulunan miyelinli sinir hücrelerinin, kan beyin bariyerini geçen CD4+ T hücreleri ile zarar görmesi sonucu oluşan otoimmün bir hastalıktır. (Sospedra and Martin 2005) Periferde aktive olan T hücreleri kan beyin bariyerini geçtikten sonra çoğaldığı, salgıladığı sitokinler ile makrofaj, mikroglia, B hücreleri ve astrositleri aktive ettiği gösterilmiştir (Goverman 2009). Genetik mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, yapılan ailesel çalışmalarda insan lökosit antijenlerini kodlayan HLA genlerinin ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Diğer otoimmün hastalıklarda da HLA-DR ve HLA-DQ genleri ile ilgili önemli bulgular saptanmıştır (Sospedra and Martin 2005).

2.4. Multipl Skleroz'un Semptom, Teşhis ve Tedavisi

MS ilk evrelerinde gizli veya akut ilerleyebilir. Görülen plakların dağılımları farklı olduğu için klinik bulguları da değişkenlik gösterebilir. En genel bulguları; görmeye bulanıklaşma, çift görme gibi görme bozuklukları ve duyu kayıplarıdır. Bunun yanında, konuşma ve yürüme anomalileri, spastisite ve karamsar ruh hali yaygın gözlenir (Robbins, Kumar et al. 2010).

Serebrospinal sıvının incelenmesinde az sayıda lenfosit ve artmış protein seviyesi izlenir. MS'li hastalarda gamma globulin artmıştır ve serebrospinal sıvı elektroforez ile incelendiğinde immunglobulinlerin farklı bantları görülür. Bu yöntemle oligoklonal bant elektroforezi denir ve MS tanısında yardımcıdır. Bu antikorların demiyelinizasyonda primer rol oynamadıkları ve miyelin hasarına cevap olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Radyografik ve özellikle manyetik rezonans görüntüleme yöntemi ile beraber tanı için kullanılır (Robbins, Kumar et al. 2010).

MS'de demiyelinizasyonu kısıtlayan tedaviler mevcutken, remiyelinizasyona katkıda bulunan tedaviler mevcut değildir. Moleküler mekanizmalar üzerine olan çalışmalar, remiyelinizasyonu artırarak MS'de fonksiyonel bozuklukları azaltmak üzerinedir (Patel and Klein 2011).

2.5. Hayvan modelleri

MS oluşum mekanizmasını ve tedavi süreçlerini incelemek için farklı hayvan modelleri oluşturulmuştur.

2.5.1. Deneysel Otoimmün Ensafalomyelit (EAE modeli)

Multiple Skleroz'un deneysel çalışmalarında en sık kullanılan modeldir. Temel olarak beyinde inflamasyona bağlı demiyelinizasyon oluşturur (Constantinescu, Farooqi et al. 2011). Miyelin ilişkili antijen veya peptitler kemirgenlere enjekte edilir. CD4+ T hücreleri antijenler ile aktive olur. Kan beyin bariyerinin hasara uğratılması sonucu kan beyin bariyerini geçen CD4+ T hücreleri merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyona neden olur (Mix, Meyer-Rienecker et al. 2008).

2.5.2. Theiler's Fare Ensefalomyelit Virüs Modeli (TMEV)

Bu modelde TMEV virüsü ile enfekte edilmiş hücrelerde demiyelinizasyon görülür. İntrakranial olarak uygulanan bu virüs ile farelerde erken akut veya geç demiyelizan fazlar oluşur (Oleszak, Chang et al. 2004).

2.5.3. Kuprizon Modeli

Kuprizonun kemirgenler üzerindeki nörotoksik etkisi, 1966 yılında Carlton tarafından gösterilmiştir. 1998 yılında Matsushima ve ekibi tarafından kuprizonun beyaz cevher ve serebrum üzerine etkiler tanımlanmıştır. Demiyelinizasyon skorlamasının en kolay yapılmasından ve geniş demiyelize bölgeler oluşmasından

dolayı korpus kallosum bölgesine odaklanılmıştır. Remiyelinizasyonu anlamak ve nöroprotektif stratejiler belirlemek için sıklıkla kullanılan bir modeldir (Skrupuletz, Gudi et al. 2011).

Kuprizon, MS çalışmalarında kullanılan deneysel modellerden biridir. Oldukça toksik bir bakır şelatörü bir ajandır. Santral sinir sisteminde oligodendrosit apoptozisine yol açarak demiyelinizasyona neden olur. Demiyelize bölgeler en iyi korpus kallosumda görülür. Kuprizon, farelerin yemlerine karıştırılarak kullanılır ve yaklaşık 5 haftada beyinde yerel demiyelize bölgeler oluşturur. Diyetten çıkarıldığı zaman remiyelinizasyon başlar (Hiremath, Saito et al. 1998).

Kuprizon temel olarak oligodendrosit ölümünü indükler ve henüz net tanımlanamamakla beraber demiyelinizasyona neden olur. Kuprizon bakır şelasyonu yaparak serum ve beyinde bakır yoksunluğuna yol açar fakat yüksek miktarda (100 ppn'ye kadar) bakır desteği verilmesi toksik etkiyi azaltmaz. Bu durum kuprizonun temel mekanizmasının bakır yoksunluğu olmadığını gösterir (Skrupuletz, Gudi et al. 2011).

2.6. Perampanel ve Glutamat Reseptörleri

Perampanel (Fycompa, Eisai Co.), epilepsi tedavisinde kullanılan, iyonotropik glutamat reseptörlerinin ana alt grubu reseptörlerinden AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropiyonik asit) reseptörlerinin seçici ve yarışmasız antagonistidir (Rogawski 2011; Rogawski and Hanada 2013).

Glutamat beyinde yüksek konsantrasyonda bulunan ve SSS'nin en hızlı eksitator transmitteri olarak kabul edilen bir aminoasittir (Bleich, Romer et al. 2003). Glutamat reseptörleri, iyonotrop ve metabotrop olmak üzere ikiye ayrılır. İyonotropik reseptörler NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerinden oluşur. AMPA ve kainat reseptörleri beyin ve omurilikte glutamerjik sinapta hızlı depolarizasyona aracılık eder (Nestler 2001). Yüksek konsantrasyonlarda glutamat nöronal hücrelerin ölümüne neden olur. Nöronal ölüm, NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerinin aşırı uyarılması nöron içine aşırı Ca^{2+} girişi ile tetiklenir. Glutamat nörotoksitesinin beyinde iskemi veya hipoglisemi sonrası oluşan hasarın nedeni olduğu düşünülmektedir (Herrling 1992). Ayrıca AMPA reseptörü antagonisti ile yapılan çalışmalarda AMPA blokajının nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (Szenasi, Vegh et al. 2008). Nöral kök hücrelerden oluşan ve miyelin oluşturan oligodendrosit hücrelerinin öncül hücrelerine farklılaşabilen NG2 hücrelerinin

çoğalmasında ve farklılaşmasında, üzerinde bulundurduğu glutamat reseptörlerinin etkili olabileceği düşünülmektedir. NG2 proteoglikan, memeli sinir sistemi içinde ve dışındaki hücrelerde ekspres edilebilen tip-1 transmembran proteindir. NG2 hücreleri, gri cevher ve ak cevherde bulunur, oligodendrositlerin öncül hücreleri olduğu varsayılır. Transgenik fare çalışmalarında, (in vivo), NG2 hücrelerinden oligodendrosit, protoplazmik astrosit ve bazı durumlarda nöronların meydana geldiği gösterilmiştir. NG2 hücreleri GABA A reseptörü ve glutamat reseptörlerinden AMPA alttipini ekspres eder. Bu reseptörler aksonlar miyelinlenmeden önce nöronlarla yakın ilişki kurar. Sinaptik NG2 hücreleri nörondan salınan glutamat ve GABA'ya yanıt verir. Bu nöron-glia etkileşimi NG2 hücrelerinin çoğalıp farklılaşma mekanizmalarını düzenliyor olabilir. Nöronal haberleşmede modülatör olan NG2 hücrelerinin kökeni, heterojenitesi ve fonksiyonu tamamen çözülmemiş olan problemlerdir (Trotter, Karram et al. 2010).

2.7. Gen Ekspresyon Mikrodizini

Mikrodizin platformunda mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesi ölçmek, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerinde birçok genin ekspresyon seviyesinin zamanla nasıl değiştiğini görmek açısından önemlidir. Gözlenen birçok genin ekspresyon seviyesinin değişmesi kuprizonun patofizyolojik etkisiyle direkt ilgilidir. Bu durum, demiyelinizasyonun iyileşme sürecini izlememize izin verir (Jurevics, Largent et al. 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları

Çalışmada 40 adet 8-10 haftalık C57BL/6 türü erkek fareler kullanıldı. 18 adet fare histolojik değerlendirmede, kalan 22 tanesine tüm genom ekspresyon profillemesinde kullanıldı. Çalışmalar için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alındı ve belirtilen çalışmalar aynen gerçekleştirildi. Dokular çıkarılana kadar yapılan çalışmalar Çapa Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü (DETAE) hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. Fareler haftalık olarak tartıldı ve not edildi.

3.2. Kuprizon ve Perampanel Uygulaması

Yemlere 5 hafta süreyle % 0,25 oranında kuprizon eklendi ve besin kısıtlaması yapılmadı. Tüm hayvanlar 1 hafta yeni ortama alıştırdı. Deney hayvanları toz yemle beslendi. Perampanel, 5 haftalık kuprizon uygulamasından sonra 2 hafta süresince 1,8 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal yoldan uygulandı. Kafesler uygulama yöntemine göre etiketlenip ayrıldı. Deney grupları ve hayvan sayıları Tablo 3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Deney grupları ve hayvan sayıları

Gruplar	Kısa Grup Adı	Hayvan Sayısı	Kuprizon Uygulaması	İlaç Uygulaması	Serum Fizyolojik
Kuprizon	CPZ	4	5 hafta	-	-
Kuprizon + Perampanel	CPZ+Pera	10	5 hafta	2 hafta	-
Kuprizon + Serum	CPZ+Serum	8	5 hafta	-	2 hafta
Normal Yem + Serum	N+Serum	8	-	-	2 hafta
Normal Yem + Perampanel	N+Pera	10	-	2 hafta	-

Planlanan süreyi dolduran hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Histolojik değerlendirme için kullanılacak hayvanlar eter ile uyutulduktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Beyinde bulunan korpus kallosum, histolojik değerlendirme ve mikrodizin tabanlı gen ekspresyon analizleri için ayrıldı. Histolojik değerlendirme için kullanılanlar %10'luk nötral formaldehit içerisinde, ekspresyon analizine tabii tutulacaklar RNA saklama sıvısına (RNA later) konularak muhafaza edildi.

3.2. RNA İzolasyonu ve c RNA Dönüşümü

Total beyin çıkarıldıktan sonra, korpus kallosum bölgesi bistüri yardımıyla çıkarılıp homojenizasyon işlemine tabii tutuldu. Yaklaşık 20mg'lik dokudan, Roche Yüksek Safılıkta RNA Doku Kiti (Roche High Pure RNA Tissue Kit, Roche Applied Science) ile total RNA izole edildi. Homojenizasyon için 20 iğne numaralı enjektör kullanıldı. Konsantrasyon ve saflık tayini, spektrofotometrik olarak NanoDrop (Nano Drop 2000c, Thermo scientific, Waltham-USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

MouseRef-8 v2.0 Ekspresyon Boncuk Çip Kiti'nde (MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kits, Illumina,CA) her bir gene özgü 50 bazlık problemler kullanılır. Kullanılan boncuk çipi üzerinde, kodlanmış ve üzerine saflaştırılmış edilmiş cRNA'ların hibridize

olabileceği şekilde tasarlanmış boncuklar bulunmaktadır. Total mRNA örneklerinden saflaştırılmış edilmiş cRNA örnekleri, boncuk çipi yüzeyindeki boncuklara direkt olarak hibridize edilir. Bir boncuk çipi üzerinde 8 örnek çalışmak için ayrı kanallar yer almaktadır. Her bir kanal tüm genom boyu dağılmış 19.100 farklı gene ait 25.600 farklı boncuk tipi içerir. Bu boncuk çipi kitin tüm içeriği ‘National Center for Biotechnology Information Reference Sequence (NCBI RefSeq) , Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide (MEEBO) , RIKEN FANTOM2’ veri bankaları referans alınarak oluşturulmuştur.

3.2.1. Örneğin İşaretlenmesi

Bu uygulamada ticari kit olarak TargetAmp™-Nano İşaretleme Kiti (TargetAmp™- Nano Labeling Kit for Illumina® Expression BeadChip®) kullanıldı. Kit, 50-500 ng arasında izole edilmiş total mRNA ile çalışır. İzole edilmiş mRNA’dan kalıp iplik cDNA sentezi gerçekleştirir. İşlem basamakları;

- Birinci iplik cDNA sentezi
- İkinci iplik cDNA sentezi
- Biotin-aRNA’nın in vitro transkripsiyonu
- Biotin-cRNA saflaştırması

3.3. Mikrodizin Çalışması

Bu işlemler sonunda 20 µl cRNA sentezlendi. cRNA konsantrasyonu ölçümü, spektrofotometrik olarak NanoDrop (Nano Drop 2000c, Thermo scientific, Waltham-USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrodizin çipleri için gerekli total cRNA konsantrasyonu 750 ng’dır. Bir boncuk çipi yüzeyinde aynı anda 8 örnek çalışılmaktadır.

+4 °C’ de saklanan Mikrodizin boncuk çipleri, uygulama yapmadan 10 dakika önce oda sıcaklığına getirildi. 10µl cRNA örneği içerisine 20µl Hibridizasyon Buffer eklendi. Total 30µl hacimli örnek tek kanallı pipet yardımı ile çip yüzeyindeki örnek yükleme kanallarına yüklendi. Tüm örnek kanalları yüklenen boncuk çipi, hibridasyon çemberi içerisine alındı ve hibridizasyon fırını içerisinde 58°C’ de 16 saat hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon işleminin ardından, bağlanmayan ürünlerin uzaklaştırılması ve streptavidin işaretlemesi öncesi çip yüzeyinin temizlenmesi için 2 farklı sıcaklıkta

yıkama serisi uygulandı. Bu yıkamalar sırasıyla oda sıcaklığında ve yüksek sıcaklıkta yapılan yıkamalardır. Her iki yıkama, boncuk çipler ile birlikte gelen 2 farklı yıkama solüsyonları ile gerçekleştirilir. Yıkama işlemini takiben boncuk çip, Streptavidin ile işaretlendi. Boncuk çip okuma öncesinde +4 °C’ de ve 1400 rpm’de santrifüj işlemi ile karanlık ortamda kurutuldu. Son olarak boncuk çip Illumina iScan Mikrodizin cihazında görüntülendi ve alınan veriler analiz edilmek üzere saklandı.

3.4. Biyoinformatik Analiz

Elde edilen verilerin ön analizleri ve verilerin kalite kontrolleri Illumina iScan Mikrodizin sistemine ait ‘Genome Studio’ yazılımı kullanılarak yapıldı. Mevcut analizde kullanılan veriler, üzerinde hiçbir işlem yapılmamış olan ham verilerdir. Bu veriler üzerinde istatistiksel ve biyoinformatik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için verinin işlenmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda, bu verilere normalizasyon uygulandı. Illumina boncuk çip verileri için önerilen ve yaygın olarak kullanılan normalizasyon yöntemi yüzdellik (quantile) normalizasyondur. Hedef mRNA setleri Kat Değişimi (Fold Change, FC) analizine tabii tutuldu ve bu mRNA’ların hedef genlerine yönelik olarak, ortak protein bölgesi ve Gen Ontolojisi (Gene Ontology, GO) analizleri yapıldı.

İstatistiksel analizlerinde, tüm gruplarda ışınım miktarı %20’nin altında olan problemler ve standart sapması 0,1’den büyük olan problemler filtrelendi. ANOVA, Post Hoc Tukey ve Benjamini Hochberg testleri sonucu p-değeri 0.001’den daha düşük olan ve kat değişimi de 2’den büyük olan problemler göz önünde bulunduruldu. Ekspresyon seviyesi anlamlı olarak değişen mRNA’ların hedeflediği gen listeleri KEGG, DAVID ve Wiki Yolak veri tabanları üzerinde analiz edildi ve anlamlılıkları hesaplandı.

3.5. Histolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme için toplanan beyin dokuları boyama yapılmak üzere formaldehitden çıkarıldı, bistüri yardımıyla serebrum ve serebellum birbirinden ayrıldı. Belirli aralıklarla etil alkolden geçirilip, parafin ile fikse edildi. Bu bloklardan, mikrotom ile Sidman’ın fare beyin atlasına göre 240-290 aralığında, 5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler toluol içerisinde parafinden uzaklaştırıldı. Ardından %100 ve %95’lik etil alkol serilerinden geçirildikten sonra boyamaya hazır hale getirildi. %1’lik Luksol Fast Blue (LFB, Solvent Blue 38, Sigma) solüsyonu hazırlandıktan sonra preparatlar içerisine konularak 57°C’de gece boyunca bekletildi.

Daha sonra sırayla %95 etil alkol, distile su, %0,05 lityum karbonat, %70 etil alkol ve distile su serilerinden geçirildi. Bu işlemler sonrasında miyelinli bölgelerin LFB ile diğer bölgelerin Hematoksilen&Eozin ile boyanması beklenmiştir.

Boyanan kesitler Olympus BX61 fotomikroskobu yardımıyla görüntüledi. 100X büyütme ile alınan korpus kallosum bölgeleri kaydedildi. Miyelin skolarlaması aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

3 -Medial korpus kallosum normal, tamamen miyelinize

2 -Kısmi/hafif demiyelinizasyon

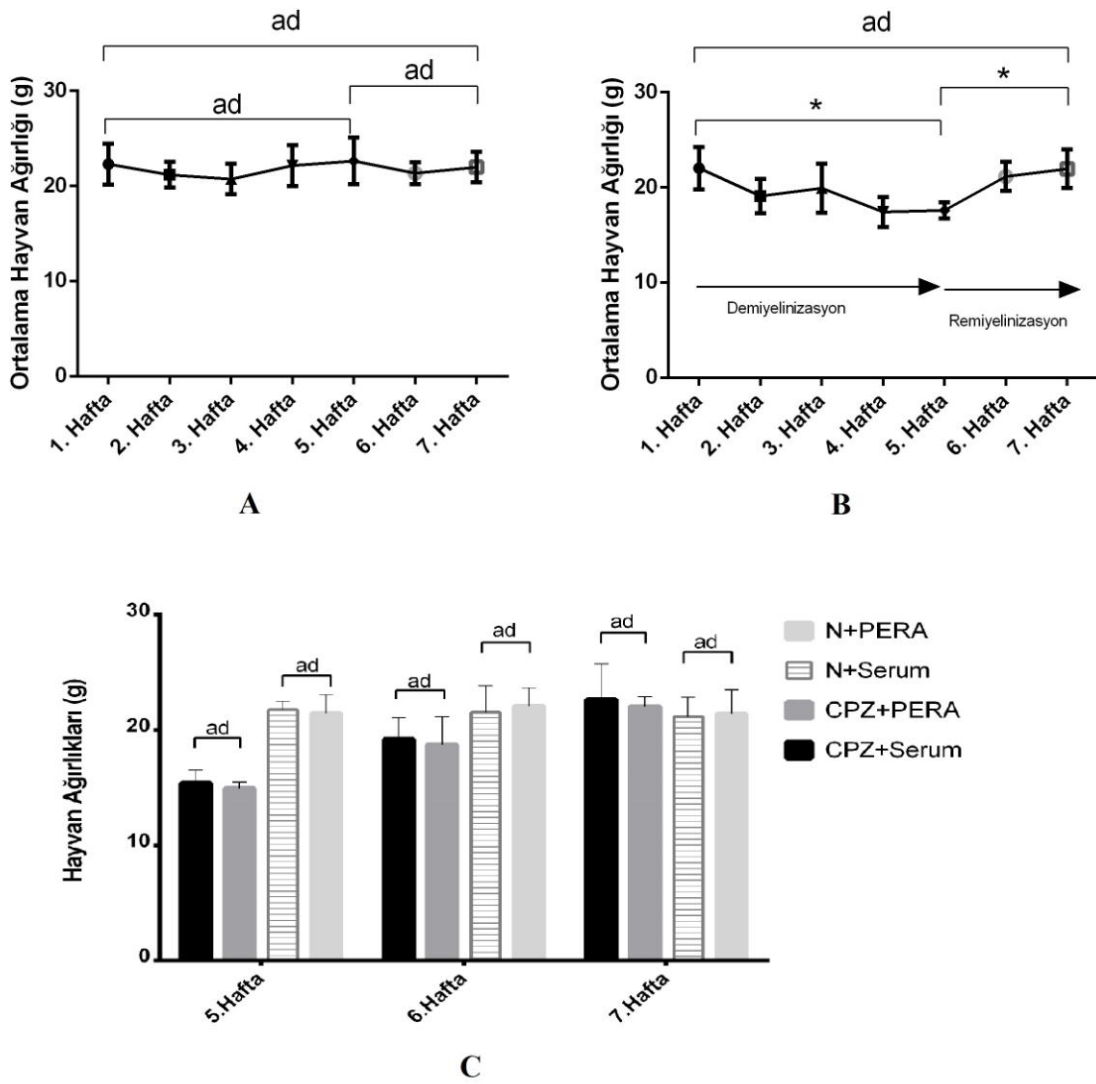
1 -Belirgin/ciddi demiyelinizasyon

0 -Medial korpus kallosum tamamen demiyelinize

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı

Kuprizon uygulanan ve normal yem ile beslenen hayvanlar haftalık tartılarak ortalamaları alındı. Kuprizon uygulaması boyunca ağırlıkta azalma, kuprizon kesildikten sonra ağırlıkta artış saptandı. Sağlıklı farelerde ve kuprizon uygulanan farelerde haftalara göre vücut ağırlığı karşılaştırması Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için eşli olmayan t-test kullanıldı. P değeri 0,05'den düşük olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1. A-Normal, B-Kuprizonlu, C-Perampanel uygulanan farelerde haftalık olarak ortalama vücut ağırlığı değişimi. (ad $P > 0,05$, * $P < 0,05$)

