

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTİPLE SKLEROZ KUPRİZON FARE MODELİNDE GEN
EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN GERÇEK ZAMANLI (qRT)
PCR YÖNTEMİ İLE TAYİN EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökhan TERZİOĞLU

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Programı

OCAK 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTİPLE SKLEROZ KUPRİZON FARE MODELİNDE GEN
EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN GERÇEK ZAMANLI (qRT)
PCR YÖNTEMİ İLE TAYİN EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÖKHAN TERZİOĞLU
521091091**

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda Tahir Turanlı

OCAK 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 521091091 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Gökhan TERZİOĞLU ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “MULTİPLE SKLEROZ KUPRİZON FARE MODELİNDE GEN EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN GERÇEK ZAMANLI (qRT) PCR YÖNTEMİ İLE TAYİN EDİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmudur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Eda Tahir Turanlı**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Eda Tahir Turanlı**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Arzu K. Korkmaz

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tuncay Altuğ

İstanbul Bilim Üniversitesi

Teslim Tarihi : **19 Aralık 2011**

Savunma Tarihi : **23 Ocak 2012**

Aileme

ÖNSÖZ

Bu projede çalışmama izin veren Doç. Dr. Eda Tahir Turanlı'ya, laboratuvar çalışmalarında bana olabildiğince destek olan Doktora öğrencileri Gökçe Çelikyapı, Timuçin Avşar ve Aslı Kireçtepe'ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Aralık 2011

Gökhan Terzioğlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|------|
| ÖNSÖZ..... | vii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| KISALTMALAR..... | xi |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | xiii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xv |
| ÖZET..... | xvii |
| SUMMARY | xix |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Tez Çalışmasının Amacı | 1 |
| 1.2 Multiple Skleroz..... | 2 |
| 1.2.1 Multiple Skleroz..... | 2 |
| 1.2.2 Multiple Skleroz'un çevresel sebepleri | 6 |
| 1.2.3 Multiple Skleroz kalıtılabilirliği ve moleküler genetiği | 8 |
| 1.2.4 MS Semptomları | 9 |
| 1.2.5 Multiple Skleroz Teşhisi | 10 |
| 1.2.5.1 Multiple Skleroz teşhisinde MR kullanımı | 10 |
| 1.2.5.2 Multiple Skleroz teşhisinde BOS analizi | 10 |
| 1.2.5.3 Otopsi ile beyin dokusunda MS teşhisi..... | 11 |
| 1.2.6 MS tedavisinde kullanılan yöntemler | 12 |
| 1.2.7 Periferel sinir sisteminde görülen MS benzeri demyelinizan hastalıklar.. | 12 |
| 1.3 Myelin Kılıf..... | 13 |
| 1.3.1 Myelin kılıfın yapısı..... | 13 |
| 1.3.2 Oligodendrosit ve Schwann hücreleri | 14 |
| 1.3.3 Myelinasyon ve remyelinasyon | 16 |
| 1.3.3.1 NRG1 | 17 |
| 1.3.3.2 CNTF | 17 |
| 1.3.3.3 CXCR4..... | 18 |
| 1.4 Hayvan Modelleri..... | 18 |
| 1.4.1 Otoimmün modeller | 19 |
| 1.4.2 Mutant modeller | 19 |
| 1.4.3 Viral modeller | 20 |
| 1.4.4 Kimyasal temelli modeller | 20 |
| 1.4.4.1 Lizolesitin | 20 |
| 1.4.4.2 Etidyum bromür | 21 |
| 1.4.4.3 Kuprizon | 21 |
| Bakır metabolizması..... | 22 |
| 2. MALZEME VE YÖNTEM | 23 |
| 2.1 Farelerin Bakımı..... | 23 |
| 2.2 Farelerin Beyninden RNA İzolasyonu | 23 |
| 2.3 cDNA Sentezi..... | 24 |
| 2.4 qRT PCR | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1 qRT PCR öncesi adımlar..... | 25 |
| 2.4.1.1 Referans genin seçilmesi..... | 26 |
| 2.4.1.2 Primer ve prob dizaynı | 26 |
| 2.4.1.3 qRT PCR ile analiz edilecek haftaların belirlenmesi | 28 |
| 2.4.1.4 cDNA ların Nanodrop cihazı ile ölçülmesi | 28 |
| 2.4.1.5 cDNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve pool yapılması | 28 |
| 2.4.2 qRT PCR analizinin yapılması..... | 29 |
| 3. SONUÇ VE TARTIŞMA..... | 31 |
| KAYNAKLAR..... | 39 |
| EKLER..... | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 49 |

KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|---|
| BBB: | Beyin Kan Bariyeri |
| CC: | Corpus callosum |
| CNTF: | Silier Nörotrofik Faktör |
| CXCR4: | C-X-C Kemokin Reseptörü 4 |
| EAE: | Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit |
| GAPDH: | Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrojenaz |
| HLA: | İnsan Lökosit Antijeni |
| IFN γ: | İnterferon Gamma |
| IGF: | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü |
| IL-1: | İnterlökin 1 |
| IL-2: | İnterlökin 2 |
| IL-10: | İnterlökin 10 |
| MAG: | Myelin bağlantılı glikoprotein |
| MBP: | Myelin Bazik Protein |
| MHC: | Major Histokompatibilite Kompleksi |
| MOG: | Myelin Oligodendrosit Glikoprotein |
| MS: | Multiple Skleroz |
| MSS: | Merkezi Sinir Sistemi (İng:CNS) |
| NRG: | Neuregulin |
| OPC ya da Oph: | Oligodendrosit Progenitör Hücre |
| PDGF: | Platelet Kökenli Büyüme Faktörü |
| PGK1: | Fosfogliserat Kinaz 1 |
| PLP: | Proteolipid Protein |
| PP: | Posterior Pitütier |
| qRT-PCR: | Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RR-MS: | Relapsing-Remitting Multiple Skleroz |
| SGZ: | Subgranüler Bölge |
| SVZ: | Subventriküler Bölge |
| Th: | Yardımcı T hücresi |
| TMEV: | Theiler Mürin Ensefalomyelit Virüsü |
| TNF: | Tümör Nekroz Faktörü |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| Çizelge 1.1 : MS Hastalarında görülen immünolojik değişiklikler | 4 |
| Çizelge 1.2 : 2007 yılındaki çalışmada tespit edilen SNPler | 9 |
| Çizelge 2.1 : Aday hedef genler için prob ve primer listesi | 27 |
| Çizelge 2.2 : qRT PCR mix içeriği | 30 |
| Çizelge 3.1 : 0-16. hafta NRG 1 ekspresyon düzeyleri | 31 |
| Çizelge 3.2 : 0-16. hafta CNTF ekspresyon düzeyleri | 32 |
| Çizelge 3.3 : 0-16. hafta CXCR4 ekspresyon düzeyleri | 33 |
| Çizelge A.1 : Pre inkübasyon | 46 |
| Çizelge A.2 : Amplifikasyon | 46 |
| Çizelge A.3 : Soğutma | 47 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Şekil 1.1 : MS tipleri..... | 5 |
| Şekil 1.2 : MS türlerine göre hastaların dağılımı..... | 5 |
| Şekil 1.3 : Fransa'da 9 farklı bölgede D vitamini düzeyi-MS prevalans ilişkisi | 7 |
| Şekil 1.4 : MR'da MS plaklarının görünümü..... | 10 |
| Şekil 1.5 : Serum-BOS IgG izoelektrik odaklama..... | 11 |
| Şekil 1.6 : Beyin kesitinde MS plaklarının görünümü | 11 |
| Şekil 1.7 : Beyin transversal kesiti | 13 |
| Şekil 1.8 : Myelin kılıf yapısı | 14 |
| Şekil 1.9 : Beyindeki oligodendrosit progenitör hücre kaynakları | 15 |
| Şekil 1.10 : Myelin yapılanmasında görevli faktörler | 16 |
| Şekil 3.1 : 0-16. haftalar NRG 1 ekspresyon düzeyleri | 31 |
| Şekil 3.2 : 0-16. haftalar CNTF ekspresyon düzeyleri | 32 |
| Şekil 3.3 : 0-16. haftalar CXCR4 ekspresyon düzeyleri..... | 33 |
| Şekil 3.4 : 0-16.haftalar NRG1, CNTF, CXCR4 ekspresyon düzeyleri | 34 |

MULTİPLE SKLEROZ KUPRIZON FARE MODELİNDE GEN EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN GERÇEK ZAMANLI (qRT) PCR YÖNTEMİ İLE TAYİN EDİLMESİ

ÖZET

Multiple Skleroz, genelde genç erişkinleri etkileyen ve T hücrelerinin, merkezi sinir sistemindeki sinir hücreleri aksonlarının çevresini saran ve hızlı atlamalı (saltatory) iletimi sağlayan myeline karşı otoreaksiyon geliştirdiği otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Myelin kaybı, sinirsel iletimde yavaşlamaya ve zaman içinde ölüme sebep olmaktadır. İnsan merkezi sinir sisteminden örnek almak zor olduğu için, MS in işleyişini çalışmak üzere toksin temelli, virüs temelli ya da EAE gibi modeller geliştirilmiştir.