4.2. Gen Ekspresyonu

4.2.1. Örnek Kodlaması

Çalışma kapsamında 5 farklı gruptan toplam 22 adet RNA örneği çalışıldı. Bu örneklerin cRNA dönüşümleri yapıldı ve Illumina iScan platformunda 25 binden fazla prob kullanılarak, MouseRef-8 v2.0 Ekspresyon Boncuk Çip Kiti (Illumina Mouse Ref-8 V2.0 Expression BeadChip) ile tüm genom ekspresyon profili çıkarıldı. Çalışmada aynı örnek grubuna dâhil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik tekrar (replika) olarak değerlendirildi. Örnek kodları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

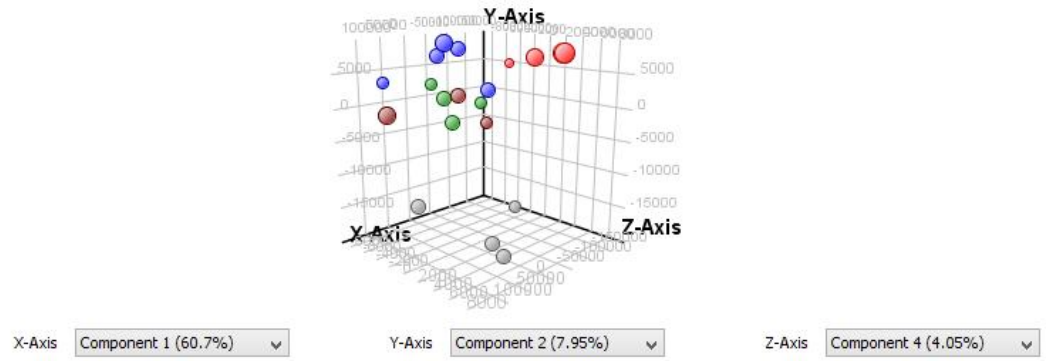
Tablo 4.1. Örnekler ve gruplama

Örnek Adı	Örnek Kodu	Örnek Adı	Örnek Kodu
N+Pera	1	CPZ	3
N+Pera	1	CPZ	3
N+Pera	1	CPZ	3
N+Pera	1	N+Serum	4
N+Pera	1	N+Serum	4
CPZ+Pera	2	N+Serum	4
CPZ+Pera	2	N+Serum	4
CPZ+Pera	2	CPZ+Serum	5
CPZ+Pera	2	CPZ+Serum	5
CPZ+Pera	2	CPZ+Serum	5
CPZ	3	CPZ+Serum	5

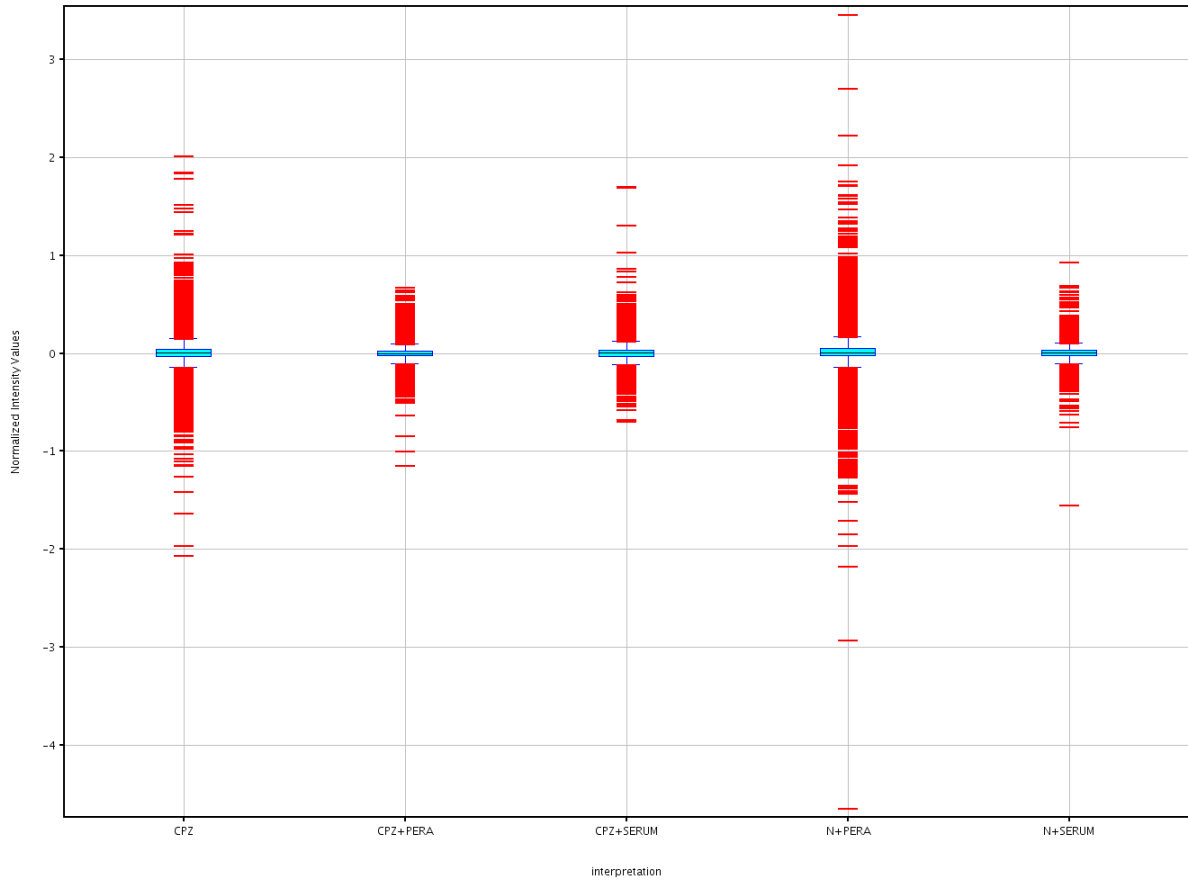
CPZ, Kuprizon uygulanan gruplar; N, normal diyet; Pera, perampanel uygulanan gruplar; Serum, serum fizyolojik uygulanan gruplar olarak gösterilmiştir.

4.2.2. Verilerin Kalite Kontrolü

Ham Mikrodizin verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürüldü. Mikrodizin verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arka plan gürültüsü uzaklaştırıldı ve tüm örneklerin verisi yüzdelik normalizasyona tabi tutuldu. PCA skorlama sonucunda sapma gösteren CPZ+Serum ve N+Pera gruplarından 1'er örnek çıkarıldı. Çalışmalara 20 adet örnek ile devam edildi.



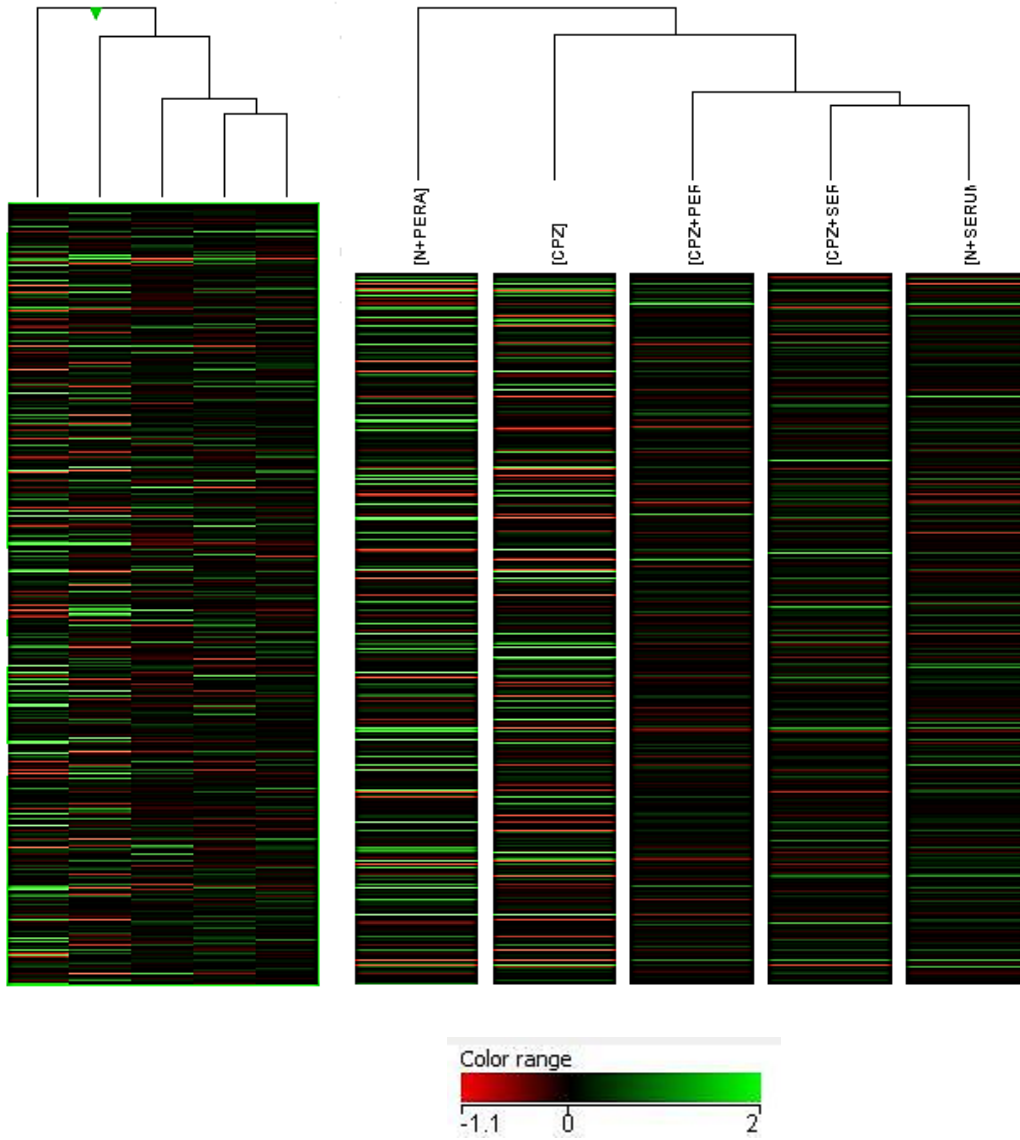
Şekil 4.2. PCA skorlama sonucu (x, y ve z düzlemlerinde örneklerin sinyal yoğunluklarının dağılımları)



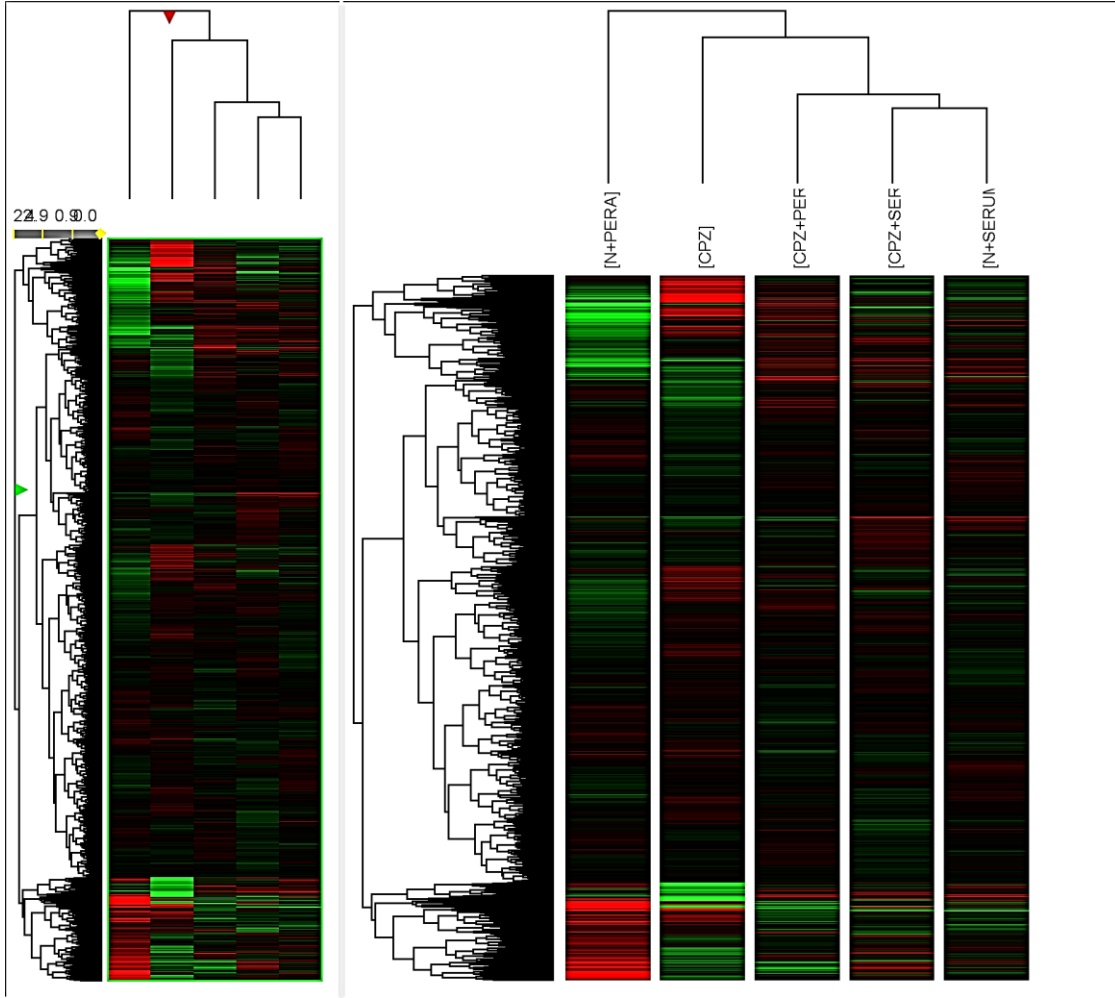
Şekil 4.3. Kutu Çizim Gösterimi (Normalizasyon sonrası problemlerin gruplara göre sinyal dağılımı)

4.2.3. Kümeleme (Cluster) Analizi

Normalize edilen verilerle, örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonuçları Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Bu işlem sırasında örneklerin hangi grupta olduğu göz önüne alınmadı ve ekspresyon profilinden yola çıkılarak kümeleme yapıldı. Teknik tekrar olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplandı. Hiyerarşik kümeleme 'Hierarchical' yaklaşımı kullanılarak oluşturuldu. Uzaklık birimi olarak "Euclidean" ve bağlantı kuralı "Wards" algoritması seçildi.



Şekil 4.4. Gruplar baz alınarak yapılan kümeleme Analizi



Şekil 4.5. Gruplar baz alınarak yapılan kümeleme Analizi (Probu gösterim)

4.2.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmalara 25.697 adet proba başlandı. Bu problemler ekspresyon seviyelerine göre filtre edildi. Normalize datalardan %20'nin altında ışığa aldığımız problemler filtreye takıldı. 24.736 adet proba çalışmaya devam edildi.

Standart sapması 0,1'den büyük olan problemler filtre edildi. 24.736 adet probdan 22.799 tanesi kaldı ve çalışmalara bu problemlerle devam edildi.

İstatistiksel analizlerde grup karşılaştırması için ANOVA ve Post-Hoc Tukey testleri yapıldı. P değeri hesaplaması için asymptotic seçildi ve çoklu test doğrulaması için Benjamini Hochberg FDR testi uygulandı. P değeri 0,001'den büyük değerler filtre edildi. Daha sonra KD (Fold Change) Analizi yapılarak 2 den büyük kat değişimleri her bir prob için artış ve azalış olarak belirtildi.

20 adet örnek ve 5 grup ile, 7 farklı karşılaştırma grubu oluşturuldu. Her bir grup için filtrelemeler, KD hesaplaması, yolak analizleri ve GO analizleri yapıldı. Karşılaştırılan gruplar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Karşılaştırma grupları

	Case	Control
Grup 1	CPZ + Pera	CPZ
Grup 2	CPZ	CPZ + Serum
Grup 3	N + Serum	CPZ
Grup 4	CPZ + Pera	CPZ + Serum
Grup 5	CPZ + Pera	N + Pera
Grup 6	CPZ + Serum	N + Serum
Grup 7	N + Pera	N + Serum

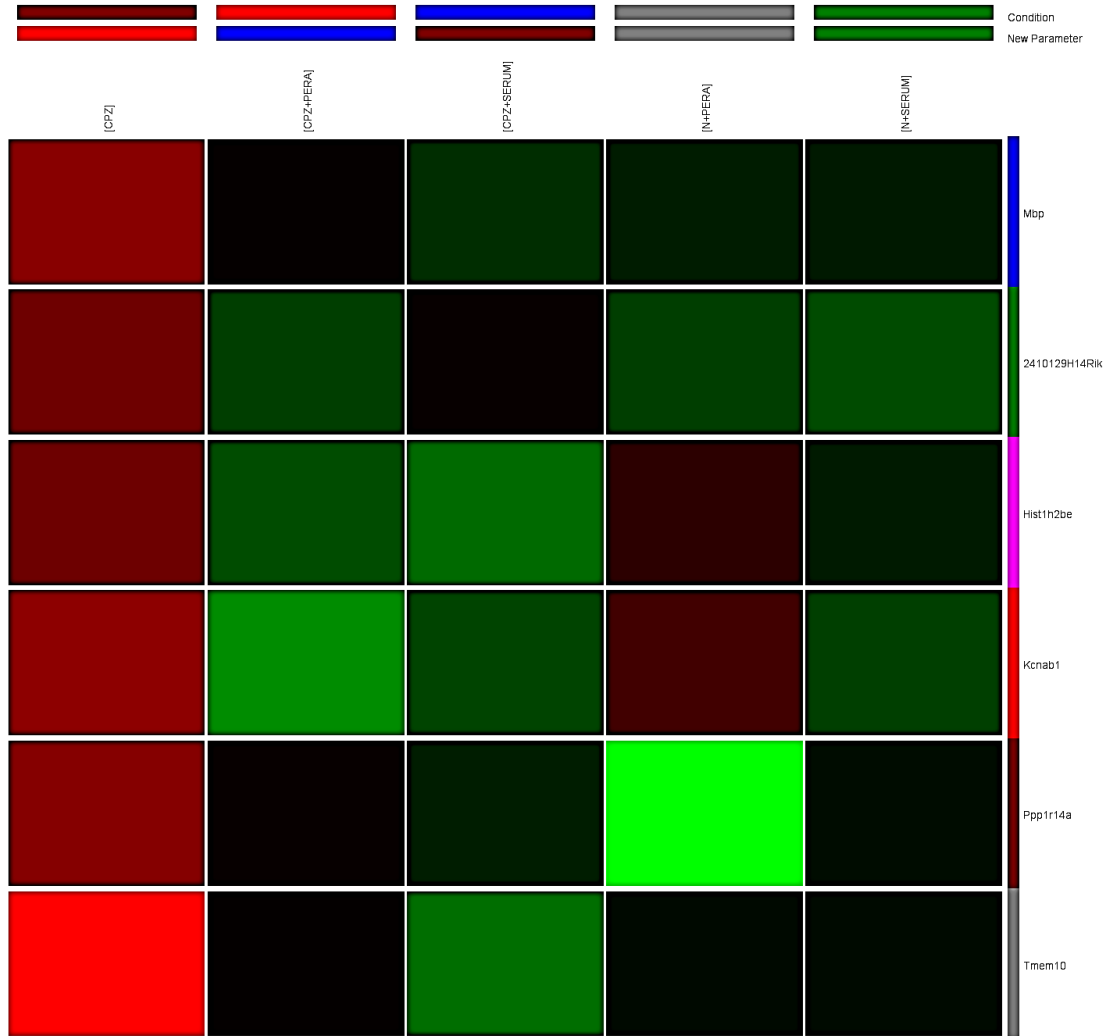
4.2.5. KD Analizleri

Grup 1 (CPZ+Pera vs CPZ)

Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 6 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 9 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.6.'da, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemlerin listesi

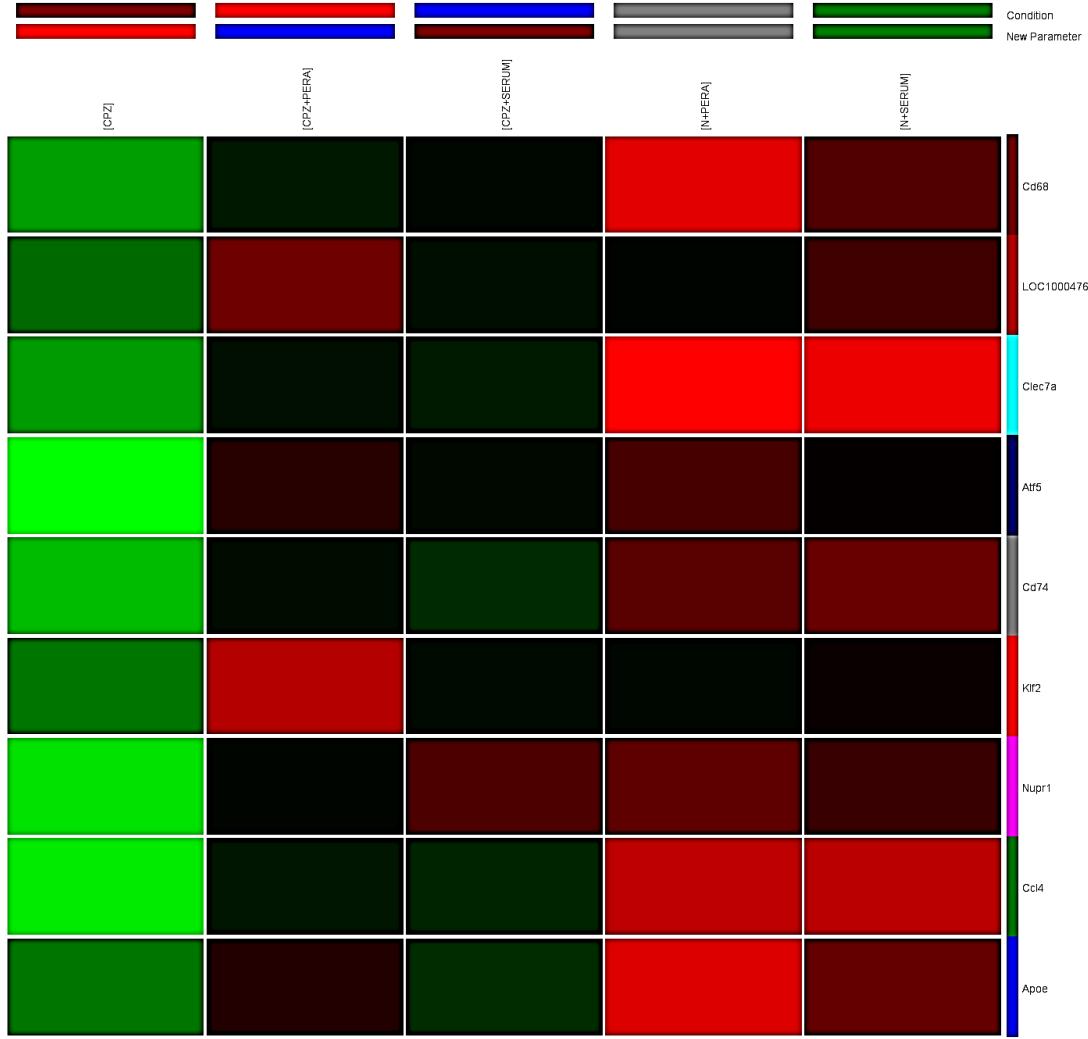
ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Symbol
1450646	2.086217	1.060889	2.086217	Yukarı	Mbp
3930202	2.002688	1.001938	2.002688	Yukarı	2410129H14 Rik
6380128	2.029829	1.021358	2.029829	Yukarı	Hist1h2be
2570608	2.638746	1.399852	2.638746	Yukarı	Kcnab1
4040215	2.015801	1.011353	2.015801	Yukarı	Ppp1r14a
3850414	4.05867	2.021007	4.05867	Yukarı	Tmem10



Şekil 4.6. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Tablo 4.4. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [CPZ])	Symbol
6560341	-2.08975	-1.06333	2.089747	aşağı	Cd68
4180437	-2.08839	-1.06239	2.088393	aşağı	LOC1000476 19
1450333	-2.14727	-1.10251	2.147274	aşağı	Clec7a
6520129	-4.27136	-2.0947	4.271364	aşağı	Atf5
3360338	-2.61444	-1.3865	2.614436	aşağı	Cd74
2970332	-2.47149	-1.30538	2.471495	aşağı	Klf2
1240424	-3.34918	-1.74381	3.349182	aşağı	Nupr1
6940184	-3.19954	-1.67787	3.199543	aşağı	Ccl4
7210687	-2.00528	-1.00381	2.005282	aşağı	Apoe



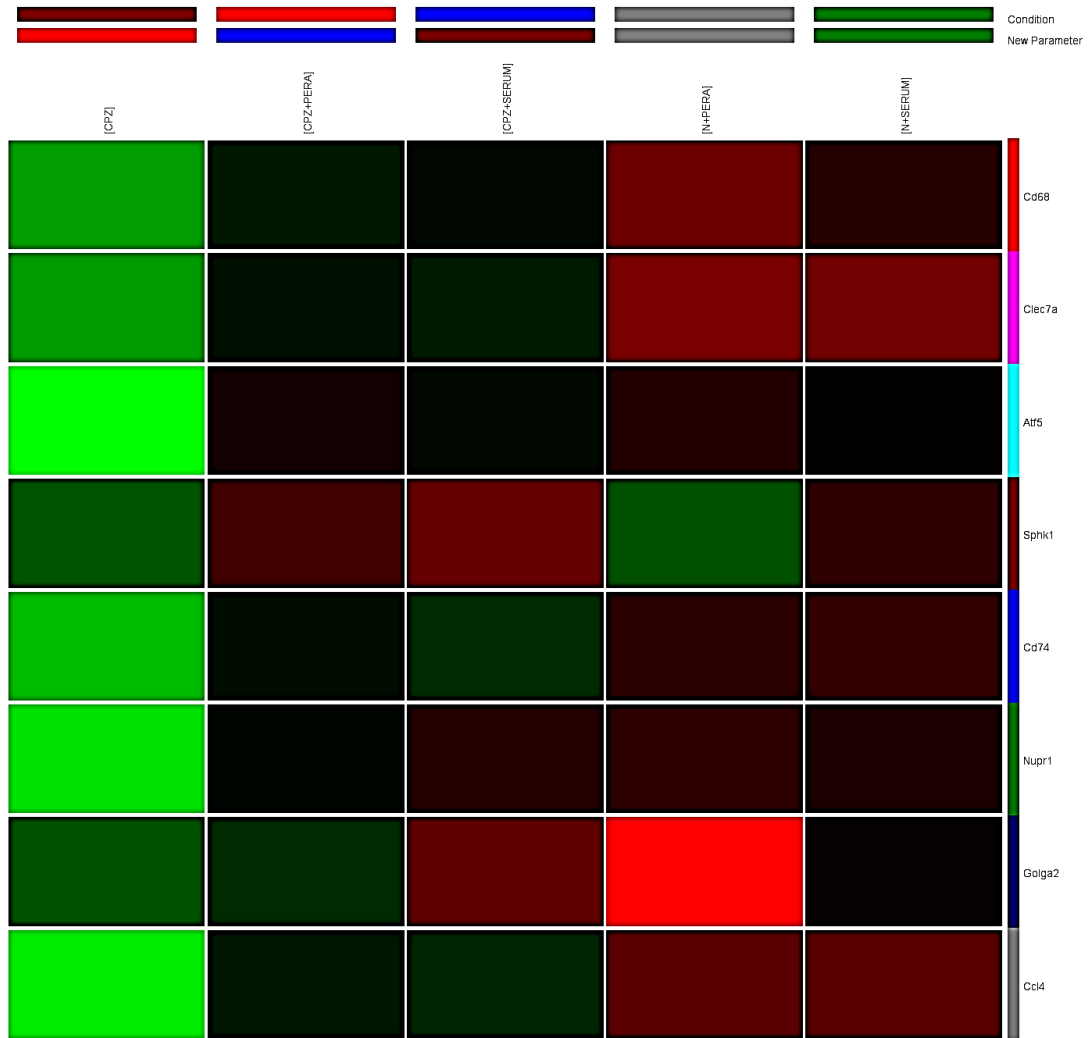
Şekil 4.7. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Grup 2 (CPZ vs CPZ+Serum)

Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 8 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 7 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.8’de, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

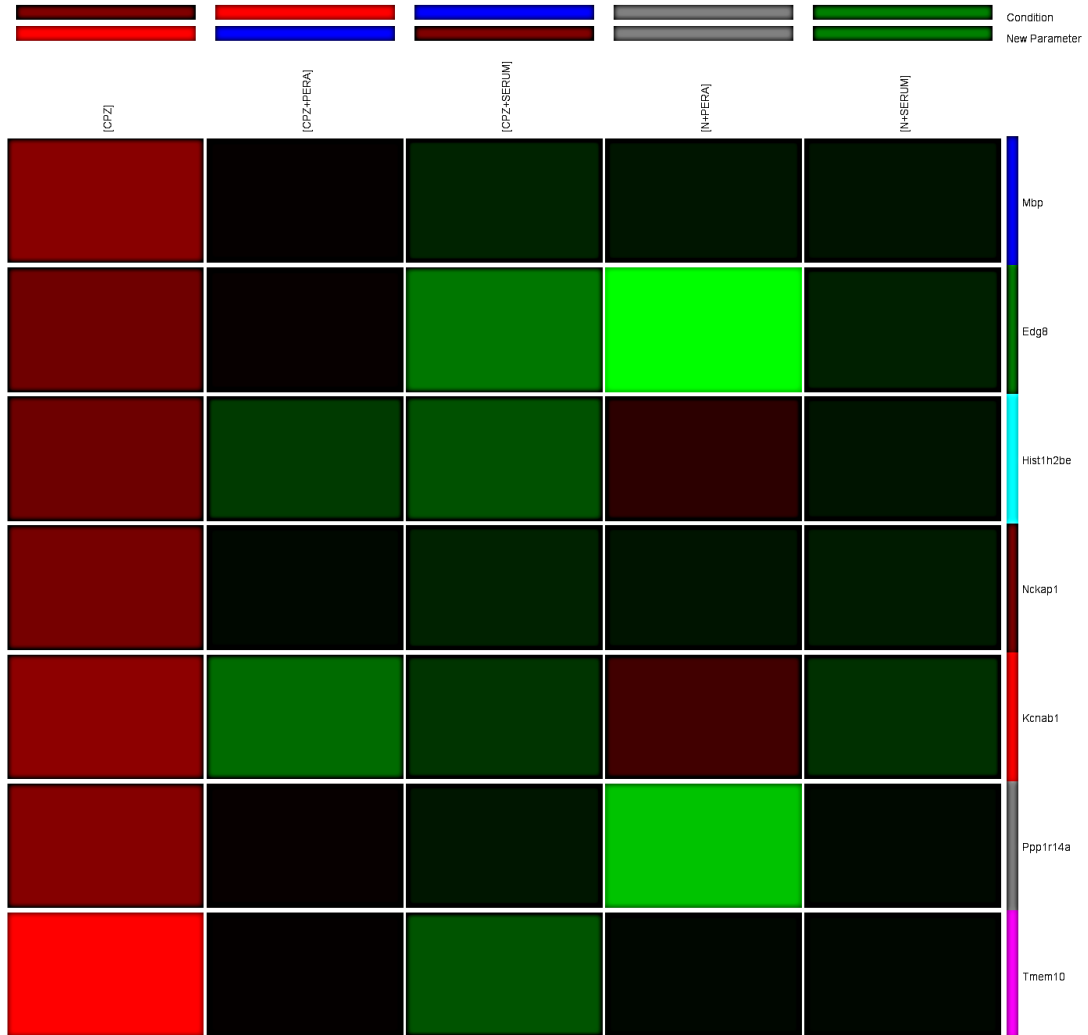
Tablo 4.5. CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Log KD ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	KD (abs) ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Regulation ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Symbol
6560341	2.291824	1.196496	2.291824	Yukarı	Cd68
1450333	2.02618	1.018762	2.02618	Yukarı	Clec7a
6520129	3.865592	1.950689	3.865592	Yukarı	Atf5
620372	2.128126	1.089583	2.128126	Yukarı	Sphk1
3360338	2.207075	1.142136	2.207075	Yukarı	Cd74
1240424	3.845781	1.943277	3.845781	Yukarı	Nupr1
2340441	2.076152	1.053912	2.076152	Yukarı	Golga2
6940184	2.987336	1.578859	2.987336	Yukarı	Ccl4

**Şekil 4.8.** CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Tablo 4.6. CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemların listesi

ProbeID	KD ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Log KD ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	KD (abs) ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Regulation ([CPZ] vs [CPZ+SERU M])	Symbol
1450646	-2.26861	-1.18181	2.268615	aşağı	Mbp
5810273	-2.26657	-1.18051	2.266572	aşağı	Edg8
6380128	-2.11099	-1.07792	2.110987	aşağı	Hist1h2be
1660564	-2.05056	-1.03602	2.050564	aşağı	Nckap1
2570608	-2.40588	-1.26657	2.405882	aşağı	Kcnab1
4040215	-2.17652	-1.12202	2.176517	aşağı	Ppp1r14a
3850414	-4.79213	-2.26067	4.792132	aşağı	Tmem10

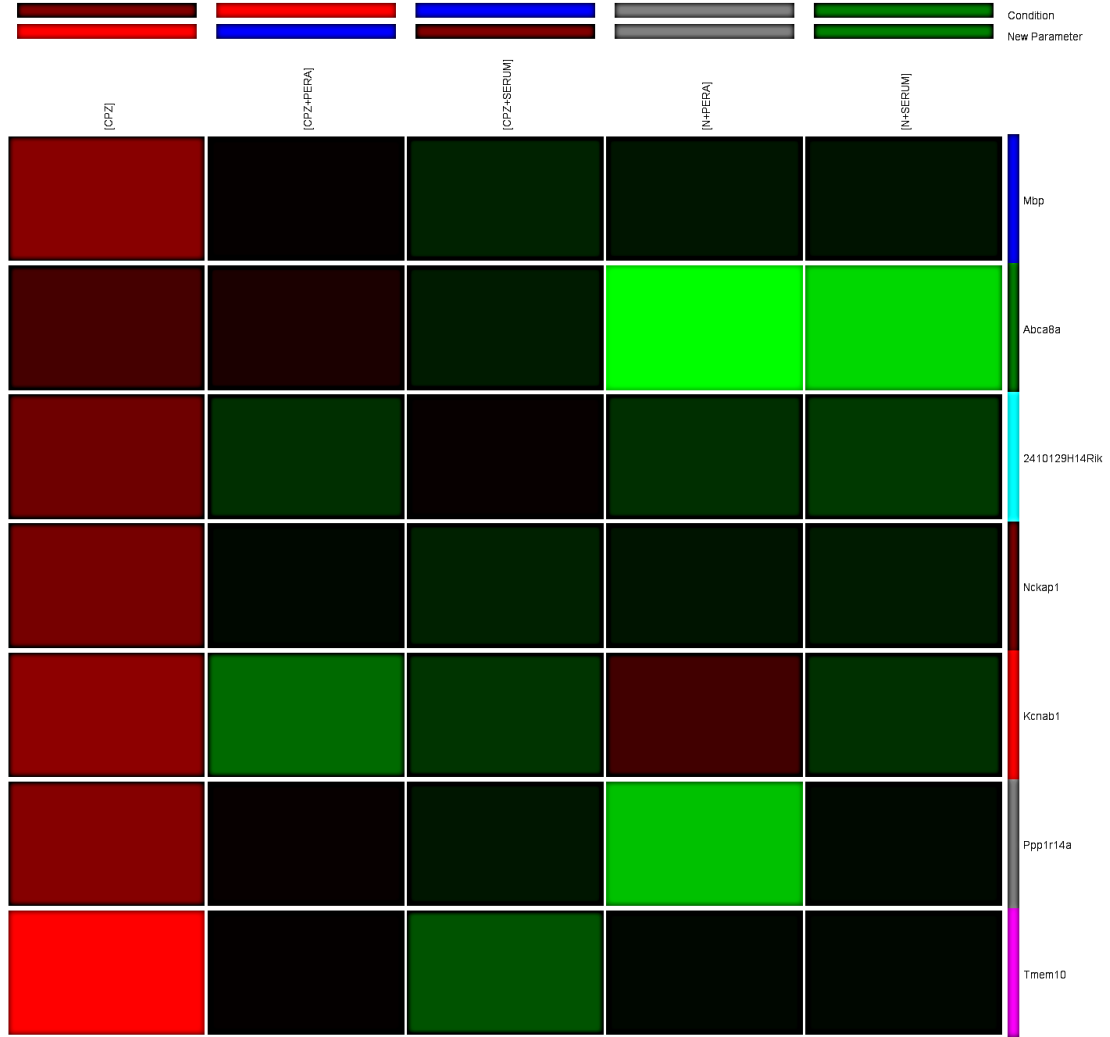
**Şekil 4.9.** CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemların sıcaklık haritası

Grup 3 (N+Serum vs CPZ)

Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 7 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 17 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.10.'da, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([N+SERUM] vs [CPZ])	Log ([N+SERUM] [CPZ])	KD vs	KD (abs) ([N+SERUM] vs [CPZ])	Regulation ([N+SERUM] vs [CPZ])	Symbol
1450646	2.211799	1.14522		2.211799	Yukarı	Mbp
6560594	2.124817	1.087338		2.124817	Yukarı	Abca8a
3930202	2.036903	1.026377		2.036903	Yukarı	2410129H14Rik
1660564	2.027984	1.020047		2.027984	Yukarı	Nckap1
2570608	2.389421	1.256661		2.389421	Yukarı	Kcnab1
4040215	2.131257	1.091705		2.131257	Yukarı	Ppp1r14a
3850414	4.212147	2.074556		4.212147	Yukarı	Tmem10