Mevcut çalışmada toksin temelli bir model olan, kuprizon modeli kullanılmıştır. Kuprizon, bir bakır şelatörüdür, dolayısı ile sistemde bulunan bakır iyonlarının çökmesine sebep olur.. Kuprizonun diğer bir önemli etkisi ise, besinle karıştırılarak verildiğinde MSS de spesifik olarak corpus callosumda demyelinasyona sebep olmasıdır. Hedef gen olarak seçilen NRG1, CNTF ve CXCR4, merkezi sinir sisteminde myelini oluşturan oligodendrosit hücrelerinin sağkalımında, farklılaşmasında ve oligodendrositleri oluşturan oligodendrosit progenitör (öncül) hücrelerin hasarlı bölgeye göçünde etkili faktörlerdir. Bu faktörlerin ekspresyonundaki değişimin belirlenmesi ile, remyelinasyon ya da myelin onarımındaki rolleri ve uzun süreli kuprizon uygulamasının niçin kronik demyelinasyona sebep olduğu anlaşılmaya çalışılmaktadır. Böylece, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ya da hastalarda görülen remyelinasyonun artırılması için önemli bilgiler sağlanmış olacaktır.

C57BL 6/J farelerden denek ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturularak, denek grubu %0,2 kuprizon karıştırılmış yem ile kontrol grubu ise normal yem ile beslenmiştir. Kuprizon ile beslemeye 12 hafta boyunca devam edilmiş sonraki 4 haftada ise normal besin verilmiştir, 2 haftada bir olmak üzere fareler sakrifiye edilerek beyin örnekleri alınmış ve beyinlerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, RNA nın bir kısmı -80°C de RNA olarak, bir kısmı ise cDNA e çevrilerek -20°C de saklanmıştır. cDNA örnekleri, NRG1, CNTF ve CXCR4 hedef genleri için, 2 referans gen kullanılarak (Gapdh, Pgc1) LightCycler 480 cihazı ve UPL Probe ile qRT-PCR analizine tabi tutulmuştur.

Kontrol grubu ile karşılaştırılan denek grubu ekspresyon analizi sonuçlarına göre, NRG1 ekspresyonu ilk 4 haftalık kuprizon uygulaması ile belirgin ölçüde azalırken ($p<0,001$), 4-12 haftalar arasında aynı düzeyde seyretmektedir (4-10 hafta için $p<0,001$), 12.haftadan sonra başlangıç düzeyine dönmüştür. CNTF ekspresyonu 0-4. haftalar arasında azaldıktan ($p<0,05$) sonra 8-12 hafta arasında artarak başlangıç düzeyinin üzerine çıkmış (6-8.hafta $p<0,05$, 8-10.hafta $p<0,001$), normal beslenmeye döndükten sonra azalarak başlangıç düzeyine inmiştir. CXCR4 ekspresyonu ilk 4

hafta içerisinde düşüş gösterdikten sonra ($p<0,05$), 6.hafta da maksimum düzeyine ulaşmış ($p<0,05$), 6-12.haftalar arası dönemde minimum düzeye inmiş (6-10. hafta $p<0,005$), normal beslenmeye dönüldüğü dönem olan 12-16.hafta döneminde ise başlangıç düzeylerine dönmüştür ($p<0,001$). 12. hafta sonunda kuprizon yemden çekildikten sonra, NRG ve CXCR4 ekspresyonu artarken, CNTF düşüş göstermiştir. Ekspresyon düzeyindeki değişime bakıldığında, kronik demyelinasyon seyri ile paralellik gösteren hedef genin CXCR4 olduğu düşünülmektedir. CXCR4 ekspresyonundaki değişim, kuprizonun oluşturduğu demyelinasyonun seyri ile paralellik göstermektedir. IFN- γ nın CXCR4 ekspresyonunu baskıladığı ve demyelinize bölgede IFN- γ salgılandığı bilinmektedir. Dolayısı ile, süreç içerisinde IFN- γ miktarının arttığı ve CXCR4 ekspresyonunun bu sebeple baskılandığı düşünülebilir.

DETERMINATION OF GENE EXPRESSION CHANGES IN MULTIPLE SCLEROSIS CUPRIZONE MOUSE MODEL WITH QUANTITATIVE REAL TIME (qRT) PCR

SUMMARY

Multiple Sclerosis is a demyelinating autoimmune disease and generally seen in young adults. In MS, Blood brain barrier (BBB) is breakdown, immune cells infiltrate into CNS and T cells attack the myelin sheath of nerve axons in CNS which ensheath and insulate axons. Myelin is a lipid rich insulation material, Normally, myelin increase the speed of axonal signal transmission and radius of axon, Myelin loss cause neural transmission slowdown and may cause death in time. Plaques are seen in demyelination sites of brain. At early stage of Multiple Sclerosis, demyelinated sites can be repaired and remyelinated, but after the threshold demyelinated sites can not be remyelinated. For remyelination, myelin debris must be removed with phagocytic activity by macrophages. Oligodendrocytes are glial cells which myelinate the Central Nervous System, and these cells differentiated from Oligodendrocyte progenitor cells which are originated from Subventricular zone and subgranular zone in brain. Oligodendrocyte cells injection to demyelinated site can not cause remyelination, only oligodendrocyte progenitor cell injection cause the remyelination in CNS. Because of this, first step of remyelination is oligodendrocyte progenitor cell migration to demyelination site. After the migration, oligodendrocyte progenitor cells differentiate into mature oligodendrocytes which build myelin sheath.

Different models are used for MS studies such as virus based (TMEV), toxin based models (cuprizone), autoimmune (EAE) models, because sample isolation from the human central nervous system (CNS) is a hard process and dangerous for patient. Theiler Murine Encephalomyelitis Virus is a common virus model, another is Semliki Virus. Most common animal model is the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis which is an autoimmune MS model. In EAE, myelin parts or whole myelin inject with adjuvant to mice circulation and this cause autoimmune response to myelin and oligodendrocytes in CNS. Blood brain barrier destroyed and immune cells pass into brain. Another model is the Cuprizone Toxic Model, cuprizone is a copper (Cu) chelator which bind and settle the Cu ions and abnormal mitochondria formation (Megamitochondria). Cuprizone is different from other toxin based models, other models such as Lipoic acid and ethidium bromide only cause local demyelination at injection site, but cuprizone cause global demyelination in brain and cuprizone only effect when mix into chow. Cuprizone cause global demyelination in CNS (particularly Corpus callosum and subcortical region for C57BL/6j mice), when % 0,2 cuprizone mix into chow of the murines. If cuprizone concentration increase to % 0,5, mortality rate increase. First 6 weeks of cuprizone chow cause acute demyelination which is remyelinated after the cease of cuprizone. But 6-12 cuprizone feeding cause chronic demyelination, remyelination fail. For cuprizone model, Blood brain barrier is intact and cuprizone model is not an immune

model, T cell infiltration can't be seen. Additionally, cuprizone treatment repress the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis' effects in brain.