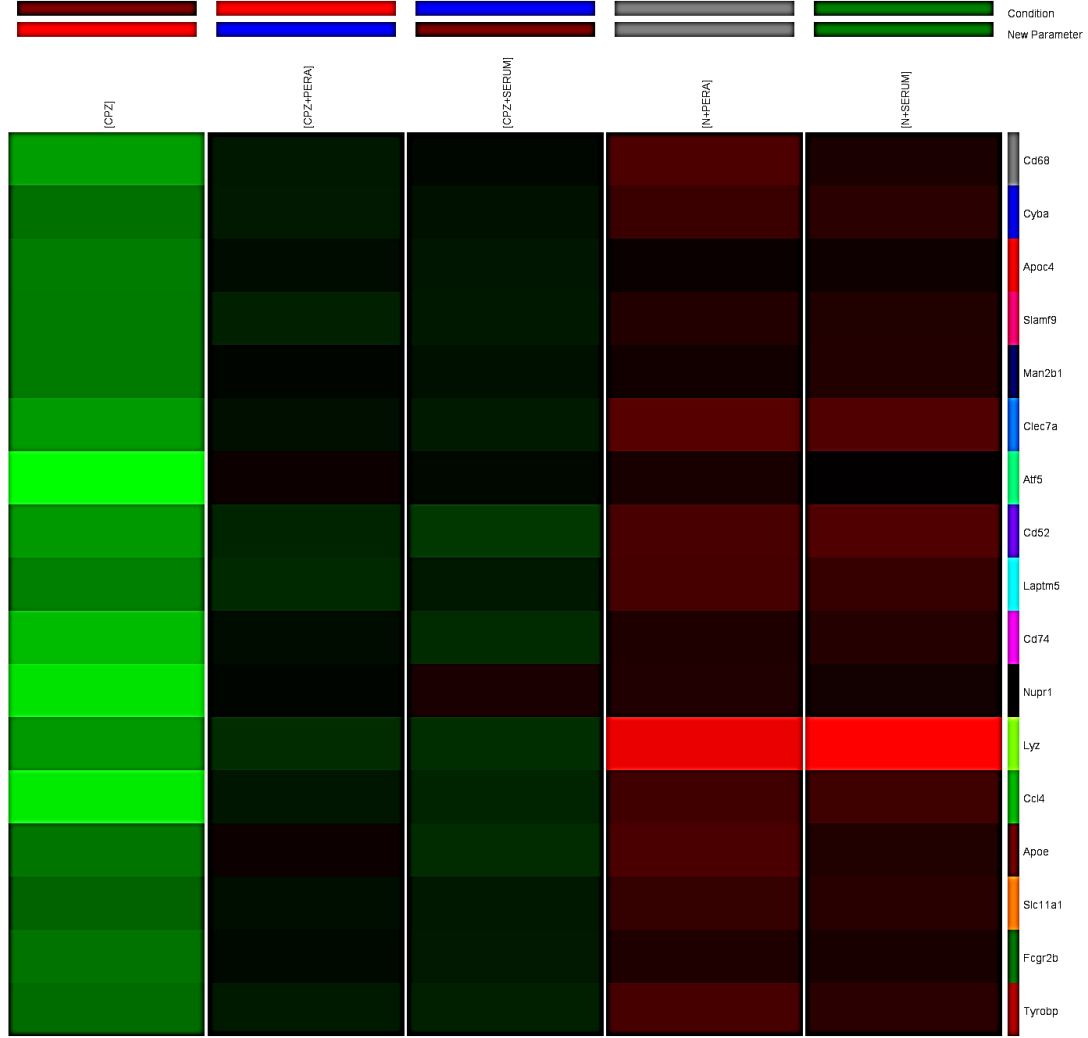


Şekil 4.10. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Tablo 4.8. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([N+SERU M] vs [CPZ])	Log KD ([N+SERU M] vs [CPZ])	KD (abs) ([N+SERU M] vs [CPZ])	Regulation ([N+SERU M] vs [CPZ])	Symbol
6560341	-2.66969	-1.41667	2.669688	aşağı	Cd68
830369	-2.21981	-1.15043	2.219805	aşağı	Cyba
940451	-2.10451	-1.07348	2.104505	aşağı	Apoc4
7510291	-2.25736	-1.17464	2.257365	aşağı	Slamf9
4610711	-2.26573	-1.17997	2.265728	aşağı	Man2b1
1450333	-3.26642	-1.70771	3.266419	aşağı	Clec7a
6520129	-4.06689	-2.02393	4.066893	aşağı	Atf5
6290768	-3.26404	-1.70666	3.26404	aşağı	Cd52
940438	-2.54	-1.34483	2.539996	aşağı	Laptn5
3360338	-3.25042	-1.70063	3.250423	aşağı	Cd74
1240424	-3.73383	-1.90065	3.733826	aşağı	Nupr1
5720609	-6.79095	-2.76361	6.790951	aşağı	Lyz

6940184	-4.71495	-2.23724	4.714951	aşağı	Ccl4
7210687	-2.19941	-1.13711	2.199407	aşağı	ApoE
3850497	-2.03826	-1.02734	2.038265	aşağı	Slc11a1
1110326	-2.09382	-1.06614	2.093817	aşağı	Fcgr2b
450739	-2.16082	-1.11158	2.160816	aşağı	Tyrobp



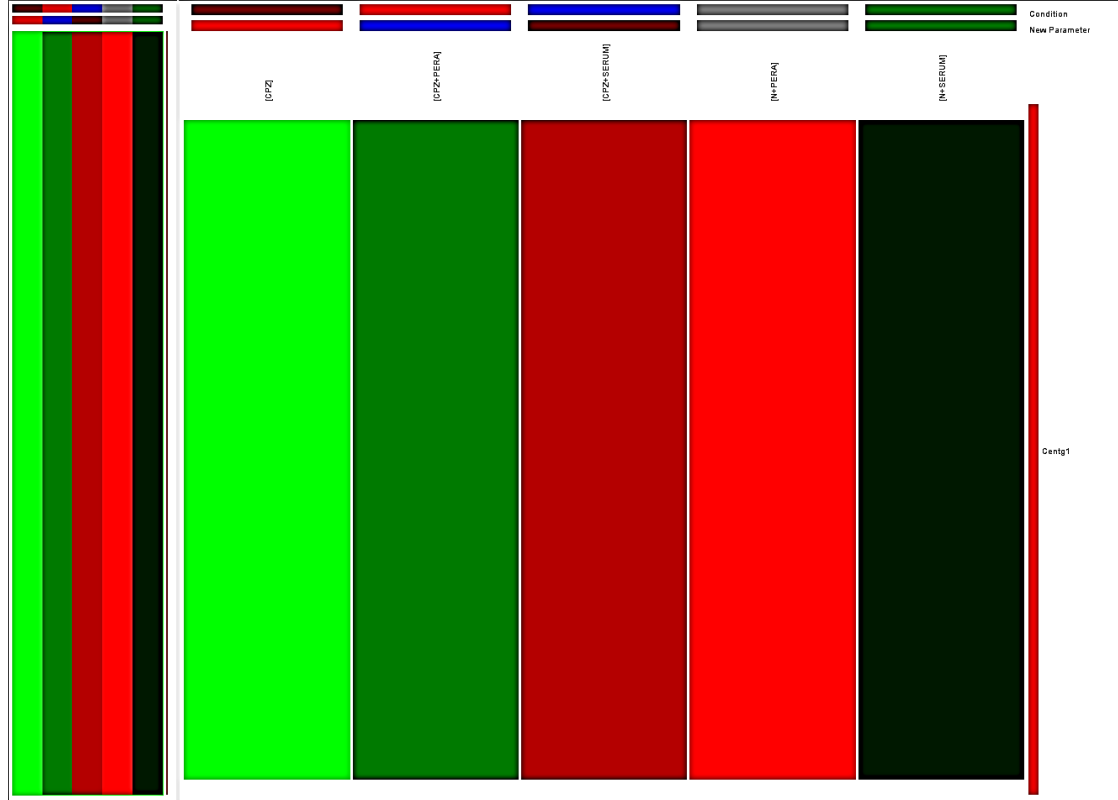
Şekil 4.11. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Grup 4 (CPZ+Pera vs CPZ+Serum)

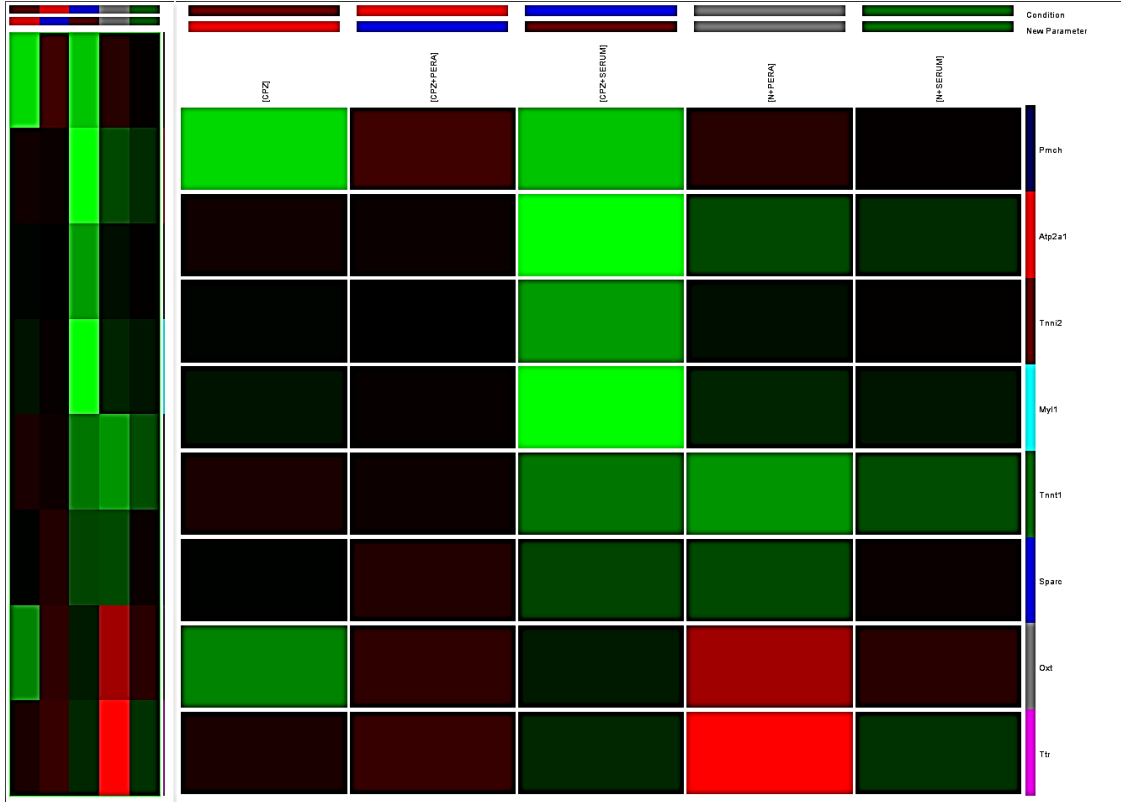
Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Ekspresyon seviyesi anlamlı değişen prob bulunmadığı için p değeri 0.05'e yükseltılarak tekrar analiz edildi. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 1 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 8 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.12.'de, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.13. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. CPZ+Pera vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Symbol
6350278	2.001571	1.001133	2.001571	Yukarı	Centg1

**Şekil 4.12.** CPZ+Pera vs CPZ+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası**Tablo 4.10.** CPZ+Pera vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [CPZ+SERU M])	Symbol
7210661	-5.4861	-2.45578	5.486104	aşağı	Pmch
780356	-3.72117	-1.89576	3.721173	aşağı	Atp2a1
2260066	-2.08981	-1.06337	2.089806	aşağı	Tnni2
2490731	-3.5049	-1.80937	3.504903	aşağı	Myl1
620064	-2.032	-1.0229	2.031997	aşağı	Tnnt1
5130148	-2.12146	-1.08506	2.12146	aşağı	Sparc
360132	-2.02436	-1.01746	2.024358	aşağı	Oxt
2680113	-2.3811	-1.25163	2.381102	aşağı	Tr



Şekil 4.13. CPZ+Pera vs CPZ+Serum aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası

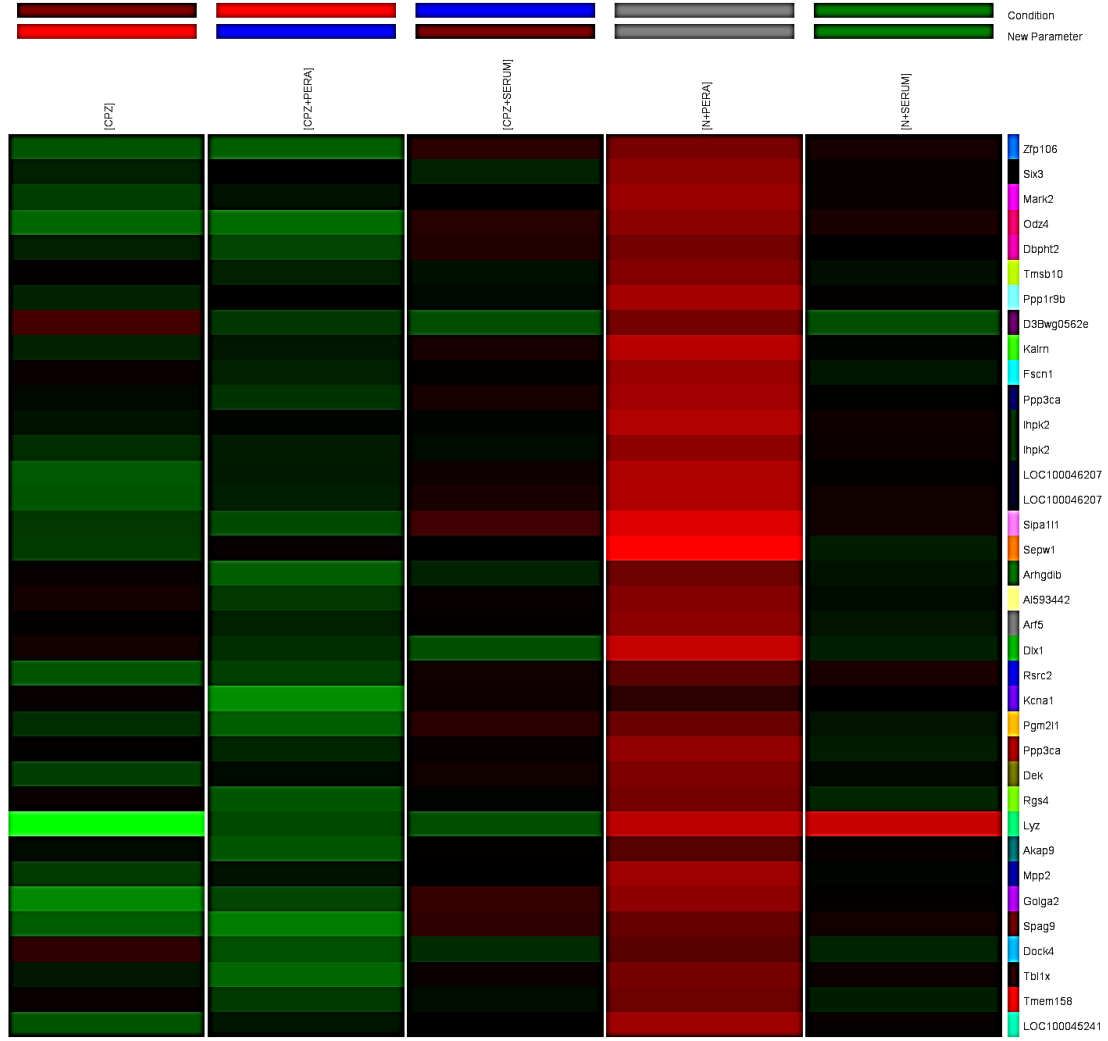
Grup 5 (CPZ+Pera vs N+Pera)

Kontrol grubu olarak N+Pera seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 36 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 19 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.14.'de, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.15.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Symbol
580142	2.577897	1.366195	2.577897	Yukarı	Zfp106
6220095	2.105488	1.074155	2.105488	Yukarı	Six3
1660523	2.433963	1.283307	2.433963	Yukarı	Mark2
3060382	3.027185	1.597977	3.027185	Yukarı	Odz4
580397	2.34028	1.226681	2.34028	Yukarı	Dbpht2
5130273	2.239164	1.16296	2.239164	Yukarı	Tmsb10
1260736	2.396548	1.260958	2.396548	Yukarı	Ppp1r9b
3850180	2.260229	1.176469	2.260229	Yukarı	D3Bwg0562e

1240014	2.869485	1.520792	2.869485	Yukarı	Kalrn
4540221	2.522209	1.334688	2.522209	Yukarı	Fscn1
2140528	2.797173	1.483969	2.797173	Yukarı	Ppp3ca
7550441	2.627192	1.393522	2.627192	Yukarı	Ihpk2
4070358	2.370331	1.245088	2.370331	Yukarı	Ihpk2
620239	2.769744	1.469752	2.769744	Yukarı	LOC1000462 07
1400746	2.828661	1.500119	2.828661	Yukarı	LOC1000462 07
6760661	4.158073	2.055915	4.158073	Yukarı	Sipa111
7400392	3.726381	1.897775	3.726381	Yukarı	Sepw1
1090180	2.455504	1.296019	2.455504	Yukarı	Arhgdib
4230768	2.439234	1.286428	2.439234	Yukarı	AI593442
1570398	2.35816	1.237662	2.35816	Yukarı	Arf5
2030592	3.306561	1.725331	3.306561	Yukarı	Dlx1
5340102	2.006325	1.004556	2.006325	Yukarı	Rsrc2
520593	2.028122	1.020145	2.028122	Yukarı	Kcna1
7570379	2.416183	1.27273	2.416183	Yukarı	Pgm211
6450082	2.487206	1.314526	2.487206	Yukarı	Ppp3ca
4490286	2.025817	1.018504	2.025817	Yukarı	Dek
4780128	2.485971	1.31381	2.485971	Yukarı	Rgs4
5720609	3.433836	1.779821	3.433836	Yukarı	Lyz
5050400	2.124701	1.08726	2.124701	Yukarı	Akap9
2470239	2.43843	1.285953	2.43843	Yukarı	Mpp2
2340441	2.689889	1.427547	2.689889	Yukarı	Golga2
1500382	2.58903	1.372412	2.58903	Yukarı	Spag9
70441	2.082459	1.058288	2.082459	Yukarı	Dock4
6760114	2.639544	1.400289	2.639544	Yukarı	Tbl1x
5090010	2.158848	1.110261	2.158848	Yukarı	Tmem158
4640689	2.480581	1.310678	2.480581	Yukarı	LOC1000452 41

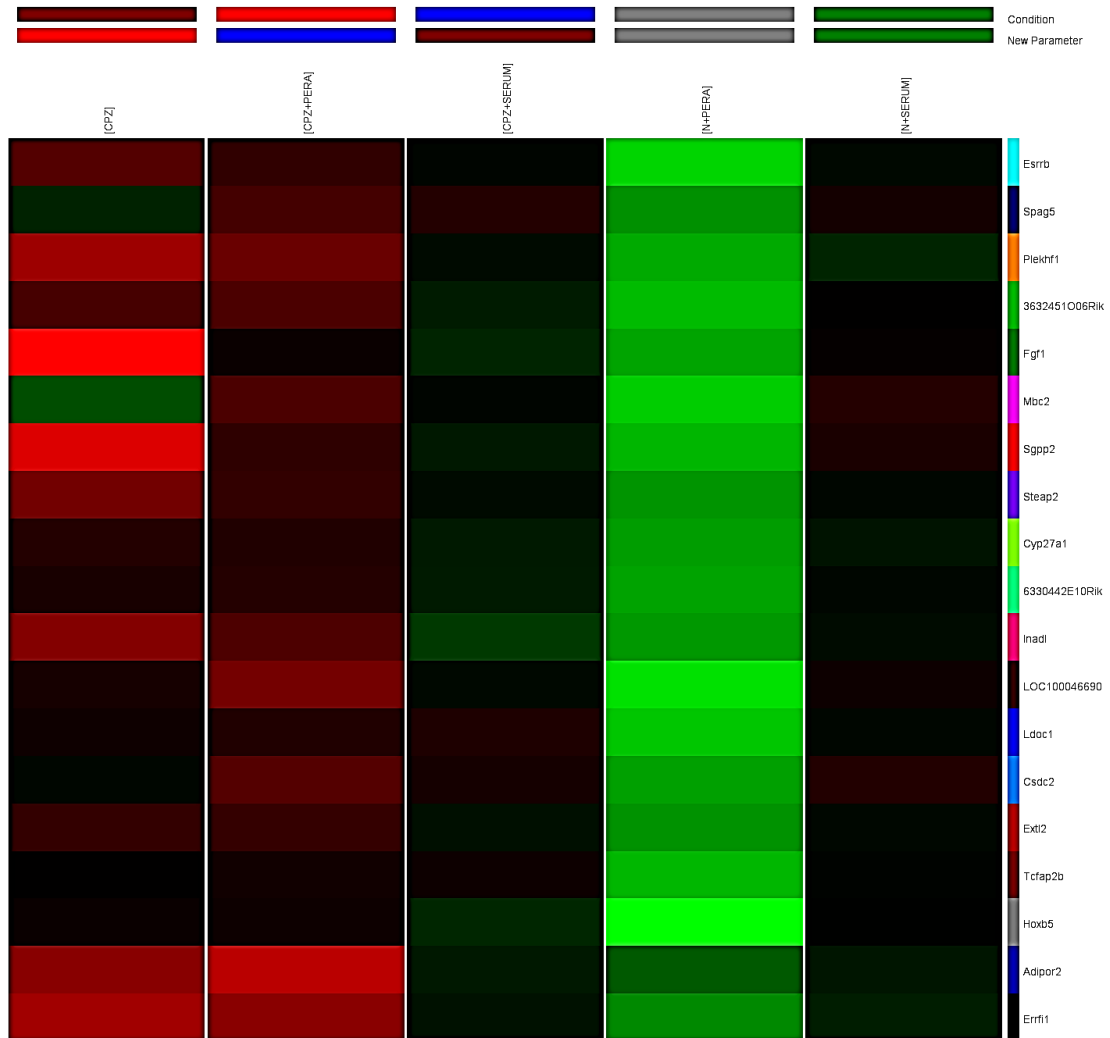


Şekil 4.14. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Tablo 4.12. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Log KD ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	KD (abs) ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Regulation ([CPZ+PERA] vs [N+PERA])	Symbol
7150017	-2.64059	-1.40086	2.640594	aşağı	Esrrb
2190064	-2.05535	-1.03938	2.055346	aşağı	Spag5
1660685	-2.45055	-1.29311	2.450549	aşağı	Plekhf1
10592	-2.48577	-1.31369	2.485766	aşağı	3632451O06 Rik
6650209	-2.01245	-1.00895	2.012449	aşağı	Fgf1
770477	-2.68032	-1.42241	2.680324	aşağı	Mbc2
4230605	-2.31151	-1.20884	2.311515	aşağı	Sgpp2
6280189	-2.0228	-1.01635	2.022799	aşağı	Steap2
2940170	-2.03266	-1.02337	2.032658	aşağı	Cyp27a1
5270167	-2.10641	-1.07478	2.106406	aşağı	6330442E10R ik
4230673	-2.16071	-1.11151	2.160709	aşağı	Inadl

6650424	-3.14239	-1.65186	3.142391	aşağı	LOC100046690
6110500	-2.40935	-1.26864	2.409348	aşağı	Ldoc1
3710411	-2.26126	-1.17713	2.261264	aşağı	Csdc2
4880161	-2.01729	-1.01242	2.017289	aşağı	Extl2
2760451	-2.20923	-1.14355	2.209233	aşağı	Tcfap2b
5130136	-2.95641	-1.56385	2.956412	aşağı	Hoxb5
1570328	-2.02693	-1.01929	2.026928	aşağı	Adipor2
4570368	-2.2598	-1.1762	2.259802	aşağı	Errfi1



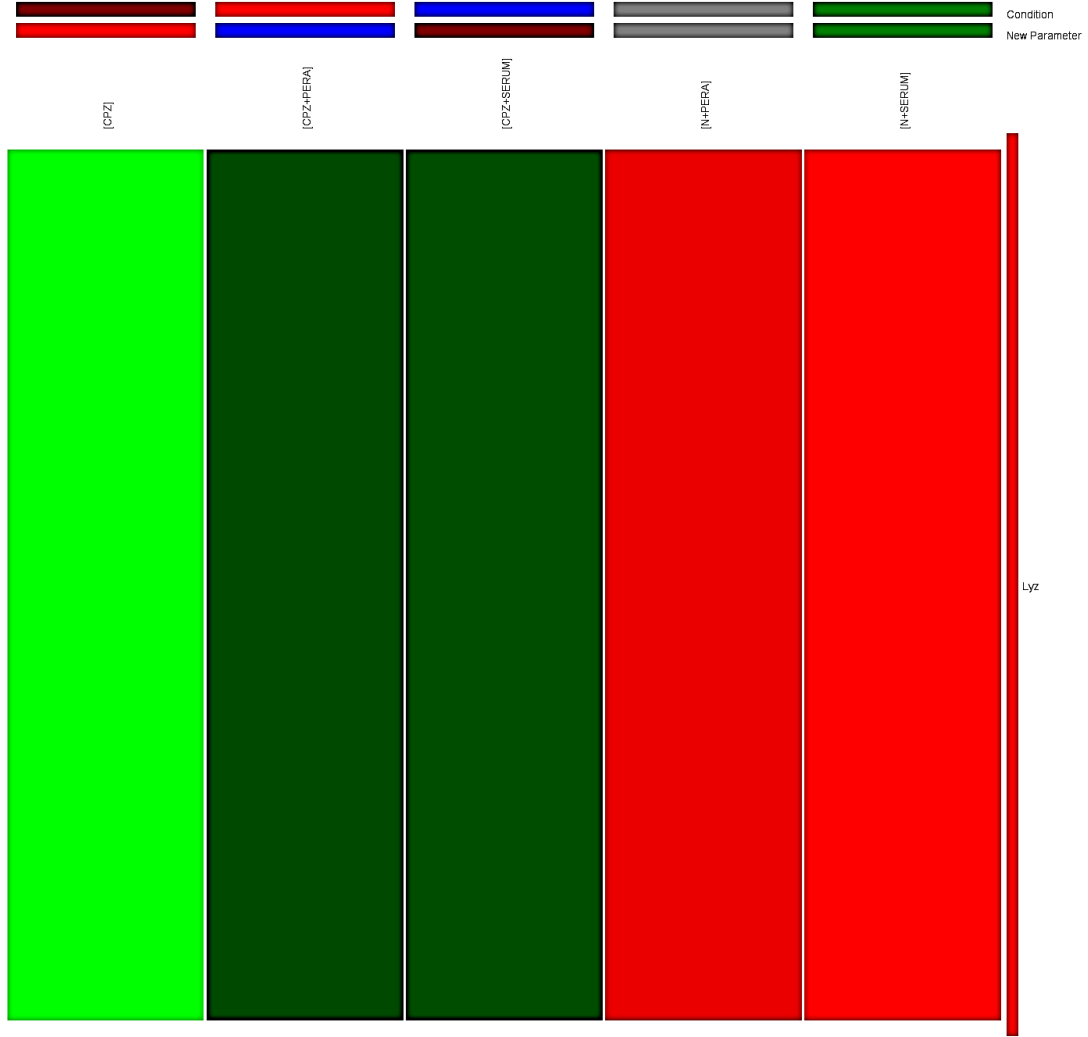
Şekil 4.15. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Grup 6 (CPZ+Serum vs N+Serum)

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 1 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı. Ekspresyonu azalan prob tespit edilmedi. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.13. CPZ+Serum vs N+Serum Yukarı regüle problemlerin listesi

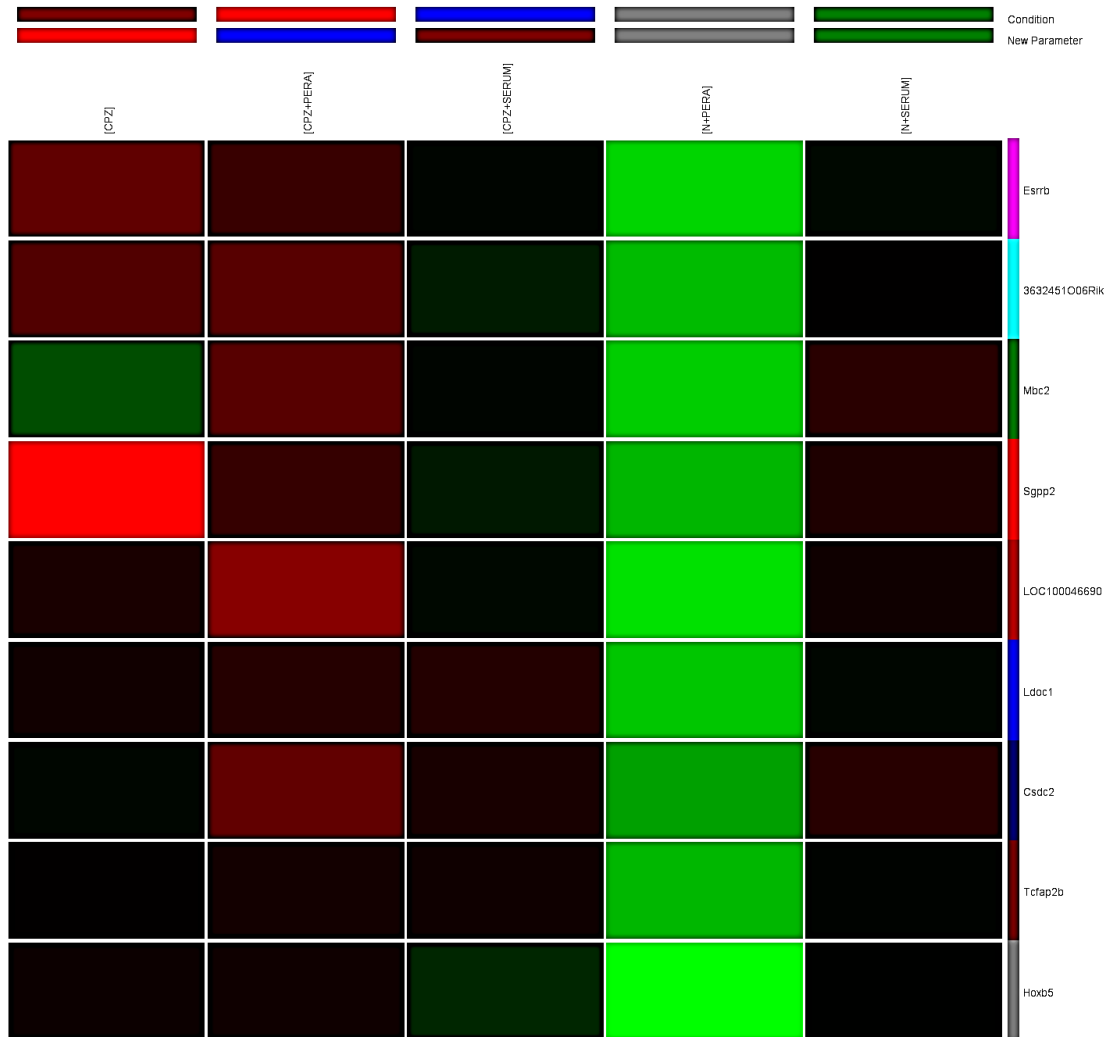
ProbeID	KD ([CPZ+SERU M] vs [N+SERUM])	Log KD ([CPZ+SERU M] vs [N+SERUM])	KD (abs) ([CPZ+SERU M] vs [N+SERUM])	Regulation ([CPZ+SERU M] vs [N+SERUM])	Symbol
5720609	3.773114	1.915756	3.773114	Yukarı	Lyz

**Şekil 4.16.** CPZ+Serum vs N+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası**Grup 7 (N+Pera vs N+Serum)**

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. KD değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. Filtrelenmiş örneklerden KD analizi sonucunda, 9 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttı, 26 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldı. Yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası Şekil 4.17.'de, aşağı regüle problemlerin Şekil 4.18.'de gösterilmiştir.

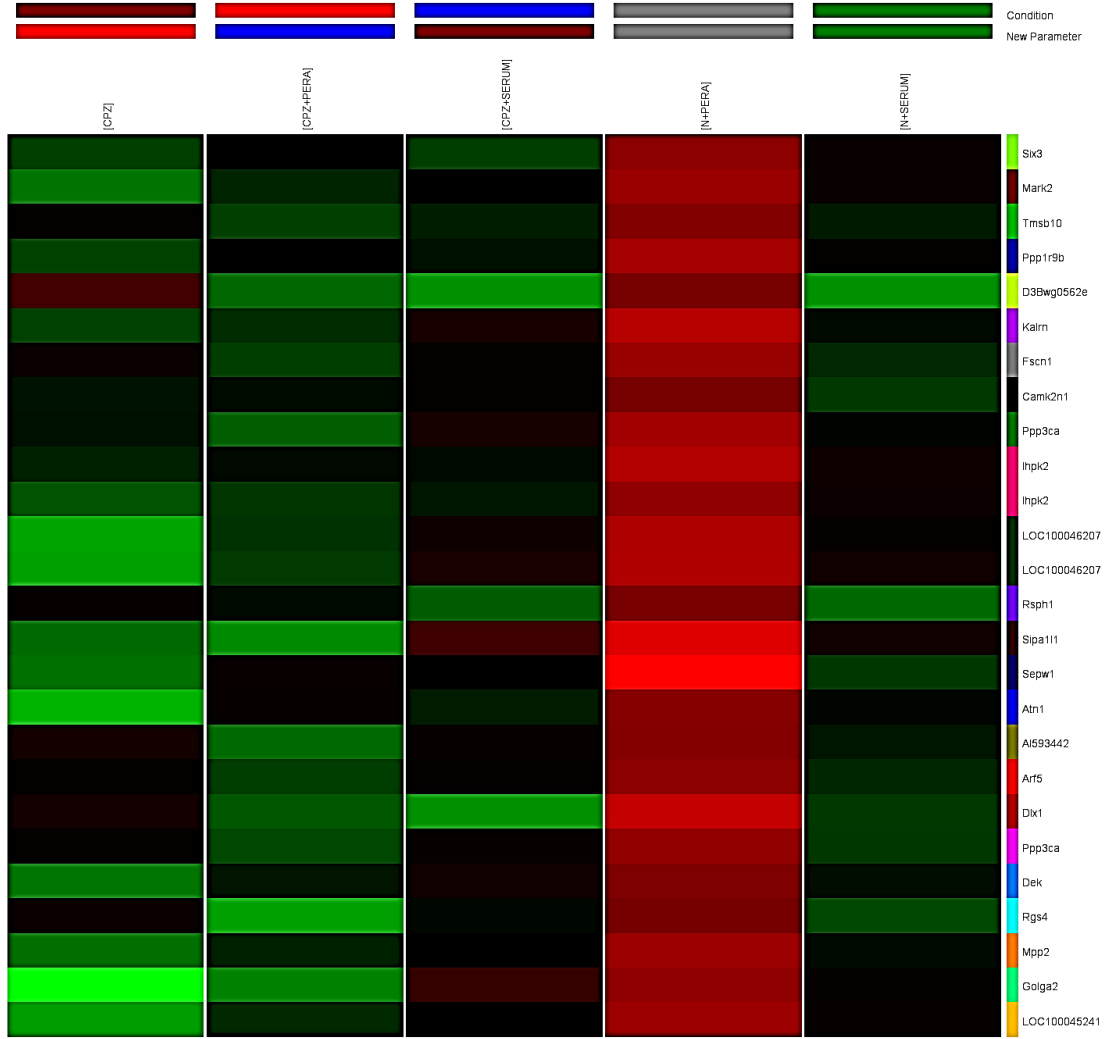
Tablo 4.14. N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Log KD ([N+PERA] vs [N+SERUM])	KD (abs) ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Regulation ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Symbol
7150017	2.341885	1.22767	2.341885	Yukarı	Esrrb
10592	2.175961	1.121653	2.175961	Yukarı	3632451006 Rik
770477	2.496186	1.319725	2.496186	Yukarı	Mbc2
4230605	2.228742	1.15623	2.228742	Yukarı	Sgpp2
6650424	2.609524	1.383787	2.609524	Yukarı	LOC1000466 90
6110500	2.218632	1.149671	2.218632	Yukarı	Ldoc1
3710411	2.067761	1.048069	2.067761	Yukarı	Csdc2
2760451	2.120562	1.084446	2.120562	Yukarı	Tcfap2b
5130136	2.877145	1.524638	2.877145	Yukarı	Hoxb5

**Şekil 4.17.** N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemlerin sıcaklık haritası

Tablo 4.15. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemlerin listesi

ProbeID	KD ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Log KD ([N+PERA] vs [N+SERUM])	KD (abs) ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Regulation ([N+PERA] vs [N+SERUM])	Symbol
6220095	-2.01309	-1.00942	2.013095	aşağı	Six3
1660523	-2.18082	-1.12487	2.180821	aşağı	Mark2
5130273	-2.09959	-1.07011	2.099591	aşağı	Tmsb10
1260736	-2.36041	-1.23904	2.360411	aşağı	Ppp1r9b
3850180	-2.43667	-1.28491	2.436672	aşağı	D3Bwg0562e
1240014	-2.69875	-1.43229	2.698749	aşağı	Kalrn
4540221	-2.42577	-1.27844	2.425773	aşağı	Fscn1
6330195	-2.07806	-1.05523	2.078055	aşağı	Camk2n1
2140528	-2.38639	-1.25483	2.386391	aşağı	Ppp3ca
7550441	-2.39721	-1.26135	2.397207	aşağı	Ihpk2
4070358	-2.03144	-1.0225	2.031436	aşağı	Ihpk2
620239	-2.49109	-1.31678	2.49109	aşağı	LOC100046207
1400746	-2.34299	-1.22835	2.342987	aşağı	LOC100046207
4760066	-2.27804	-1.1878	2.278045	aşağı	Rsph1
6760661	-2.98597	-1.5782	2.985972	aşağı	Sipa1l1
7400392	-4.28341	-2.09876	4.283408	aşağı	Sepw1
4070431	-2.07573	-1.05362	2.075734	aşağı	Atn1
4230768	-2.10415	-1.07324	2.10415	aşağı	AI593442
1570398	-2.26371	-1.17869	2.263706	aşağı	Arf5
2030592	-3.13461	-1.64829	3.134609	aşağı	Dlx1
6450082	-2.41558	-1.27237	2.415584	aşağı	Ppp3ca
4490286	-2.00289	-1.00208	2.002892	aşağı	Dek
4780128	-2.12721	-1.08896	2.127211	aşağı	Rgs4
2470239	-2.3434	-1.22861	2.343403	aşağı	Mpp2
2340441	-2.0943	-1.06647	2.094305	aşağı	Golga2
4640689	-2.22478	-1.15366	2.22478	aşağı	LOC100045241



Şekil 4.18. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemlerin sıcaklık haritası

4.2.6. Yolak Analizleri

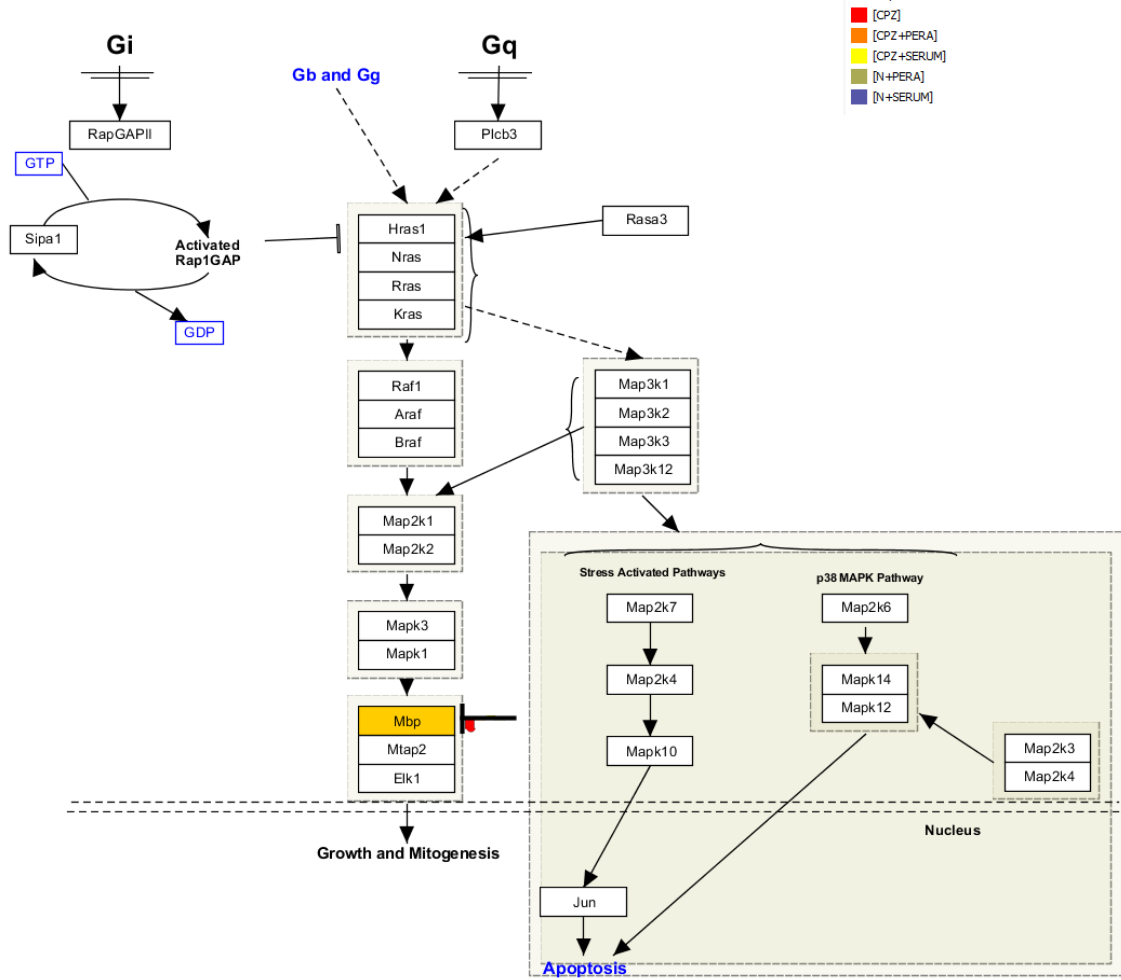
Kontrol grubuna göre 2 ve daha fazla kat değişimi gösteren problemler ile yolak analizi yapıldı. Bu analiz sonucu yolaktaki eşleşen üye sayısı ve anlamlılık değerleri bulundu. p değeri 0.05'den küçük olan yolaklar anlamlı kabul edildi.