At this study, a toxic demyelination model of cuprizone was used. NRG1 (neuregulin 1), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), CXCR4 (C-X-C Chemokine Receptor 4) are target genes of this study and these target genes have important roles in oligodendrocyte survival, maturation and oligodendrocyte progenitor cell migration to the demyelination site. Particularly, CXCR4 is an important receptor for CXCL12 chemokine, and CXCR4-CXCL12 relation is important for oligodendrocyte progenitor cell and other progenitor cells migration in brain. CXCR4 is expressed by stem cells and CXCL12 is expressed by astrocytes and microglia in demyelinated site. Previous studies show that CXCL12 expression levels decrease with cuprizone treatment. Nrg 1 and CNTF are important factors for oligodendrocyte maturation and survival. CNTF is a polypeptid hormone which affect the central nervous system. CNTF is expressed by neurons and microglia in CNS. CNTF injection to developing rat optic nerve, increase cell survival %80. Nrg1 is a protein and have 6 alternative splicing form. NRG 1 is expressed on neurons' cell surface and bind to ErbB receptors on oligodendrocytes. NRG1 promote the oligodendrocyte survival through ErbB receptors on oligodendrocytes. But, Nrg1 is not an essential factor for central nervous system myelination. Nrg 1 knock-out mice central nervous system can be myelinated. Nrg 1 is an essential factor for Schwann cell survival, schwann cells are myelin cells in peripheral nervous system. Because of this, NRG 1 is an important and essential factor for peripheral nervous system myelination. If these factors expression changes are determined, roles in remyelination and causes of chronic demyelination are understood from their expression change in mice brain with longtime cuprizone exposure, thus new therapies for MS and promotion of remyelination can be developed.

C57BL/6j mice are separated into 2 group which are subject and control. Subject group is fed with %0,2 cuprizone mixed chow for 12 weeks and after 12. weeks, they fed with normal chow for 4 weeks. Control group is fed with normal chow for 16 weeks. Mice are sacrificed once at two weeks, and brain is dissected. RNA isolated from brains, a part of RNA keep in -80°C , a part of RNA turn into cDNA with reverse transcription kit and keep at -20°C . Before the qRT-PCR, cDNAs' are measured with Nanodrop for 260/280nm. cDNAs are analyzed with upl probe qRT-pcr for CNTF, NRG1 and CXCR4 target genes expression levels. Gapdh and Pgk1 are used as reference genes. Gapdh is a common reference gene for qRT PCR studies, and used in some related studies, Pgk 1 is a new reference gene, and its expression is most stable in development of central nervous system of mice. Gapdh and Pgk 1 expression levels mean is used for relative quantification calculation. Lightcycler 480 and Universal Probe Library probes used for qRT-PCR. Probes and primers are designed Universal Probe Library Design Center and controlled with Primer Blast for specificity. Probes are more specific and confidential method than Cybr Green qRT-PCR, because of this, UPL probes are preferred. Expression levels calculate with LightCycler 480 Advanced Relative Quantification program. Each measurement repeat for three times. Statistical P values calculate. $p < 0,05$ accept as a statistical significant.

According to the quantitative Real Time Polymerase chain reaction results which are compared with control group, Neuregulin 1 gene expression significantly decrease after 4 weeks of cuprizone treatment ($p < 0,001$), but almost not change in 4-12. weeks period (4-10. week $p < 0,001$). After the 12. week, cuprizone replace from the

chow and NRG1 expression increase to the initial level. Ciliary neurotrophic factor expression decrease in first 4 weeks of cuprizone treatment ($p < 0,05$), but increase in 8-12 weeks of cuprizone treatment (6-8. weeks $p < 0,05$ 8-10 weeks $p < 0,001$). After the 12. week, CNTF expression level decrease to initial level. Similarly, CXCR4 expression decrease in 0-4. week period ($p < 0,05$), and reach maximum level at 6th week ($p < 0,05$). In 6-12th week period (6-10. weeks $p < 0,005$), CXCR4 expression decrease and reach the minimum at 12th week. At 12th week, cuprizone replace from the chow and CXCR4 expression level increase to the initial level in 4 weeks ($p < 0,001$). Only CNTF gene expression level decrease after the 12th week, NRG1, CXCR4 level increase after the 12th week. CXCR4 expression change pattern correlate with acute demyelination to chronic demyelination transition. CXCR4, CNTF, NRG 1 genes' expressions turn into the initial level after the cease of cuprizone from the chow.

According to previous studies, Nrg 1 is not an essential factor for central nervous system myelination, Nrg 1 knock-out mice central nervous system can be myelinated. But in this study, Nrg 1 expression decrease with cuprizone treatment and not increase in 12 week cuprizone feeding period. Cuprizone maybe affect the alternative pathways which are related with central nervous system remyelination. Expression of Ciliary Neurotrophic factor gene increase in 8-12. week period, and ciliary neurotrophic factor is important for oligodendrocyte survival, but oppositely remyelination wreck at 12. week. Because of this, Central nervous system remyelination maybe decline at early steps, possibly at oligodendrocyte progenitor cell migration. CXCR4 chemokine receptor 4 expression pattern is almost similar with Cuprizone Demyelination pattern. Decrease in CXCL12 expression can not answer the questions about CXCR4 expression decrease, because CXCL12 expression decrease is little. Possibly, Interferon gamma cause the decrease in CXCR4 expression. Previous studies show that, damaged astrocytes release interferon γ and macrophages are called with IFN γ to the demyelination site for phagocytosis of demyelination wrecks and IFN γ is detected in corpus callosum for cuprizone model, interferon gamma decrease the number of CXCR4 receptors on cell surface and decrease the CXCR4 expression. Thus, interferon gamma expression increase and this can be repressed the expression of CXCR4 in central nervous system. For Multiple Sclerosis, different mechanisms can be suggested, and one of this is Ubiquitin based mechanism. Ubiquitin can be bound the CXCR4 receptor, and ubiquitin have important role in immunosuppression. ubiquitin bound molecules goes into the destruction. But central nervous system is almost immunosuppressed, in Multiple Sclerosis, blood brain barrier break and immune cells pass into the central nervous system. Because of this, Ubiquitin level increase for suppression of autoimmune response, additionally may affect the CXCR4 level in CNS and may prevent Oligodendrocyte cell migration to demyelination site in brain.

1.GİRİŞ

Multiple Skleroz toplumun gençlik çağındaki yetişkin nüfusunu etkilemekte olan ve bireylerin yaşam kalitesini azaltıp, görevlerini yerine getirmelerini engelleyen Merkezi Sinir Sistemini etkileyen bir hastalıktır. MS'in oluşumu ve nasıl tedavi edileceğinin belirlenmesi amacı ile süreçte etkin olan faktörlerin ekspresyonundaki değişikliklerin belirlenmesi için hayvan modelleri ile ve hastalardan alınan örnekler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır.

1.1 Tez Çalışmasının Amacı

Hedef gen olarak seçilen NRG 1, CNTF, CXCR4 gibi oligodendrosit sağkalımı, olgunlaşması ve göçü üzerine etkili faktörlerin, 12 hafta boyunca % 0,2 kuprizon ile beslenmiş farelerin beyindeki ekspresyonunun nasıl değiştiği qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. 12 haftalık uygulamadan sonraki 4 haftalık süreçte de denek fareler normal yem ile beslenmiş ve düzelme incelenmiştir. Aynı süreçte kontrol grubundaki fareler 16 hafta boyunca normal yem ile beslenmiştir. Sonuçlar, daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılarak, uzun süreli 12 hafta kuprizon uygulaması sonucu ortaya çıkan kronik demyelinasyon üzerinde söz konusu faktörlerin ne şekilde etkili olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece akut demyelinasyondan- kronik demyelinasyona geçiş sürecinde hangi faktörlerin etkili olduğu anlaşılmaya çalışılmaktadır. Kuprizon modeline benzer şekilde, insanlarda görülen ve genç erişkin nüfusu etkileyen demyelinizan bir merkezi sinir sistemi hastalığı olan Multiple Skleroz hastalığında erken dönemde myelin onarımı görülürken, zaman içerisinde hastalığın ilerleyen aşamasında beyindeki remyelinasyon (myelin onarımı) süreci başarısızlığa uğramakta, myelin kılıf hasarı onarılamamaktadır, dolayısı ile remyelinasyon sürecinde etkili olan faktörlerin belirlenmesi ve remyelinasyonun ne şekilde sekteye uğradığının tespit edilmesi gelecek dönemde geliştirilecek olan tedavi yöntemleri için gerekli bilgiyi sağlayacaktır. Bulunan sonuçlardan hareketle, remyelinasyon için zorunlu olan esaa faktörler bulunarak, remyelinasyon süreci kompanse edilebilecektir.