Grup 1 (CPZ+Pera vs CPZ)

Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 1 adet, aşağı regüle problemlerin analizinde 4 adet yolağın etkilendiği görüldü. Yukarı ve aşağı regüle problemlerin etkiledikleri yolaklar Tablo 4.16. ve Tablo 4.17'de belirtilmiştir.

Tablo 4.16. CPZ+Pera vs CPZ yukarı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
MAPK_Yolağı_WP251_71729	0.006172	1	29

**Şekil 4.19.** MAPK Yolağı

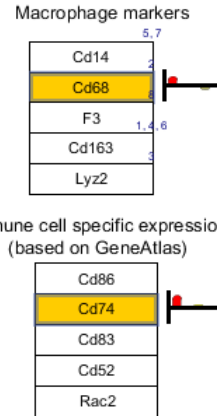
Name	DB	DB ID	[CPZ]	[CPZ+PERA]	[CPZ+SERUM]	[N+PERA]	[N+SERUM]
Sipa1	Entrez_Gene_ID	20469	0.002	0.025	-0.08	0.028	0.004
Plcb3							
Rasa3							
Hras1	Entrez_Gene_ID	15461	-0.058	0.344	0.045	-0.222	0.056
Nras	Entrez_Gene_ID	18176	-0.179	-0.048	0.258	-0.02	0.043
Rras	Entrez_Gene_ID	20130	0.232	-0.045	0.088	-0.05	-0.123
Kras	Entrez_Gene_ID	16653	0.019	0.016	-0.031	-0.095	-0.006
Raf1	Entrez_Gene_ID	110157	0.071	-0.039	-0.014	0.359	-0.003
Araf	Entrez_Gene_ID	11836	-0.111	-0.15	0.061	0.117	-0.023
Braf							
Map3k1	Entrez_Gene_ID	26401	-0.062	0.015	0.031	-0.002	-0.043
Map3k2	Entrez_Gene_ID	26405	0.016	0.017	-0.009	0.051	-0.018
Map3k3	Entrez_Gene_ID	26406	0.443	0.093	-0.206	-0.151	-0.063
Map2k1	Entrez_Gene_ID	26395	0.182	0.278	-0.211	-0.124	-0.057
Map2k2	Entrez_Gene_ID	26396	0.072	-0.062	-0.018	0.062	-0.014
Mapk3	Entrez_Gene_ID	26417	0.169	-0.004	-0.017	-0.191	0.024
Mapk1	Entrez_Gene_ID	26413	-0.076	0.224	0.018	-0.358	0.091
Mbp	Entrez_Gene_ID	17196	-0.714	-0.014	0.148	-0.054	0.078
Mtap2	Entrez_Gene_ID	17756	0.086	-0.085	-0.03	-0.484	-0.004
Elk1							
Map2k7	Entrez_Gene_ID	26400	0.007	-0.09	-0.03	0.117	-0.028
Map2k4	Entrez_Gene_ID	26398	-0.286	-0.059	0.018	-0.042	0.045
Mapk10	Entrez_Gene_ID	26414	-0.001	0.023	-0.006	0.102	0.036
Map2k6	Entrez_Gene_ID	26399	-0.01	-0.002	-0.014	0.014	0.061
Mapk14	Entrez_Gene_ID	26416	-0.087	0.077	-0	0.062	0.053
Map2k3	Entrez_Gene_ID	26397	0.442	-0.151	-0.044	0.114	-0.133
Jun	Entrez_Gene_ID	16476	-0.049	-0.077	-0.095	0.179	0.037
Map3k12	Entrez_Gene_ID	26404	0.005	-0.018	-0.026	0.165	-0.031
Mapk12	Entrez_Gene_ID	29857	0.029	-0.045	-0.033	0.403	-0.04

Find: Match Case

Şekil 4.20. MAPK Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi

Tablo 4.17. CPZ+Pera vs CPZ aşağı regüle problemler ile etkilenen yollar

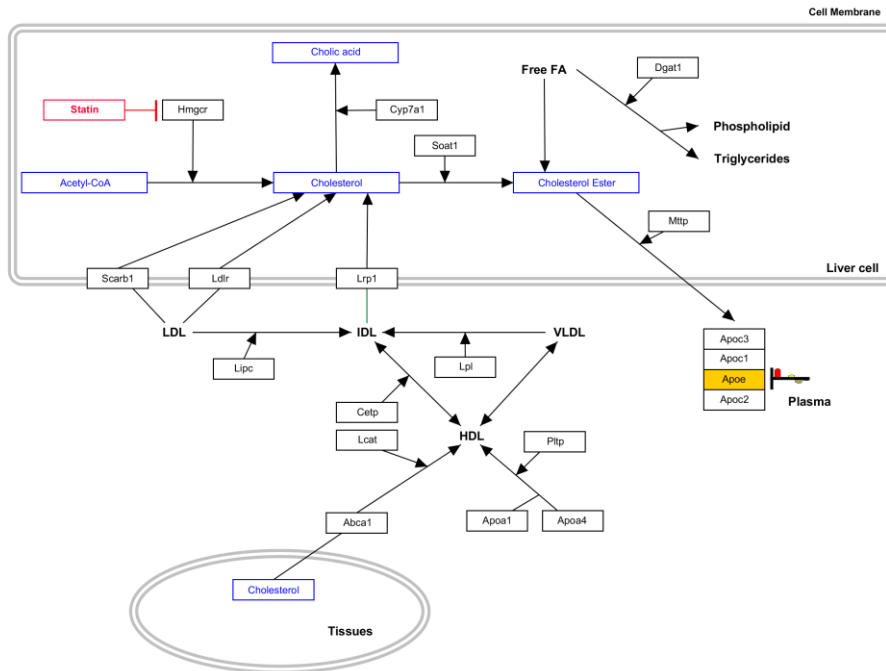
Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Makrofaj Belirteç Yolağı_WP2271_69962	4.28E-06	2	10
Statin Yolağı_WP1_73346	0.005925	1	20
Toll Benzeri Reseptör Sinyal Yolağı_WP1271_69089	0.029319	1	97
Myometrial_Durulma_and_Kasılma_Yolağı_WP385_72108	0.045597	1	157



Şekil 4.21. Makrofaj Belirteç Yolağı

Name	DB	DB ID	[CPZ]	[CPZ+PERA]	[CPZ+SERUM]	[N+PERA]	[N+SERUM]
Cd14	Entrez_Gene_ID	12475	0.827	0.107	0.088	-0.127	-0.074
Cd83	Entrez_Gene_ID	12522	0.138	-0.347	0.114	0.887	-0.285
Cd68	Entrez_Gene_ID	12514	1.252	0.188	0.055	-0.465	-0.165
F3	Entrez_Gene_ID	14066	0.019	-0.049	-0.014	0.082	-0.012
Cd163	Entrez_Gene_ID	93671	0.043	-0.018	-0.028	-0.007	-0.001
Cd86	Entrez_Gene_ID	12524	0.389	0.048	0.041	-0.211	-0.05
Cd74	Entrez_Gene_ID	16149	1.526	0.101	0.335	-0.277	-0.238
Cd52	Entrez_Gene_ID	23833	1.221	0.283	0.445	-0.44	-0.486
Rac2	Entrez_Gene_ID	19354	0.115	0.035	0.028	-0.055	0.001
Lyz2	Entrez_Gene_ID	17105	0.5	0.154	0.183	-0.325	-0.417

Şekil 4.22. Makrofaj Belirteç Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi



Şekil:4.23. Statin Yolağı

Name	DB	DB ID	[CPZ]	[CPZ+PERA]	[CPZ+SERUM]	[N+PERA]	[N+SERUM]
Hmgcr							
Cyp7a1	Entrez_Gene_ID	13122	0.006	0.01	-0.019	-0.053	0.048
Soat1	Entrez_Gene_ID	20652	0.394	-0.007	0.255	-0.08	-0.141
Mttp	Entrez_Gene_ID	17777	-0.008	-0.016	-0.028	0.008	0.001
Dgat1	Entrez_Gene_ID	13350	0.127	-0.081	0.059	0.194	-0.018
Ldlr	Entrez_Gene_ID	16835	-0.04	-0.016	-0.007	0.009	0.023
Lrp1	Entrez_Gene_ID	16971	0.335	0.017	0.004	-0.029	-0.116
Lpl	Entrez_Gene_ID	16956	0.083	0.318	0.107	-1.584	-0.167
Lipc	Entrez_Gene_ID	15450	0.01	-0.029	0.027	-0.002	0.043
Cetp							
Lcat	Entrez_Gene_ID	16816	-0.114	-0.196	0.035	0.414	-0.053
Abca1	Entrez_Gene_ID	11303	0.048	-0.003	-0.055	0.01	-0.037
Pitp	Entrez_Gene_ID	18830	-0.075	0.031	0.045	-0.09	0.018
Apoa1	Entrez_Gene_ID	11806	0.136	-0.048	-0.045	0.04	-0.049
Apoa4	Entrez_Gene_ID	11808	0.007	-0.005	-0.071	-0.016	0.009
Apoc1	Entrez_Gene_ID	11812	0.901	-0.203	0.047	-0.078	-0.065
Apoe	Entrez_Gene_ID	11816	0.934	-0.07	0.349	-0.451	-0.203
Apoc2	Entrez_Gene_ID	11813	-0.039	0.026	-0.062	-0.007	-0.008
Apoc3	Entrez_Gene_ID	11814	0.093	-0.064	0.051	-0.141	0.035
Scarb1	Entrez_Gene_ID	20778	0.066	0.011	0.023	0	-0.004

Şekil 4.24. Statin Yolağındaki Genlerin Gruplara Göre Değişimi

Grup 2 (CPZ vs CPZ+Serum)

Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 5 adet, aşağı regüle problemlerin analizinde 7 adet yolağın etkilendiği görüldü. Yukarı ve aşağı regüle problemlerin etkiledikleri yollar Tablo 4.18. ve Tablo 4.19.'da belirtilmiştir.

Tablo 4.18. CPZ vs CPZ+Serum yukarı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Makrofaj Belirteç Yolağı_WP2271_69962	4.28E-06	2	10
Sfingosin ve sfingosin-1-fosfat metabolizması	0.002966	1	9
S1P Reseptör Sinyal Uyum Yolağı_WP57_69159	0.006253	1	22
Toll Benzeri Reseptör Sinyal Yolağı_WP1271_69089	0.029319	1	97
Myometrial_Durulma_and_Kasılma_Yolağı_WP385_72108	0.045597	1	157

Tablo 4.19. CPZ vs CPZ+Serum aşağı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yol	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
SIP ve spinal kord hasar yolağı_WP2170_72023	8.66E-04	1	6
SIP Reseptör Sinyal Uyum Yolağı _WP57_69159	0.005474	1	22
MAPK yolağı WP251_71729	0.007197	1	29
Sirkadiyen Ortholog ile Günlük Düzenleyici Genler_WP1268_70180	0.013208	1	48
Egzersizle İndüklenen Sirkadiyen Düzenleme_WP544_69890_WP544_69890	0.013493	1	49
Aktin Hücre İskelet Düzenlemesi_WP523_71326	0.038897	1	151
GPCRs,_ WP41_71332	0.041684	1	210

Grup 3 (N+Serum vs CPZ)

Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 4 adet, aşağı regüle problemlerin analizinde 3 adet yolağın etkilendiği görüldü. Yukarı ve aşağı regüle problemlerin etkiledikleri yollar Tablo 4.20. ve Tablo 4.21.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.20. N+Serum vs CPZ yukarı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yol	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Sirkadiyen Ortholog ile Günlük Düzenleyici Genler_WP1268_70180	0.013208	1	48
Aktin Hücre İskelet Düzenlemesi _WP523_71326	0.038897	1	151
Egzersizle İndüklenen Sirkadiyen Düzenleme_WP544_69890	0.013493	1	49
MAPK_Yolağı_WP251_71729	0.007197	1	29

Tablo 4.21. N+Serum vs CPZ aşağı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yol	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Mm_Statin_Yolağı_WP1_73346	0.012551	1	20
Oksidatif Stres Yolağı_WP412_69190	0.016011	1	29
Makrofaj Belirteç Yolağı_WP2271_69962	3.43E-08	3	10

Grup 4 (CPZ+Pera vs CPZ+Serum)

Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. Analiz sonrası etkilenen yolak bulunamadı.

Grup 5 (CPZ+Pera vs N+Pera)

Kontrol grubu olarak N+Pera seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 8 adet, aşağı regüle problemlerin analizinde 1 adet yolağın etkilendiği görüldü. Yukarı ve aşağı regüle problemlerin etkiledikleri yolaklar Tablo 4.22. ve Tablo 4.23.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.22. CPZ+Pera vs N+Pera yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar

Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
FAS yolağı ve Stres Nedenli HSP düzenlemesi _WP571_71736	0.046587	1	38
G13_Sinyal_Yolağı_WP298_75845	0.046587	1	38
Folik Asit Ağı_WP1273_74467	0.024269	1	27
Mitokondriyel Gen Ekspresyonu_WP1263_71748	0.024269	1	19
G_Protein_Sinyal_Yolağı_WP232_71315	0.005818	2	91
Serotonin ve Anksiyete İlişkili Genler_WP2140_71746	0.002885	1	13
Triaçilgliserol Biyosentezi	0.024269	1	19
Fosfat Yakalama II	0.022857	1	17

Tablo 4.23. CPZ+Pera vs N+Pera aşağı regüle problemler ile etkilenen yolaklar

Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Çekirdeksel Reseptörler_WP509_69979	0.025678	1	38

Grup 6 (CPZ+Serum vs N+Serum)

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. Analiz sonrası etkilenen yolak bulunamadı.

Grup 7 (N+Pera vs N+Serum)

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 1 adet, aşağı regüle problemlerin analizinde 6 adet yolağın etkilendiği görüldü. Yukarı ve aşağı regüle problemlerin etkiledikleri yolaklar Tablo 4.24. ve Tablo 4.25. 'de belirtilmiştir.

Tablo 4.24. N+Pera vs N+Serum yukarı regüle problemler ile etkilenen yolaklar

Yolak	p değeri	Eşleşen Gen	Yolakta Bulunan Genler
Çekirdeksel Reseptörler__WP509_69979	0.01292	1	38

Tablo 4.25. N+Pera vs N+Serum aşağı regüle problemler ile etkilenen yollar

Yol	p değeri	Eşleşen Gen	Yolda Bulunan Genler
Folik Asit Ağı _WP1273_74467	0.018082	1	27
Mitokondriyel Gen Ekspresyonu _WP1263_71748	0.018082	1	19
Selenyum Metabolizması ve Selenoproteinler	0.039984	1	48
Serotonin ve Anksiyete İlişkili Genler _WP2140_71746	0.002144	1	13
Triasilgliserol Biyosentezi	0.018082	1	19
Fosfat Yakalama II	0.017027	1	17

4.2.7. Gen Ontolojisi (GO) Analizleri

KD analizi sonucu elde edilen problemleri fonksiyonlarına göre sınıflandırabilmek için GO (Gene Ontology) analizi uygulandı. P değeri 0,1'den düşük olanlar anlamlı olarak kabul edildi. GO analizi sonucu hücre yapısına katılanlar, biyolojik işleyiş katılanlar ve moleküler fonksiyonu olanlar görevlerine göre listelendi.

Grup 1 (CPZ+Pera vs CPZ)

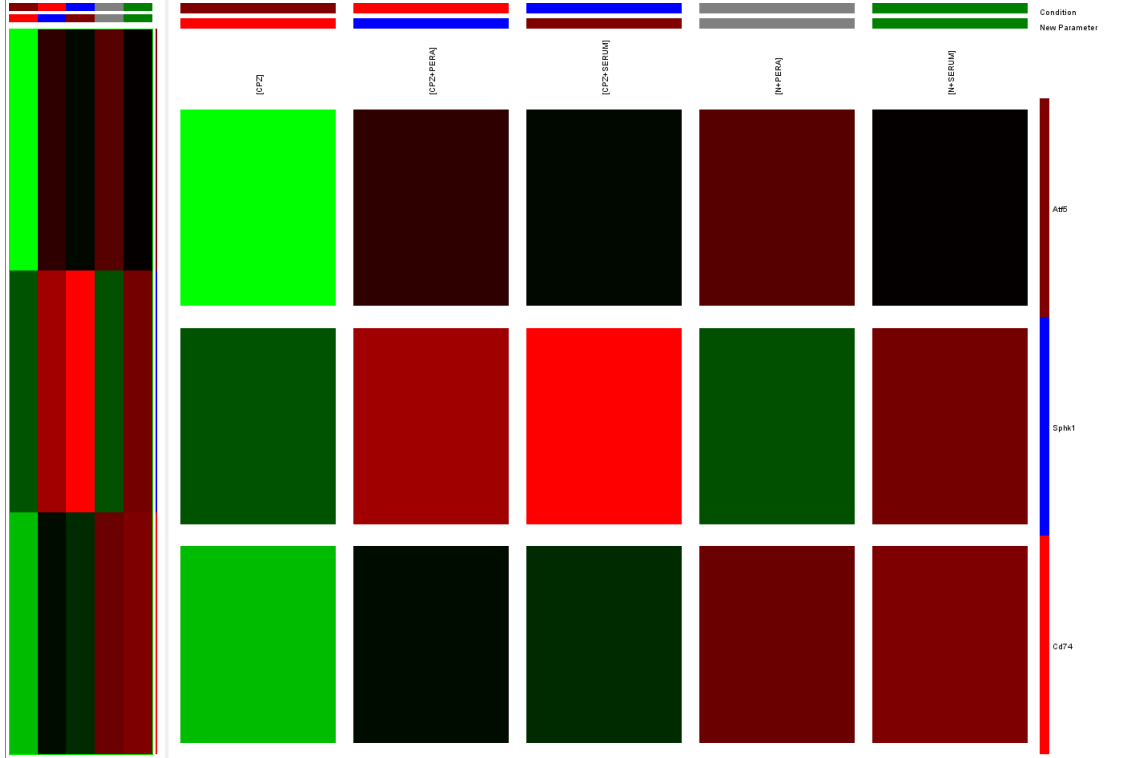
Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD analizi sonucu yukarı ve aşağı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı..