1.2 Multiple Skleroz

1.2.1 Multiple skleroz (MS)

Merkezi sinir sistemi (MSS) göreceli olarak immünbaskılanmış bir ortam olarak kabul edilebilir, lenfatik drenaj, yerleşik dendritik hücreler ve MHC (Major Histocompatibility Complex) ekspresyonu yoktur. Normal koşullarda Beyin Kan Bariyeri (BBB), bağışıklık sistemi hücrelerinin dolaşım sisteminden beyne geçişini engelleyen bir bariyer görevi yapar. Beyin kan bariyeri, postrema ve posterior pituitary (pp) olmak üzere 2 bölge de zayıftır, postremanın görevi kandaki zehirli kimyasalların tespit edilmesidir, böylece kusma tetiklenir, pp ise oksitosin ve vasopressin gibi hormonların kana salınmasında görev alır[1]. Kuprizon Fare Modeli'nde BBB bütünlüğü korunur, C57BL/6j soyu farelerde demyelinasyon bölgesinde makrofaj/mikroglia hücreleri demyelinasyona katılırken, T hücre temelli bir otoimmün yanıt görülmez [2]. MS gibi hastalıklarda ve Deneysel Alerjik Ensefalomyelit (EAE) gibi modellerde bariyer bütünlüğünü kaybeder ve T lenfositleri gibi hücreler Merkezi Sinir Sistemine girerek otoimmün reaksiyonlar meydana getirirler. MS hastalığının mekanizması ile ilgili en temel hipotez T hücresi temelli otoimmün hücrelerin, Merkezi Sinir Sistemindeki (MSS) nöronların aksonlarının çevresini saran yalıtım materyali olan myeline karşı otoreaksiyon oluşturmaları şeklinde özetlenebilir. Buradan hareketle MS, otoimmün bir hastalık özelliği gösterirken aynı zamanda demyelinizan bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

Normalde yardımcı CD4+ T hücreleri yabancı antijenleri tanıyarak, sitokinler salgırlar, bu diğer T hücrelerini ve B hücrelerini enfeksiyon bölgesine çeker, MS'da bu yardımcı hücreler myelin kılıf bileşenlerini yabancı antijen olarak algırlar ve myeline karşı otoreaksiyon geliştirirler [3]. Buna sebep olarak Th1/Th2 dengesinin bozulması düşünülmektedir, Th1 IL1, TNF- α , IFN- α salgılayarak immün yanıtı artırırken, Th2 yardımcı hücreler IL-4, IL-10, TGF-B (Transforme edici büyüme faktörü) salgılayarak hastalığın iyileşme, düzelmesinde rol alırlar. Th1 hücreler TNF- α salgılayarak doğrudan yıkıma katılırken, IFN- γ salgılayarak makrofaj aktivitesini artırıp, myelin yıkımını çoğaltırlar [4]. MS'de oluşan inflamasyonun dağılımı incelendiğinde, beyaz maddede oluşan plaklarda görülen inflamasyon lezyonlarının yanında, gri maddede büyük ölçüde etkilenmektedir, bunun dışında beyaz maddede

plak olmayan bölgelerde de myelin yıkımı belirlenmiştir [5]. Demyelinasyon sonucu myelin kılıfını kaybeden hücreler ölür ve akson bağlantıları kaybedilir, plak olan bölgelerde akson yıkımı görülmektedir. Myelin oluşturan oligodendrosit hücreleri otoimmünite sonucu saldırıya uğramakta ve nekroz ve apoptoz üzerinden oligodendrosit kaybı görülmektedir [6]. MS'da erken aşamada myelin onarımı (remyelinasyon) görülürken, hastalığın ilerleyen aşamasında remyelinasyon mekanizması bozulmakta ve myelin kaybı (demyelinasyon) kronik hale gelmektedir. Goldschmidt ve diğ. (2009), 51 erken aşamadaki MS hastasından yapılan 52 biyopsinin ve 36 ileri aşamadaki (kronik) MS hastası için yapılan otopside elde edilen 174 lezyonun myelin proteinleri için immünokimyasal analizini yapmışlardır. Erken MS'da lezyonların %80,7 sinde remyelinasyon görülürken, ilerleyen MS lezyonlarında bu oran %60 a düşmektedir, kronik MS teki remyelinasyon bölgesel olarak incelendiğinde beyincikteki (cerebellar) lezyonlar tamamıyla demyelinize iken, subkortikal lezyonlar periventriküler lezyonlara göre daha yüksek remyelinasyon gösterir [7]. MS hastalarında remyelinasyon kapasitesinin kadın-erkek bireylerdeki lezyonlarda ne şekilde değiştiği incelenmiş, remyelinasyonun kadınlarda biraz daha fazla olduğu ve daha geniş bir bölgeye yayıldığı, oligodendrosit hücre sayısının farklılık göstermediği görülmüştür, bu durum hayvan modellerinde dişi bireyler lehine tespit edilen sonuçlardan farklılık göstermektedir, yapılan çalışmada örneklerin kısıtlı miktarda olduğunun dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir [8]. Myelin kılıfın görevi düşünüldüğünde myelin yapısının hasara uğraması süreç içinde sinirsel iletimi yavaşlatarak motor ve kognitif işlevlerde kayba sebep olurken, zaman içinde ölümle sonuçlanacak durumlarda ortaya çıkabilir. Bunlara ek olarak, demyelinasyonun ilerleyen döneminde hasarlı bölgede Gliosis ya da astrosit çoğalması görülmekte ve glial yara adı verilen bir yapı oluşturmaktadır. Glial yaranın esas olarak hasarlı bölgeyi, sağlıklı bölgeden ayırarak sağlıklı dokunun yıkımını önlediği düşünülmektedir. Glial yarıdaki aktif astrositler, kondroitin sulfat proteoglikan (CSPG) ve keratan sulfat proteoglikan gibi ekstraselüler matriks molekülleri üretmektedir ve bu inhibitörler MSS rejenerasyonunu engelleyen faktörler olarak düşünülmektedir [9]. Bu inhibisyonun CSPG varlığından çok, miktarı ile ilgili olduğu düşünülebilir, çünkü CSPG üretimi engellendiğinde omurilik hasarındaki iyileşme azalmaktadır, CSPG miktarı makrofaj/mikroglialar tarafından salgılanan IGF-1 miktarı ile korelasyon göstermektedir, IGF-1 akson gelişimini stimüle etmektedir [10].

Çizelge 1.1 : Multiple Skleroz hastalarında BOS, Serum ve kanda genel olarak görülen immün değişiklikler [11].

| Beyin Omurilik Sıvısı | Serum | Kan |
|------------------------------|---------------------|--------------------|
| Artan IFN γ | Artan IFN γ | Artan IFN γ |
| Artan TNF | Artan TNF | Artan IL-1 |
| Artan IgG | Artan IL-2 | Artan IL-2 |
| Artan CD4+ aktif | Artan IL-2 reseptör | Artan IL-4 |
| | Azalan CD8 + | |

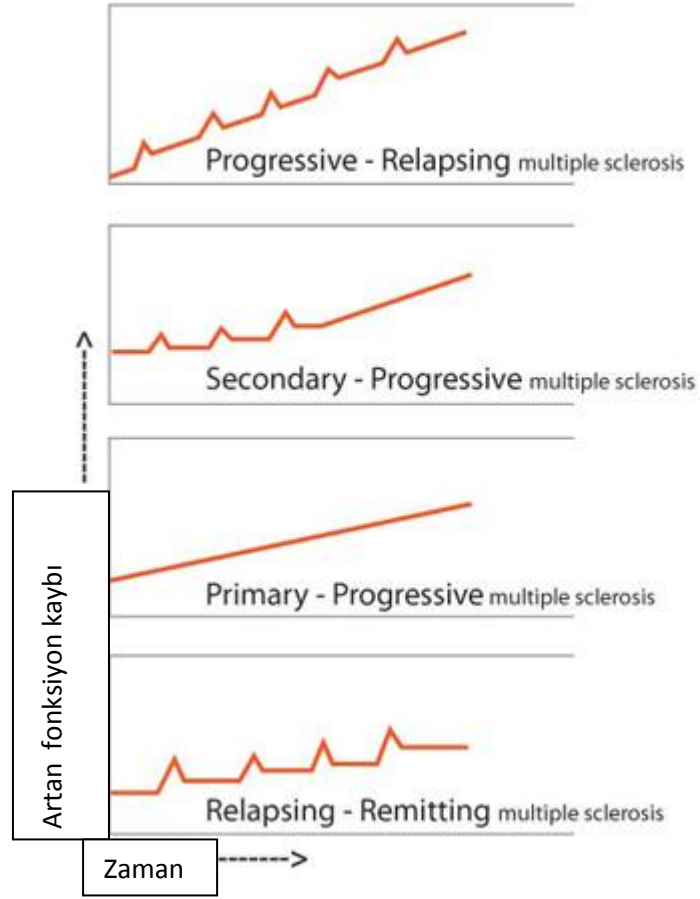
MS lezyonları histopatolojik olarak 4 tipe ayrılabilir. 1.tip lezyonda, demyelinasyon esas olarak toplardamar ve kılcal toplardamarların çevresinde yerleşim gösterir, büyük demyelinize plak oluşumu görülür, inflamasyon bölgesinde T hücreleri ve makrofajlar baskındır, demyelinasyonu esas olarak bu hücreler oluşturur, incelenen lezyonların %12 sini oluşturur. 2.tip lezyonlarda bunlara ek olarak immunoglobulin (Ig) birikimi ve aktif kompleman proteinleri görülür ve %53'lük bir paya sahiptir. 3. tip lezyonlar %30 luk paya sahiptir ve erken oligodendrosit apoptozu görülür, MAG proteinin kaybı daha fazladır. T hücre infiltrasyonu ve makrofaj aktivitesi görülürken, Ig birikimi görülmez. 4.tip ise hücre nekrozu ve perivenöz demyelinasyon ile karakterizedir, T hücresi infiltrasyonu ve makrofaj aktivitesi gösterirken, 3.tiptekine benzer şekilde hücre kaybıda görülür [12].

MS'un hastalığın seyrine göre, Atak ve İyileşmelerle seyreden (Relapsing-Remitting) (RR), Birincil İlerleyici (Primary Progressive), İkincil İlerleyici (Secondary Progressive), ilerleyici-ataklı (Progressive relapsing) gibi farklı formları mevcuttur (Şekil 1.1). RR formunda hasta önceden kestirilemeyen ataklarla kötüleşmekte, ara dönemlerde ise düzelme göstermektedir, 3.tip lezyona sahip olan hastalar genel olarak kısa RR tipi MS seyri gösterir [12].

Birincil ilerleyici formda ise hastalık sürekli olarak kötüye giderek seyretmektedir, birincil ilerleyici formda atak görülmez, 4.tip lezyonlara sahip olan hastalar genel olarak birincil ilerleyici formda hastalık seyri gösterir [12].

İlerleyici ataklı formda ise ataklar ve kısmi düzelme dönemleri olmakta fakat hastalık sabit bir eğilimle kötüye gitmektedir. İkincil ilerleyici formdaki MS ise RR formunda başlamakta ve sonra ilerleyici forma dönmektedir. RR formunda MS gösteren hastaların çoğu 8-15 yıl içinde, aksonal kayıp belli bir eşik değeri aştığında

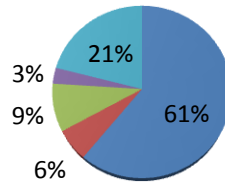
ikincil ilerleyici forma geçmektedir [13]. En yaygın MS tipi, atak ve iyileşmelerle seyreden formdur. (Şekil 1.2)



Şekil 1.1 : Multiple Skleroz Tipleri

MS Dağılımı

- Atak ve iyileşmelerle Seyreden
- Birincil İlerleyici
- İkincil İlerleyici
- İlerleyici Ataklı
- Bilinmeyen



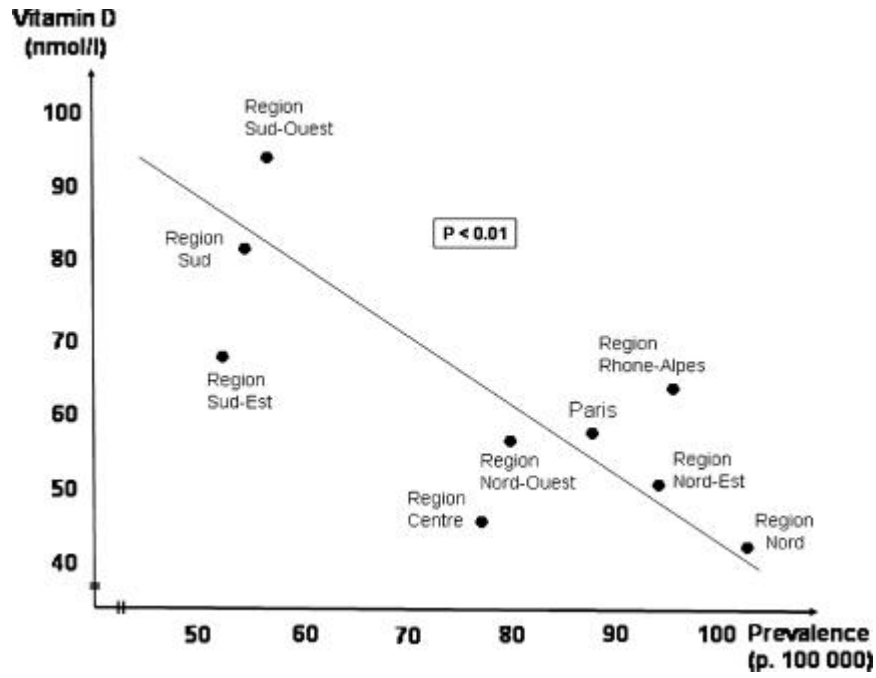
Şekil 1.2 : MS Türlerine göre Hastaların Dağılımı