Grup 2 (CPZ vs CPZ+Serum)

Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 6 adet ontoloji saptandı. Yukarı regüle problemlerin rol aldıkları ontolojiler Tablo 4.26.'da belirtilmiştir. "Apoptotik Süreçlerin Negatif Düzenlemesi" Ontolojisinin değişim sıcaklık grafiği Şekil 4.27.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.26. Yukarı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi

GO ERİŞİMİ	GO Terim	p değeri
GO:0060548	Hücre ölümünün negatif düzenlemesi	0.015053
GO:0043069 GO:0043072	Programlı hücre ölümünün negatif düzenlemesi	0.015053
GO:0043066 GO:0006916	Apoptotik Süreçlerin Negatif Düzenlemesi	0.015053
GO:0042981	Apoptotik Süreçlerin Düzenlemesi	0.049004
GO:0043067 GO:0043070	Programlı hücre ölümünün düzenlemesi	0.049004
GO:0010941	hücre ölümünün düzenlemesi	0.049004



Şekil 4.27. Apoptotik Süreçlerin Negatif Düzenlemesi Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiği

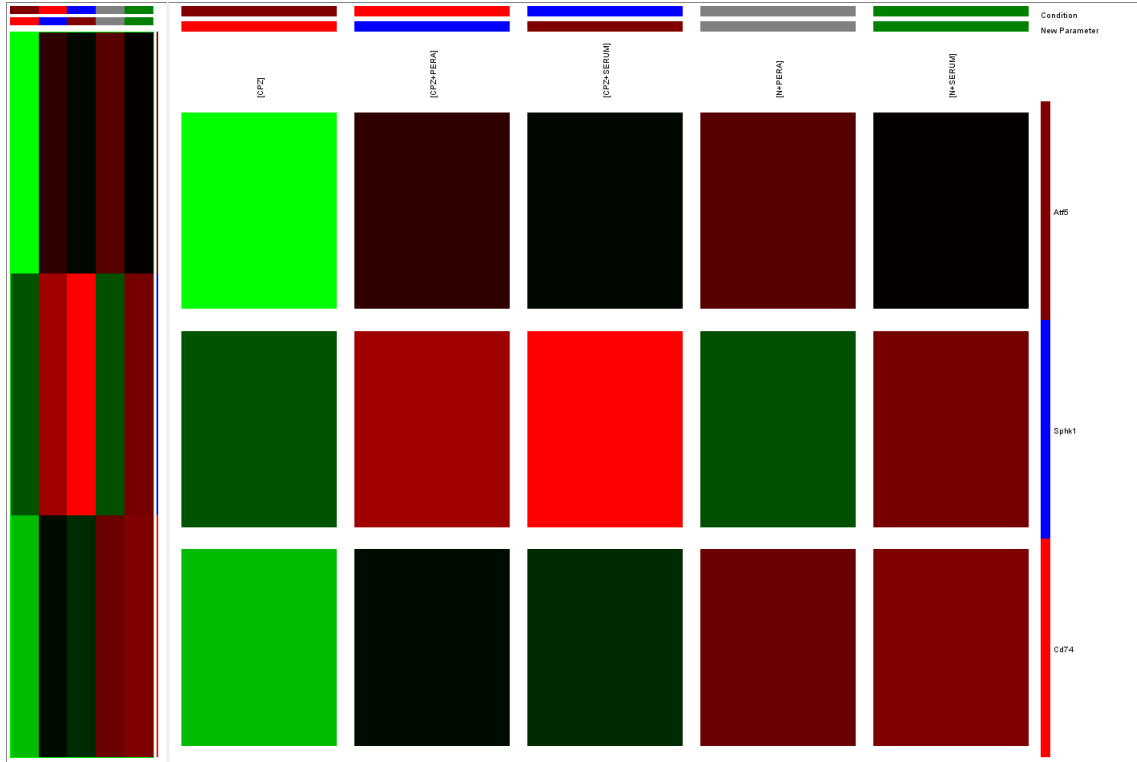
Grup 3 (N+Serum vs CPZ)

Kontrol grubu olarak CPZ seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı, aşağı regüle problemlerin analizinde 16 adet ontoloji saptandı. Aşağı regüle problemlerin rol aldıkları ontolojiler Tablo 4.27.'de belirtilmiştir. Biyolojik işleyişte yer alan “fagositozun pozitif düzenlemesi” ontolojisinin sıcaklık grafiği Şekil 4.28.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.27. Aşağı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi

GO ERIŞİMİ	GO Terim	p değeri
GO:0000323	Litik koful	0.006588
GO:0005764	lizozom	0.006588
GO:0005773	koful	0.008024
GO:0010324	Membran katlanması (invagination)	0.029739
GO:0006911	fagositoz	0.029739
GO:0051179	lokalisasyon	0.032131

GO:0009897	Plazma membranının dış kısmı	0.032131
GO:0050764	Fagositoz düzenlemesi	0.032131
GO:0050766	Fagositoz pozitif düzenlemesi	0.032131
GO:0098552	Membran kenarı	0.032131
GO:0045807	positive regulation of endocytosis	0.044849
GO:0006810 GO:0015457 GO:0015460	transport	0.087093
GO:0051234	establishment of localization	0.087093
GO:0006909	phagocytosis	0.089526
GO:0030100	regulation of endocytosis	0.089526
GO:0009986 GO:0009928 GO:0009929	cell surface	0.089526



Şekil 4.28. Fagositozun Pozitif Düzenlemesi Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiği

Grup 4 (CPZ+Pera vs CPZ+Serum)

Kontrol grubu olarak CPZ+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı ve aşağı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı.

Grup 5 (CPZ+Pera vs N+Pera)

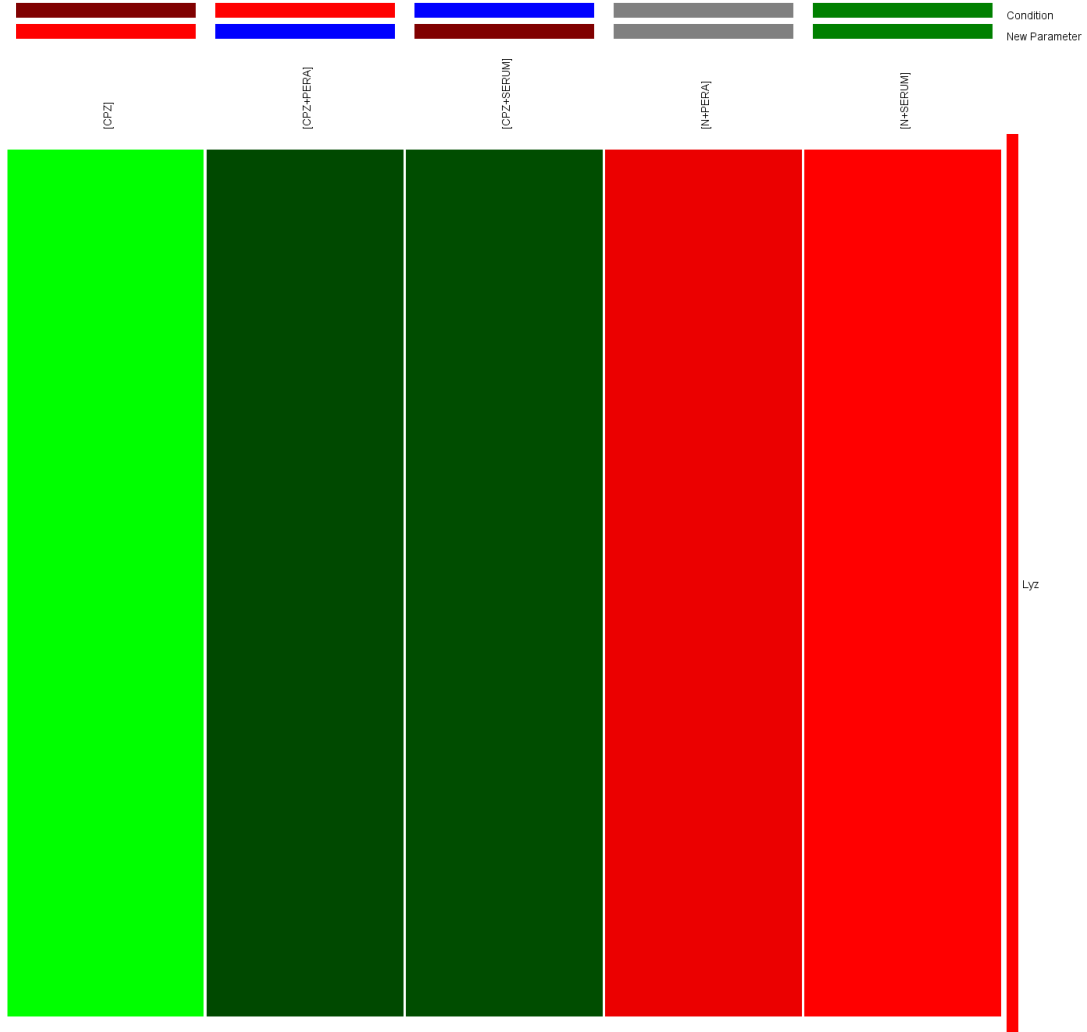
Kontrol grubu olarak N+Pera seçildi KD analizi sonucu yukarı ve aşağı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı.

Grup 6 (CPZ+Serum vs N+Serum)

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı regüle problemlerin analizinde 3 ontoloji saptanırken, aşağı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı. Yukarı regüle problemlerin rol aldıkları ontolojiler Tablo 4.28.’de belirtilmiştir. “Lizozim Aktivitesi” Ontolojisinin değişim sıcaklık grafiği Şekil 4.29.’de gösterilmiştir.

Tablo 4.28. Yukarı Regüle Problemlerin Ortak Ontoloji Bölgesi

GO ERIŞİMİ	GO Terim	p değeri
GO:0003796	Lizozom aktivitesi	0.028759
GO:0019835	sitoliz	0.030357
GO:0016798	Hidrolaz aktivitesi, glikozil bağlarına etkiliyor	0.075891
GO:0004553 GO:0016800	Hidrolaz aktivitesi, O- glikozil bileşimini hidroliz ediyor	0.075891



Şekil 4.29. "Lizozim Aktivitesi" Ontolojisinin Değişim Sıcaklık Grafiği

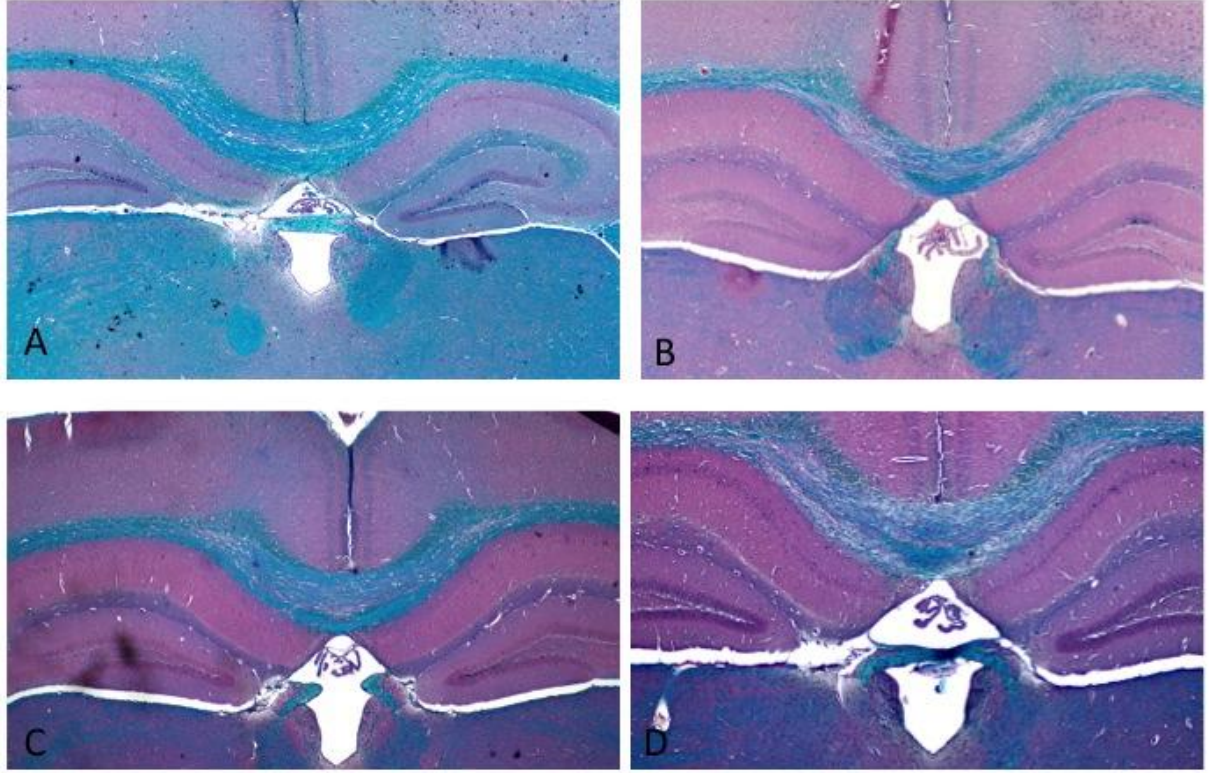
Grup 7 (N+Pera vs N+Serum)

Kontrol grubu olarak N+Serum seçildi. KD analizi sonucu yukarı ve aşağı regüle problemlerin analizinde ortak bir ontoloji bulunamadı.

4.3. Histolojik Değerlendirme

LFB ve H&E boyama sonrası kesitlerin boyama görüntüleri Şekil 4.30.'da gösterilmiştir. Bu bulgular 2 araştırmacı tarafından bağımsız olarak değerlendirildi ve korpus kallosum bölgesindeki miyelinlerin Tablo 4.29.'da skorlaması yapıldı. İstatistiksel değerlendirme Şekil 4.31'de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için eşli olmayan t-test kullanıldı. P değeri 0,05'den düşük değerler anlamlı olarak kabul edildi. Bu sonuçlara göre normal diyet uygulanan hayvanlarda miyelin miktarının yüksek olduğu, bu gruba perampanel uygulamasının herhangi bir etki yapmadığı

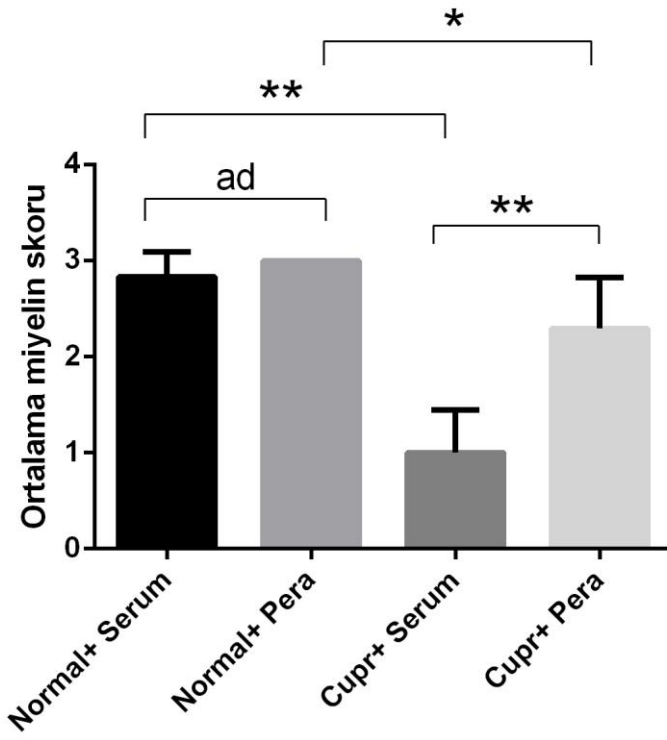
görüldü. Kuprizon grubunda miyelin miktarının anlamlı derecede azaldığı gösterildi. Kuprizon uygulamasından sonra perampanel uygulanan farelerde miyelin miktarının serum uygulanan gruba göre anlamlı derecede arttığı gösterildi.



Şekil 4.30. Kesitlerin Histolojik Değerlendirme Sonuçları (A,B,C ve D sırasıyla N+Serum, CPZ+Serum, N+Pera, CPZ+Pera gruplarına karşılık gelmektedir.)

Tablo 4.29. Alınan kesitlerin miyelin skorum sonuçları

	A	B	C	D
	N+Serum	CPZ+Serum	N+ Pera	CPZ+Pera
1	3	1	3	1.5
2	3	0.5	3	2
3	3	1.5	3	2
4	3	1	3	2.75
5	2.5	0.5	3	2.75
6	2.5	1.5	3	2.75



Şekil 4.31. Histolojik değerlendirme sonuçları. (ad $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kuprizon ile demiyelinizasyon modeli oluşturuldu. Kuprizon modelinin seçilme nedeni, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerinin ayırt edilebilmesinin kolay olması ve immün sistemden bağımsız olmasıdır. Bu amaçla 8 haftalık erkek fareler, 5 hafta kuprizon diyetinin ardından normal diyete alındı. Kontrol grubuna ve model oluşturulan gruba perampanel verilerek tüm genom ekspresyon profilinde ve dokularında gerçekleşen değişimler izlendi. Bundan sonraki çalışmalara yön vermesi açısından çalışmamızın başlangıç aşamasında mikrodizin platformu seçildi ve Illumina iScan Mikrodizin Platformu tercih edildi. Elde edilen veriler kalite kontrol, filtreleme, istatistiksel analizler ve fonksiyonel analizler basamaklarından geçirildi. İki farklı grup arasında ifadesi anlamlı olarak değişen genler tespit edilip, bu genler sayesinde uygulanan farmakolojik ajanın etkileri anlaşılmaya çalışıldı. MS ve kontrol grupları gen ekspresyonu sonuçları, histolojik çalışmalar ile karşılaştırılarak yorumlandı.

Kuprizon uygulanan grupta, uygulama süresince beklenildiği gibi kilo kaybı gözlemlendi. 5 haftalık kuprizon diyetinden sonra, 2 haftalık normal diyetle de beklenen ağırlık artışı görüldü (Hiremath, Saito et al. 1998) (Wergeland, Torkildsen et al. 2011). Ancak perampanel uygulanan gruplar ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmaması perampanelin kilo üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını gösterdi.

Ekspresyon mikrodizin sonuçlarından, miyelin kılıfın yapısını oluşturan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinin, kuprizon verilen grupta sağlıklı gruba göre düşük olması beklenir (Gudi, Moharreggh-Khiabani et al. 2009). Bu yönde elde ettiğimiz veriler Proteolipid Protein (PLP), Miyelin Temel Proteini (MBP) ve Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini (MOG) seviyelerinin beklenildiği gibi kuprizonlu gruplarda anlamlı şekilde düştüğünü gösterdi.

Mikrodizin sistemi ile yapılan tüm genom ekspresyon profillemesinde 5 farklı grup ile 7 karşılaştırma grubu oluşturuldu. Gruplar arasında istatistiksel anlamlılığı yüksek olan problemler karşılaştırıldı ve 2 kat ve üzerinde değişim gösterenler anlamlı kabul edildi.

Mikrodizin gen ekspresyon analiz verilerine göre CPZ ile CPZ+Serum karşılaştırmasında, CPZ ile CPZ+Pera karşılaştırması ile MBP, KCNAB, TMEM10, Hist1h2be gen ekspresyonları CPZ grubunda ortak olarak azalmış, Cd68, CLEC7a, ATF5, CD74, NUPR1 ve CCL4 gen ekspresyonları CPZ grubunda ortak olarak artmıştır.

CPZ grubu ile CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, MBP geni ekspresyonunun sırasıyla 2,08, 2,26 ve 2,21 kat azaldığı bulundu. Santral sinir sisteminde bulunan miyelin kılıfın yapısının %80'ini miyelin temel proteini ve proteolipid proteini (PLP) oluşturur (Price, Sharpe et al. 1997). Demiyelinizasyon sırasında MBP geninin ekspresyonunun azalması beklenen bir durumdur. Remiyelinizasyon fazına geçen gruplara göre düşük olması normaldir. Yolak analizlerimize bakıldığında regülasyonu artan problarda MAPK yolağının etkilendiğini ve bunun da MBP geni ekspresyonunun CPZ grubunda aşırı azalmasından kaynaklandığı görülmektedir. Remiyelinizasyon safhasındaki karşılaştırmada perampanelin MBP gen ekspresyonu üzerine diğer gruplara göre farklı bir etki oluşturmadığını görüldü.

CPZ grubu ile CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, TMEM10 geni CPZ grubunda 4,05, 4,79, 4,21 kat azaldı. TMEM10 transmembran glikoproteinini kodlayan bir genidir ve oligodendrositlerde bulunur. Remiyelinizasyon sırasında oligodendrosit hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlayan kilit rolde bir genidir (Golan, Adamsky et al. 2008). CPZ grubunda çok düşük olması beklenen bir durumdur. Perampanel bu gen üzerinde farklı bir etki oluşturmadı.

KCNAB1 ekspresyonu, CPZ grubu ile CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, sırasıyla 2,63, 2,40 ve 2,38 kat azaldı. Hücrede potasyum kanallarını düzenleyen genlerden olan birisi olan KCNAB1'in kanser çalışmalarında hücre yapışması ve hücre göçü ile ilgisi vardır (Pardo and Stuhmer 2014). Demiyelinizasyon sırasında bu genin ekspresyon seviyesinin azalması beklenen bir durumdur. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

ATF5 geni ekspresyonu CPZ grubu ile CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, sırasıyla 4,27, 3,86 ve 4,06 kat arttı. ATF5 geni bir transkripsiyon faktörüdür ve RAS-MAPK geninin de içerisinde olduğu bir yolağı düzenler. Bu genin ekspresyonu tümör baskılama açısından önemlidir (Sheng, Li et al.