1.2.2 Multiple sklerozun çevresel sebepleri

Hastalık epidemiyolojik açıdan incelendiğinde, Multiple Skleroz genç erişkinlerde (20-40 yaş) yaygın olarak görülmektedir, hastalığın görüldüğü yaş grubu 10-60 yaş aralığına kadar genişletilebilir [14]. Coğrafi dağılımına bakıldığında, Ekvator'dan kuzey ya da güneye doğru uzaklaştıkça hastalık daha sık görülmeye başlanmaktadır. Hastalığın prevalansı ile ilgili ilk çalışma 1929 yılında Sydney Allison tarafından yapılan araştırmadır, yakın tarihli çalışmalara göre hastalık farklı etnik kökenlerde ve bölgelerde farklı dağılım göstermektedir. Örnek olarak Amerikan Kızılderilileri'nde görülmemekte, yaygın olarak Avrupa ırklarında görülmektedir [15]. Hastalığın nadir görüldüğü bölgelerden, sık görüldüğü Kıta Avrupası gibi bölgelere göç eden ailelerde hastalık riski artmaktadır, dolayısı ile çevresel faktörlerin etkili olduğu düşünülebilir. Hasta birey sayısı, endüstrileşme düzeyine paralel olarak artmaktadır [14]. Endüstrileşmiş ülkelerde hijyenin ve temizlik şartlarının da yükselmiş olduğu düşüncesinden hareketle, bir grup bilimadamı MS gibi otoimmün hastalıklar için Hijyen Teorisi'ni öne sürmüşlerdir. Hijyen Teorisi'ne göre küçük yaşta hastalık etmenleriyle, parazitlerle, mikroorganizmalarla etkileşime geçmeyen bireylerin bağışıklık sistemi normalde olması gerektiği şekilde gelişmemektedir [16]. Son dönemde, gastrointestinal mikrobiyal çevre, özellikle toksoplazma, *Helicobacter pylori*, hepatit A gibi sıcak iklimlerde yaşadığı ve Th1/Th2 yardımcı hücre dengesini değiştirdiği düşünülen enfeksiyonlar üzerinde durulmaktadır [16]. Bu etkenler tarafından enfekte edilmiş olan grupta hastalığın görülme oranı daha düşüktür. Bu enfeksiyon etkenlerinin sıcak iklimlerde etkili olması, hastalığın Ekvator'da az görülmesi durumu ile korelasyon halindedir. MS'te myeline karşı otoimmün reaksiyonun oluşumunda Th1/Th2 dengesinin bozulması bir mekanizma olarak önerilmektedir, aynı şekilde alerjik astım, atopik dermatit gibi atopilerde de Th1/Th2 dengesi üzerinde durulmaktadır [17], dolayısı ile Hijyen Teorisi'nin bir ölçüde kabul edilebilir olduğu düşünülebilir. Bu hastalık etkenlerinin otoimmün hastalıkları ne şekilde etkilediğinin kesin olarak belirlenmesi gereklidir.

Ekvator'dan uzaklaştıkça hastalığın görülme sıklığı artmaktadır, buna paralel olarak ekvator'dan uzaklaştıkça alınan güneş ışığı miktarı da azalmaktadır, bu durum güneş ışığı alımı ile direkt olarak bağlantılı olan D vitamini ile ilgili çalışmalar yapılmasına sebep olmuştur. Bol D vitamini içeriğine sahip olan balık ile beslenenlerde MS prevalansı hem daha düşüktür, hem de hastalık daha hafif seyretmektedir [18]. Aynı

şekilde daha yüksek yerleşimlerde yaşayan aynı genetik kökene sahip gruplarda, daha alçak yerleşimlerde yaşayanlara göre daha düşük MS görülmektedir, bu durum alınan güneş ışığı ile ilişkilendirilmektedir. 52 kişilik MS hasta grubu ile yapılan çalışmada, hasta grubunun %69'unda serumdaki 25-hydroxycholecalciferol (Vitamin D aktif formu) düzeyi olması gerekenin ($>50\text{nmol/l}$) altında bulunmuştur, buna paralel olarak kemik erimesi de yüksek düzeydedir [18]. Yapılan sınırlı sayıdaki klinik çalışma yüksek dozda D vitamini verilmesinin hastalığın atak dönemini azalttığını göstermiştir [19]. Fransa'da yapılan bir tarama çalışmasının sonuçları Şekil 1.3.te gösterilmektedir. Fakat çalışmalar şu an için yetersiz düzeydedir ve tedavide kullanılacak doz kesin olarak belirlenmemiştir.



Şekil 1.3 : Fransa'da 9 farklı bölgede yerleşik olan populasyonlar için serumdaki D vitamini düzeyi-MS prevalans ilişkisi ($r=0,769$, $p<0,01$) [19]

MS hastalığının oluşumunda bazı başka hastalık etkenlerinin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, MS hastalarında bir tür herpes virüsü olan ve insanların %90'ında görülen Epstein Barr virüsüne karşı daha yüksek antikor içeriği bulunmuştur [20]. Epstein Barr virüsü, B hücrelerini ve epitel hücrelerini enfekte edebilir, erken yaşlarda herhangi bir semptomla sebep olmasa da adolesan ve erişkinlik döneminde enfeksiyöz mononükleoze sebep olur, bu hastalığın sonucu olarak bir tür otoimmün anemi görülebilir [21]. Epstein Barr Virüsü çekirdek antijeni (EBNA) ve onun bir bileşeni olan EBNA-1 e karşı olan antikor miktarı MS

grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı ($p:0,05$, $p:0,03$) şekilde fazla olmasına rağmen, EBV-MS arasındaki ilişki kesin değildir [22].

1.2.3 Multiple skleroz kalıtılabilirliği ve moleküler genetiği

MS genel olarak kalıtılabilir bir hastalık olarak kabul edilmemektedir. Multiple Skleroz görülen hastaların %20'sinin ailelerinde MS vakası önceden mevcuttur, hastalığın görüldüğü kişilerin %80'inin akrabalarında ise hastalık görülmemiştir. Kardeşlerde beraber görülme riski %5 iken, hastaların çocuklarında ya da ebeveynlerinde görülme riski %2'dir. Her iki ebeveyni de hastalıktan etkilenmiş olan kardeşlerde %25 ve sadece tek ebeveyni etkilenmiş kardeşlerde görülme riski %15'tir. MS görülme riski tek yumurta ikizlerinde (monozygotik) %30'a kadar çıkar. Genetik benzerlik arttıkça riskin artması ve tek yumurta ikizlerinin birinde görüldüğünde diğesinde görülme riskinin %30'a kadar çıkması, belli ölçüde genetik temelli olduğunu düşündürmektedir. [23, 24]

Multiple Skleroz genetik olarak kalıtılabilir bir hastalık olarak kabul edilmese de moleküler genetik açısından üzerinde durulması gereken bazı genler mevcuttur. Altıncı kromozom üzerinde kodlanan insan lökosit antijenleri (HLA), bağışıklık sisteminin hangi antijenlerin kendinden, hangi antijenlerin yabancı olduğunu anlamasını sağlamaktadır. Bazı HLA allellerini taşıyan bireylerde MS riski artmaktadır, hastaların %60'ı HLA DR2 (HLA DRB1 1501) haplotipine sahipken, sağlıklı grubun sadece %30'u bu haplotipe sahiptir [25].

MS'in kadınlarda görülme oranı erkeklerin 2 katı kadardır, bununla paralel olarak 12. kromozom üzerinde kodlanan IFN- γ , erkekler ve kadınlarda farklı gen varyantları şeklinde bulunmaktadır. Kadınlarda yaygın olan varyant, daha fazla IFN- γ üretimine sebep olmakta, bu da Th1 hücrelerinin cevabını arttırmaktadır [26].

2007 yılında Alastair C. ve diğ. tarafından yapılan büyük örneklem büyüklüğüne sahip çalışmada, aile üçlülere (hasta çocuk ve hasta çocuğun her iki ebeveyni) kullanılmıştır, sonuç olarak MS ile kuvvetli şekilde ilişkili olduğu tespit edilen bazı Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bulunmuştur. Bu SNP'ler tabloda listelenmiştir [27]. Aynı konsorsiyumun 2011 yayınladığı daha yeni bir makale ile MS ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde korelasyon gösteren SNP sayısının 52 olduğu açıklanmıştır. Hastalık ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde korelasyon gösteren çok sayıda SNP olması hastalığın genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 1.2 : 2007 yılındaki çalışmada tespit edilen SNP'ler [27].

| İlgili Gen | SNP | P değeri |
|--|---------------|-----------------------|
| IL2RA İnterlökin 2 reseptör α | 2 | $2,96 \times 10^{-8}$ |
| IL7RA İnterlökin 7 reseptör α | nonsynonymous | $2,94 \times 10^{-7}$ |
| HLA-DRA | Çok sayıda | $8,94 \times 10^{-8}$ |

1.2.4 MS semptomları (belirtileri):[28, 29, 30]

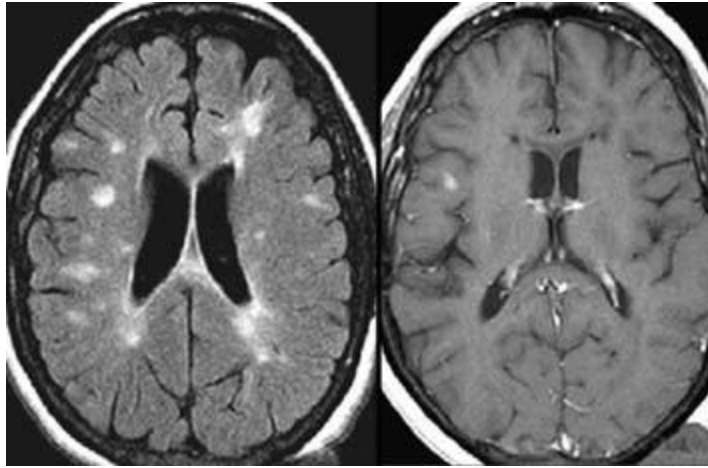
- Görme ile ilgili kayıplar görülebilir. Bulanık görüntü,çift görüntü, 2 göz arasında koordinasyon kaybı, tek gözde görme kaybı gibi belirtiler görülebilmektedir.
- Kol ve bacaklarda güçsüzlük, koordinasyon ve denge kaybı, kısmi ya da tam felç görülebilir.
- İstemsiz kas kasılması
- Yüzde acı
- Vücut kısımlarının konumları ile ilgili algının kaybedilmesi
- İktidarsızlık
- Yutma Problemi
- Solunum Problemi
- Konuşmada çeşitli problemler ortaya çıkar
- Dikkat ve konsantrasyon kaybı
- Sıralı görevleri yerine getirememe
- Muhakeme yeteneği kaybı
- Belli ölçüde hafıza kaybı
- Depresyon
- Manik depresyon
- Paranoya
- Kontrol edilemeyen ağlama ve gülme dürtüsü
- Altına Kaçırma
- Titreme (tremor): Serebellumda (beyincik) myelinin hasar görmesi sonucu ortaya çıkar.

1.2.5 Multiple skleroz teşhisi

Multiple Skleroz teşhisi zor olan bir rahatsızlıktır, bu sebeple hastalık başlangıcından uzun süre sonra teşhis edilebilmektedir. Beyinde oluşan plakların tespiti için manyetik rezonans(MR) yöntemi (Şekil), sinirsel iletimi incelemek için elektro-fizyolojik testler kullanılmaktadır, son aşamada hastalıktan şüphelenildiğinden Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) (Cerebrospinal Fluid) örneği alınarak içinde olmaması gereken antikor gibi unsurların varolup olmadığı araştırılmaktadır.

1.2.5.1 Multiple skleroz teşhisinde MR kullanımı

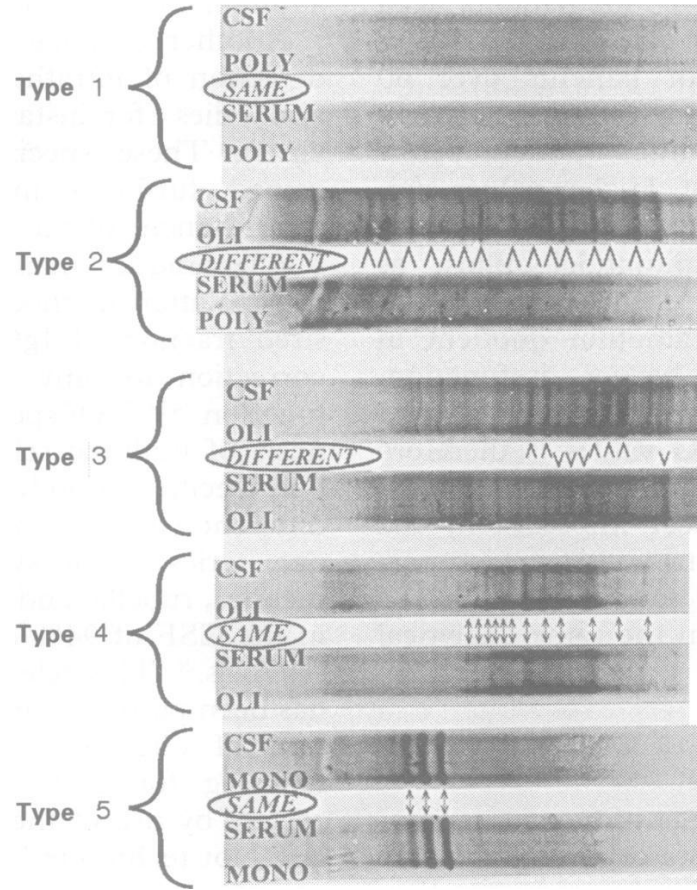
MR, MS teşhisinde kullanılan en hassas yöntemdir. Konvansiyonel MR MS teşhisi için yeterlidir, başlangıç aşamasındaki lezyonları ince lineer yapılar şeklinde tespit etmek mümkündür , küçük lokal lezyonları tespit etmek için FLAIR (Fluid attenuated inversion recovery) yöntemi kullanılır [31].



Şekil.1.4 : MR da MS plaklarının görünümü [31]

1.2.5.2 Multiple skleroz teşhisinde BOS analizinin kullanımı

Beyin Omurilik Sıvısı ya da Serebşpinal sıvı (BOS) analizi için kullanılan en yaygın yöntem, BOS ve serumdaki immunoglobulin G' lerin (Ig G) izoelektrik odaklama (isoelectric focusing) yöntemi ile karşılaştırılmasıdır, BOS'ta serumdan farklı IgG bantlarının görülmesi Multiple Skleroz teşhisi için kullanılmaktadır, farklı bantlar Şekil 1.5 te görülmektedir [17]. Tamamlayıcı test olarak, kan-BOS bariyerinin fonksiyonunu kontrol etmek için temel BOS proteini olan albuminin BOS/serum oranına ($>7 \times 10^{-3}$) ya da BOS'taki lökosit sayısına bakılabilir, normal şartlarda BOS'taki hücre sayısı $4/\mu\text{l}$ den az olmalıdır, MS teşhisi için >4 olması beklenir [28].



Şekil 1.5 : Serum-BOS(CSF) IgG İzoelektik Odaklama (2. ve 3. MS) [28]

1.2.5.3 Otopsi ile beyin dokusunda MS teşhisi

Daha önce teşhis konulmamış bireylerde, ölüm sonrası otopside alınan beyin kesiti incelendiğinde MS plakları gri-pembe, sarı renklere görülmektedir (Şekil 1.6).



Şekil.1.6 : Beyin kesitinde MS plaklarının görünümü [14]

Pembe renkteki plaklar, inflamasyon bölgesine olan kan akımının artması sebebi ile böyle gözükmetedir ve yeni oluşmuş bölgelerdir. Sarı renkteki plaklar, myelin yıkımı sonucu oluşan, yıkıma uğramış yağ birimlerini içerdiğinden sarı renkte görülmektedir. Gri renkte görülen bölgeler uzun süre önce oluşmuş olan kronik plaklardır, dolayısı ile gliosis adımına geçilmiş ve bu sebeple gri renkte gözükmetedirler [14].

1.2.6 Multiple skleroz tedavisinde kullanılan yöntemler

Tedavi için hormon (kortikosteroid), immün baskılayıcı ve immün modülatör ilaçlar kullanılmaktadır. Hormon kullanımında amaç ataklar sonrası düzelme dönemlerindeki, düzelme hızını arttırmaktır. En yaygın kullanılan yöntemde, 1000mg IV metilprednisolon 5 ila 7 gün hastaya verilerek, dozazaltımına gidilir ve 1 ay içinde kesilir [32]. Farklı markalar altında interferon beta 1a ve beta1b de MS tedavisinde kullanılmaktadır, interferon 1a memeli hücreleri tarafından üretilirken, interferon 1b genetik olarak modifiye edilmiş *Escherichia coli* hücreleri tarafından üretilir [33, 34]. İnterferon kullanımı RR formadaki MS in kötüleşme-nüksetme döneminin hızını azaltır, ama gerçek anlamda bir tedavi yöntemi değildir. İnterferon Beta'nın Beyin Kan Bariyerinin (BBB) bütünlüğünü arttırdığı tespit edilmiştir, böylece istenmeyen bağışıklık sistemi unsurlarının beyne girmesinin önüne geçildiği ve hasta üzerinde olumlu etkisi olduğu düşünölmektedir [34, 35]. İnterferon beta 1a ve 1b gibi immün modülatörlerin yanında glatiramer asetat ve natalizumab gibi immünmodülatörlerde kullanılmaktadır. İmmunsupresör tedavisi yan etkileri sebebiyle daha az tercih edilmekle birlikte, ilerleyici ve sık ataklı durumlarda kullanılmaktadır. Kullanılan başlıca immunsupresör Mitokanstron'dur [32].