2010). Bu genin ekspresyon seviyesinin CPZ grubunda yüksek olması, hücrelerde yüksek miktarda apoptoz görülmesinin sonucu olabilir. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

Astrositler tarafından üretilen apolipoproteini kodlayan APOE geni, CPZ grubu ile CPZ+Pera ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, sırasıyla 2,05 ve 2,19 kat arttığı görüldü. Apolipoprotein, kolesterolün nöronlara APOE reseptörleri aracılığıyla taşınmasını sağlar (Liu, Kanekiyo et al. 2013). Kuprizonlu grupta remiyelinizasyon hazırlığının olması bu genin aktivitesinin yüksek olmasını açıklar. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

CD68 ekspresyonu CPZ grubunda CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum gruplarına göre sırasıyla 2,08, 2,29 ve 2,66 kat arttı. CD68 makrofajlarda ekspres edilen bir glikoproteindir ve remiyelinizasyon başlangıcında yüksek olması beklenir (Holness and Simmons 1993). Aşağı regüle problemlerin yolak analizi sonuçlarında ise makrofaj belirteçlerinin etkilendiği gördük. CD68 ve CD74 genleri, remiyelinizasyon başlangıç aşamasında makrofajların sayılarının ve belirteçlerinin artması beklendiği için, CPZ grubunda fazla ekspres olmuş olabilir. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

LYZ ekspresyonu, CPZ grubu ile CPZ+Pera, CPZ+Serum ve N+Serum grupları karşılaştırıldığında, sırasıyla 3,43, 3,77 ve 6,79 kat arttı. Artan LYZ aktivasyonu, kuprizonun demiyelizan etkisi sonrası lizozim aktivitesinin artmasını beklediğimiz için normal bir sonuçtur. LYZ geni aktivasyonu gen ontolojisi analizinde lizozim aktivite ontolojisinin anlamlı olarak bulunmasını sağlamıştır. Gen ontolojisi sonucu hücresel lizozom, litik koful gibi yapıların ortak olarak ekspresyonunun artması apoptoz sonucu oluşma ihtimalini güçlendirmektedir.

EDG8 geni ekspresyonu, CPZ+Serum grubunda CPZ'ye göre 2.26 kat artmıştır. EDG8 endotel farklılaşma genidir ve sfingozin-1-fosfat ile aktive olur. Miyelin oluşturan hücrelerin olgunlaşmasında görev alır ve hücrelerin hayatta kalmasını (cell survival) artırır (Jaillard, Harrison et al. 2005). Remiyelinizasyonun sonlarına doğru olgun oligodendrosit miktarının artması ve dolaylı olarak EDG8 gen aktivitesinin artması beklenen bir durumdur. EDG8 aktivasyonu Aktin Hücre İskeleti yolağının da anlamlı bir şekilde değişmesine neden olmuştur. GO analizleri sonucu apoptotik süreçlerle ilgili genlerin değiştiği görülmüştür. ATF5, SPHK1 ve CD74 genlerinin ortak

değişimi sonucu ortaya çıkan bu ontoloji kuprizon diyetinin beklenen sonucudur. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

NCKAP1 geni ekspresyonu, CPZ grubunda N+Serum grubuna göre 2 kat düşük bulduk. NCKAP1 geni baskılandığı zaman nöronal hücrelerin apoptozu indüklendiği gösterilmiştir (Suzuki, Nishiyama et al. 2000). Bu genin ekspresyon seviyesinin CPZ grubunda düşük olması, apoptozu arttıran bir etkiye bağlı olabilir. Bu beklenen bir durumdur. Perampanelin bu gen üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi.

CYBA geni ekspresyonu CPZ grubunda sağlıklı grup olan N+Serum grubuna göre 2.21 kat fazla bulduk. CYBA geni süperoksit anyon oluşum mekanizmasında rol alır ve genellikle fagositik hücrelerde aktivitesi yüksektir. Özellikle nötrofil, makrofaj ve monositlerde aktiftir (Fukui, Lassegue et al. 1995). Kuprizon grubunda inflamasyon etkisi olarak ekspresyonunun fazla olması beklenen bir durumdur. CYBA geninin ekspresyon farklılığı oksidatif stres yolağını etkilemiş ve oksidazların inhibisyonu kolunu etkileyerek olumlu etki oluşturabilir. Aynı şekilde biyolojik süreçlerde fagositoz, endositoz, transport gibi ortak bölgelerin çıkması da apoptoz sonrası yenilenmeyi gösteriyor olabilir.

CENTG1 geni ekspresyonunu CPZ+Pera grubunda, CPZ+Serum grubuna göre 2 kat fazla bulduk. CENTG1 geni Fosfoinositid 3 Kinaz Güçlendirici (PIKE) proteinini kodlar ve sinir hücrelerinin gelişimi için çok önemlidir (Ye, Aghdasi et al. 2002). Öncül oligodendrosit hücrelerinin farklılaşması sırasında ekspresyon seviyeleri artar ve merkezi sinir sisteminin miyelinizasyonu için önemlidir. PIKE geni knock-out yapılmış farelerin korpus kallosum bölgesindeki oligodendrosit sayılarının azaldığı gösterilmiştir. Nöronal aktiviteyi ve hücre sağ kalımını düzenler (Chan, Liu et al. 2014). Yapılan başka bir çalışmada PIKE'nin metabotropik glutamat reseptör 1 (mGlu₁) ile etkileşerek apoptotik hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (Rong, Ahn et al. 2003; Tang, Jang et al. 2008). PIKE proteini, GluA2 alt grubunun yüzey ekspresyonunu kontrol ederek AMPA reseptör aktivitesini regüle eder. Nöron sağ kalımı üzerinde etkilidir (Chan, Chen et al. 2011). MS çalışmalarında daha önce gösterilmemiş olan AMPA reseptör aktivitesi ile ve miyelinizasyonla bağlantılı ve bu genin ekspresyonunun perampanel ile artmış olması, perampanelin remiyelinizasyona katkı sağlayabileceğini ve nöral koruyucu etkisinin olabileceğini ortaya koymaktadır.

CPZ+Pera grubunda CPZ+Serum grubuna göre ekspresyon seviyesi 5,58 kat azalan PMCH geni, pro-melanin konsantr edici hormonu kodlar ve vücut gelişimi için önemli bir hormondur (Shimada, Tritos et al. 1998). CPZ grubunda ve CPZ+Serum grubunda oldukça yüksekken, CPZ+Pera, N+Pera ve N+Serum gruplarında düşük bulunmuştur. Kuprizon verilen hayvanların kilo kayıplarını önlemek için tepki olarak arttığı düşünülebilir. Fakat kurpizondan sonra perampanel uygulanan grupta ekspresyon seviyesinin azalması, perampanelin iştah kapatan bir özelliği olduğunu işaret edebilir.

SIPA1L1 geni ekspresyonu CPZ+Pera grubunda N+Pera grubuna göre 4,16 kat arttı. SIPA1L1 geni hücre iskeletinin yapısında görev alır. Önemli görevlerinde biri dentritik yapıların oluşmasını sağlamaktır (Consortium 2014). Kuprizon uygulamasında hücre yenilenmesinin fazlaca görülmesi hücre iskelet yapısına katılan genlerin ekspresyonunu arttırması beklenmektedir. N+Pera grubunda ise N+Serum'a göre 2,98 kat azalmıştır. Bu durum perampanelin sağlıklı grupta meydana getirdiği istenmeyen etkilerden biridir.

PPP3CA genini N+Pera grubunda CPZ+Pera ve N+Serum gruplarına göre sırasıyla 2,79 ve 2,38 kat düşük bulduk. Kalsinörin proteinini kodlayan bu gen, beyinde ve kaslarda Ca^{2+} /kalmödin miktarını düzenler (Guerini and Klee 1989). Bazı çalışmalar kalsinörin miktarının iskelet kası hipertrofisini arttırdığını ortaya koymuştur. (Musaro, McCullagh et al. 1999) Sitoplazmik Ca^{+2} , kalmödin proteinine bağlanarak kalsinörin fosfatazi aktive eder. Bu enzim NFAT sitozolik transkripsiyon faktörünün inaktif formundan fosfatları ayırır. Defosforilasyon sonucu NFAT, T hücre büyüme faktörlerinden IL2 ve IL2 reseptörlerini kodlayan geni aktive etmek üzere farklılaşır. Perampanel siklosporin benzeri bir etki ile kalsinörine bağlanarak T hücre aktivasyonunu inhibe eden immün baskılayıcı bir etki oluşturabilir (Abbas, Lichtman et al. 2011). Perampanel uygulanan sağlıklı grupta bu genin ekspresyonunun azalması, immün sistem aracılı bir MS modelinde (EAE veya TMEV) perampanel denemesinin önemini göstermektedir.

CPZ+Pera grubunda N+Pera grubuna göre 2,45 kat artış gösteren ARHGDI3 geni Rho protein ailesindedir. Hücrede sinyalizasyon, çoğalma, iskelet yapılıması gibi olaylarda görev alır (Scherle, Behrens et al. 1993). FAS yolağı ve stres nedenli HSP düzenlemesi yolağı ile G13 sinyal yolağını etkiler. Kuprizon etkisinden dolayı artışı normal olarak değerlendirilir.

ESRRB geninin, N+Pera grubunda CPZ+Pera ve N+Serum gruplarına göre sırasıyla 2,64 ve 2,34 kat fazla eksprese olduğu saptandı. Östrojen reseptörleriyle bağlantılı bu genin fare presentası gelişiminde görev aldığı bilinmektedir (Giguere, Yang et al. 1988). Yolak analizinde bu genin ekspresyonunun perampanel tarafından sağlıklı deneklerde anlamlı olarak artırılması, perampanelin “Çekirdek Reseptörleri” yolağını anlamlı derecede etkilediğini göstermektedir. Sperm ilişkili antijeni kodlayan ve N+Pera grubunda CPZ+Pera’ya göre 2,05 kat fazla ekspres edilen SPAG5 geni, stresle indüklenen hücrelerde apoptozu düzenlemekte görev almaktadır (Thedieck, Holzwarth et al. 2013). Bu veriler perampanelin sağlıklı bireylerde beklenmeyen etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir. Makrofaj belirteçleri olan CD68 ve CD74 genlerinin ekspresyon seviyesinin de N+Pera grubunda düşük olması bu hipotezi destekler niteliktedir.

SGPP2 geni ekspresyonu, N+Pera grubunda CPZ+Pera ve N+Serum gruplarına göre sırasıyla 2,31 ve 2,22 kat artış gösterilmiştir. SGPP2 farklı biyolojik süreçleri düzenleyen sfingozin-1-fosfat (S1P) metabolitini kodlar (Ogawa, Kihara et al. 2003). Nötrofillerde, endotel hücrelerinde ve diğer hücre tiplerinde TNFA ve LPS gibi etmenler ile inflamasyonu tetiklediği gösterilmiştir (Mechtcheriakova, Wlachos et al. 2007). Kuprizon olmayan grupta perampanelin SP1 aktivasyonunun arttırması beklenen bir durum değildir.

N+Pera grubunda CPZ+Pera ve N+Serum gruplarına göre ekspresyon seviyesi sırasıyla 3,72 ve 4,28 kat azalan SEPW1 geni bir selenoproteindir ve özellikle kalp ve iskelet kasında ekspres edilir. Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında görev alır (Yeh, Beilstein et al. 1995). Folik Asit ve selenyum metabolizması yolaklarının anlamlı derecede etkilenmesine yol açar. Normal grupta SEPW1 geninin perampanel ile azalması, bu ilacın gelişimi negatif yönde etkileyebileceği gösterir.

Histolojik değerlendirme sonucu, kuprizonun miyelin miktarını diğer gruplara göre anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi. Bunun yanı sıra perampanelin miyelin miktarını CPZ kontrole göre anlamlı derece arttırması, perampanelin remiyelinizasyona olumlu katkılarını doğrular niteliktedir. Sağlıklı gruba perampanel verilmesi yine beklendiği gibi miyelin miktarını etkilemedi.

Çalışmamız sonucunda, kuprizonun miyelin proteinleri üzerine yaptığı demiyelizan etki gösterildi. Perampanel uygulanan kuprizonlu gruplarda ortaya çıkan

etkiler, nöroprotektif etkinin varlığını düşündürmektedir. Histolojik değerlendirme sonuçları da bu durumu desteklemektedir. Ayrıca, perampanelin kuprizonlu gruplarda anlamlı fark yarattığı Fosfoinositid 3 kinaz güçlendirici proteinin (PIKE), AMPA reseptörleri aracılığıyla remiyelinizasyona katkı yaptığı söylenebilir. Bunun yanında, sağlıklı hayvanlarda neden olduğu ekspresyon profil farklılığı, beklenmeyen yan etkilere neden olabileceğini gösterdi. Farklı olarak, perampanelin sağlıklı grupta kalsinörin proteinini kodlayan PPP3CA geninin ekspresyonunu azaltması, immün sistem aracılı bir modelde de iyileştirici etki gösterebileceğini düşündürdü. Gelecekte, bu çalışmalarda bulunan genler farklı yöntemlerle doğrulanarak çalışma sonuçları genişletilebilir. Protein çalışmalarıyla, farklılık gösteren genlerin fenotipte yaptıkları etki daha net gözlemlenebilir. Bu çalışma, daha sonraki çalışmalarımız için kaynak niteliğinde olup, MS'e geniş bir çerçeveden bakma imkânı vermiştir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., A. H. H. Lichtman, et al. (2011). Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access, Elsevier Health Sciences.
- Bleich, S., K. Romer, et al. (2003). "Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action." *Int J Geriatr Psychiatry* **18**(Suppl 1): S33-40.
- Chan, C. B., Y. Chen, et al. (2011). "PIKE-mediated PI3-kinase activity is required for AMPA receptor surface expression." *EMBO J* **30**(20): 4274-4286.
- Chan, C. B., X. Liu, et al. (2014). "PIKE is essential for oligodendroglia development and CNS myelination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(5): 1993-1998.
- Consortium, U. (2014). "Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)." *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue): D191-198.
- Constantinescu, C. S., N. Farooqi, et al. (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)." *Br J Pharmacol* **164**(4): 1079-1106.
- Drew, P. D., J. Xu, et al. (2008). "PPAR-gamma: Therapeutic Potential for Multiple Sclerosis." *PPAR Res* **2008**: 627463.
- Fukui, T., B. Lassegue, et al. (1995). "Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells." *Biochim Biophys Acta* **1231**(3): 215-219.
- Giguere, V., N. Yang, et al. (1988). "Identification of a new class of steroid hormone receptors." *Nature* **331**(6151): 91-94.
- Goodman, L. S. (2011). Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics.
- Goverman, J. (2009). "Autoimmune T cell responses in the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **9**(6): 393-407.
- Gudi, V., D. Moharreh-Khiabani, et al. (2009). "Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination." *Brain Res* **1283**: 127-138.
- Guerini, D. and C. B. Klee (1989). "Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9183-9187.
- Hafler, D. A. (2004). "Multiple sclerosis." *J Clin Invest* **113**(6): 788-794.
- Herrling, P. L. (1992). "Synaptic physiology of excitatory amino acids." *Arzneimittelforschung* **42**(2A): 202-208.
- Hiremath, M. M., Y. Saito, et al. (1998). "Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice." *J Neuroimmunol* **92**(1-2): 38-49.
- http://www.medicinenet.com/multiple_sclerosis_pictures_slideshow/article.htm.
(01.05.2011). " Multiple Sclerosis Pictures Slideshow, Causes, Symptoms and Treatment." from
http://www.medicinenet.com/multiple_sclerosis_pictures_slideshow/article.htm.

- Jaillard, C., S. Harrison, et al. (2005). "Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival." *J Neurosci* **25**(6): 1459-1469.
- Jurevics, H., C. Largent, et al. (2002). "Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination." *J Neurochem* **82**(1): 126-136.
- Liu, C. C., T. Kanekiyo, et al. (2013). "Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy." *Nat Rev Neurol* **9**(2): 106-118.
- Mechtcheriakova, D., A. Wlachos, et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses." *Cell Signal* **19**(4): 748-760.
- Mix, E., H. Meyer-Rienecker, et al. (2008). "Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations." *J Neurol* **255 Suppl 6**: 7-14.
- Murray, T. J. (2009). "The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries." *J Neurol Sci* **277 Suppl 1**: S3-8.
- Musaro, A., K. J. McCullagh, et al. (1999). "IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1." *Nature* **400**(6744): 581-585.
- Nestler, H. P. (2001). "International Proteolysis Society--drug discovery and application." *IDrugs* **4**(12): 1365-1367.
- Ogawa, C., A. Kihara, et al. (2003). "Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2." *J Biol Chem* **278**(2): 1268-1272.
- Oleszak, E. L., J. R. Chang, et al. (2004). "Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis." *Clin Microbiol Rev* **17**(1): 174-207.
- Pardo, L. A. and W. Stuhmer (2014). "The roles of K(+) channels in cancer." *Nat Rev Cancer* **14**(1): 39-48.
- Patel, J. R. and R. S. Klein (2011). "Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination." *FEBS Lett* **585**(23): 3730-3737.
- Robbins, S. L., V. Kumar, et al. (2010). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Saunders/Elsevier.
- Rogawski, M. A. (2011). "Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target." *Epilepsy Curr* **11**(2): 56-63.
- Rogawski, M. A. and T. Hanada (2013). "Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist." *Acta Neurol Scand Suppl*(197): 19-24.
- Rong, R., J. Y. Ahn, et al. (2003). "PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis." *Nat Neurosci* **6**(11): 1153-1161.
- Scherle, P., T. Behrens, et al. (1993). "Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7568-7572.

- Skripuletz, T., V. Gudi, et al. (2011). "De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected." *Histol Histopathol* **26**(12): 1585-1597.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." *Annu Rev Immunol* **23**: 683-747.
- Suzuki, T., K. Nishiyama, et al. (2000). "Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease." *Genomics* **63**(2): 246-254.
- Szenasi, G., M. Vegh, et al. (2008). "2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects." *Neurochem Int* **52**(1-2): 166-183.
- Tang, X., S. W. Jang, et al. (2008). "Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B." *Nat Cell Biol* **10**(6): 698-706.
- Thedieck, K., B. Holzwarth, et al. (2013). "Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells." *Cell* **154**(4): 859-874.
- Trotter, J., K. Karram, et al. (2010). "NG2 cells: Properties, progeny and origin." *Brain Res Rev* **63**(1-2): 72-82.
- Wergeland, S., O. Torkildsen, et al. (2011). "Dietary vitamin D3 supplements reduce demyelination in the cuprizone model." *PLoS One* **6**(10): e26262.
- Ye, K., B. Aghdasi, et al. (2002). "Phospholipase C gamma 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE." *Nature* **415**(6871): 541-544.
- Yeh, J. Y., M. A. Beilstein, et al. (1995). "Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W." *FASEB J* **9**(5): 392-396.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2012/ 170

29/11/2012

Siz: Prof. Dr. Zeliha YAZICI
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

Karar No : 2012/ 170

Başvuru : 19.11.2012

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, Yüksek Lisans Öğrencisi Ferhat GÜZEL'e ait "Kuprizen ile Olaştırulan MS Modelinde, AMPA Antagonisti Perampanelin Etkilerinin Array Tabanlı Gen Ekspresyonu ile Tayim" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Fürü Cinsiyeti Sayısı	Pare Erkek
	32	
Proje Başlangıç/Birleş Tarihleri : 05.12.2012:05.06.2013		

Prof. Dr. Alev AKLİNGİN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALDIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pinar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Yücel ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAR
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Mak. Yük. Müh. Yard. Doç. Dr. Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	FERHAT	Soyadı	GÜZEL
Doğ.Yeri	KARS	Doğ.Tar.	04.04.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	45568445832
Email	frhtgzl@gmail.com	Tel	05059260350

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Tire Kutsan Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Proje ve Uygulama Sorumlusu	DONE Genetik ve Biyoinformatik A.Ş.	2012-
2.	Genel Müdür	Gentera Biyoteknoloji Limited Şirketi	2013-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	-	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Matlab	Orta
R Programlama	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):