1.2.7 Periferel sinir sisteminde görölen MS benzeri demyelinizan hastalıklar:

MSS de görölen MS e benzer şekilde periferel sinir sisteminde de demyelinyasyona sebep olan hastalıklar görölmektedir, başlıcaları Guillain Barr Sendromu ve Kronik İnflamatuar Demyelinizan Poliradikulonöropatidir (CIDP) [36].

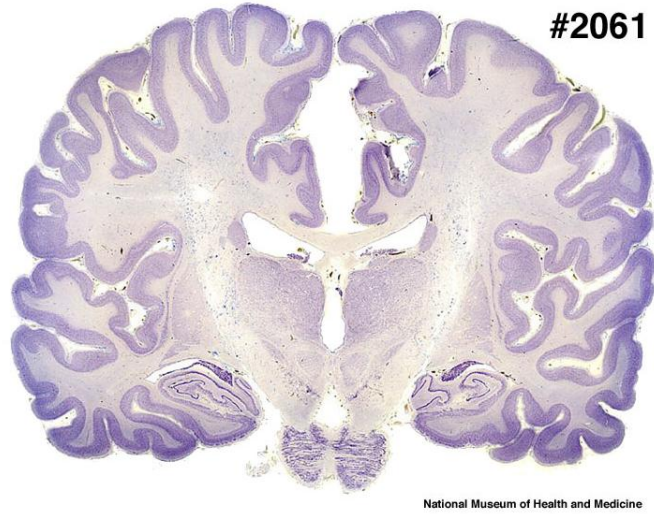
Guillain Barre Sendromu, MS e benzer şekilde genç erişkinlerde (30-50 yaş aralığı) görölen ve sebebi tam olarak bilinmeyen periferel sinir sistemimi etkileyen otoimmün demyelinizan bir hastalıktır. Çoğu hasta hayatta kalmakta ve tamamiyle iyileşmektedir [37] .

CIDP, periferel sinir sistemini etkileyen ve genç erişkinlerde grlen otoimmün demyelinizan bir hastalıktır. Hastada kaslarda zayıflık gibi etkilere sebep olur. İmmün düzenleyici (modülatör) ilaçlara bir önceki sendroma göre daha iyi cevap vermektedir. Hastadan alınan beyin omurilik sıvısında (BOS&CSF) protein çok yüksek düzeydeyken, inflamatuvar hücre sayısı azdır [36, 38].

1.3 Myelin Kılıf

1.3.1 Myelin kılıf yapısı

Beyin incelendiğinde beyaz ve gri kısımlardan oluştuğu görülebilir, burada grlen beyaz kısım myelin kaplı aksonları içerirken, gri kısımlar myelinsiz hücre gövdelerini içeren bölümdür. Şekil 1.7 de görülebilir.

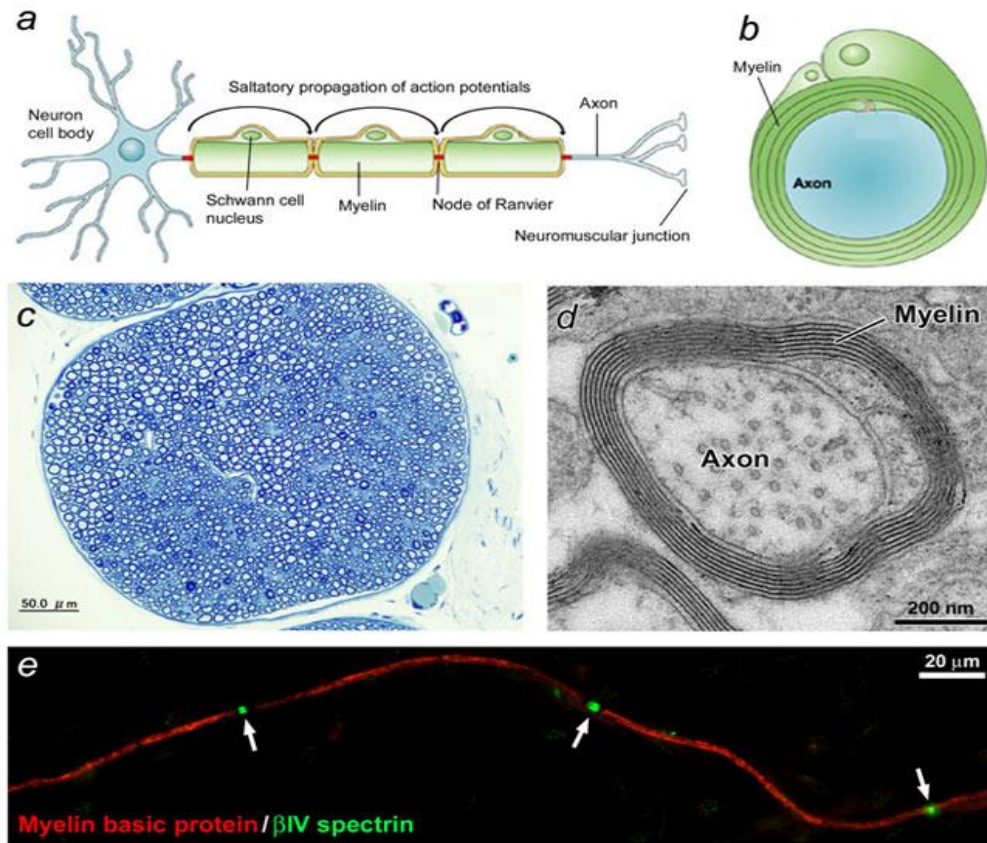


Şekil 1.7 : Dış kısımlarda yer alan gri madde ve iç kısımlarda yer alan beyaz madde [39]

Myelin, 1854 yılında Robert Wurschow tarafından keşfedilmiştir, temel olarak %70-80 lik kısmı yağdan oluşan ve geri kalanı da proteinden meydana gelen bir yalıtım materyalidir, myelini oluşturan temel yağ birimi galaktoserebrozid iken, temel proteinler myelin bazik proteini (MBP), myelin oligodendrosit glikoproteini(MOG) ve prpoteolipid protein (PLP) dir.

Myelin yalıtımı esas olarak sinirsel iletimi hızlandırmaktadır, myelin kılıf daha yakından incelendiğinde Ranvier düğümü (Node of Ranvier) olarak adlandırılan bazı kısımlarda kesinti gösterdiği görülebilir.(Şekil 1.8) Böylece, aksiyon potansiyeli bu

noktalarındaki voltaj kapılı sodyum kanalları ile tazelenmektedir, bu şekilde sinirsel iletim atlamalı (saltatory) dediğimiz şekilde gerçekleşebilir. Myelin kılıfı kaplanmış olan aksonlarda çap (12-20 μm) artar ve sinirsel iletim 70-120 m/s hızlara kadar ulaşır, myelinlenmemiş aksonlarda çap 0,4-1,2 μm iken, iletim hızı 0,5-2 m/s düzeyindedir [40]. MS gibi hastalıklarda myelin kılıfı zarar gördüğünden sinirsel iletimde problemler ortaya çıkmakta ve zaman içinde bu ölüme de yol açabilmektedir. Myelin, MSS (Beyin ve Omurilik) de bir tür glial hücre olan oligodendrositler tarafından oluşturulurken, periferik sinir sisteminde (PSS) yine bir glial hücre olan Schwann hücreleri tarafından oluşturulmaktadır.

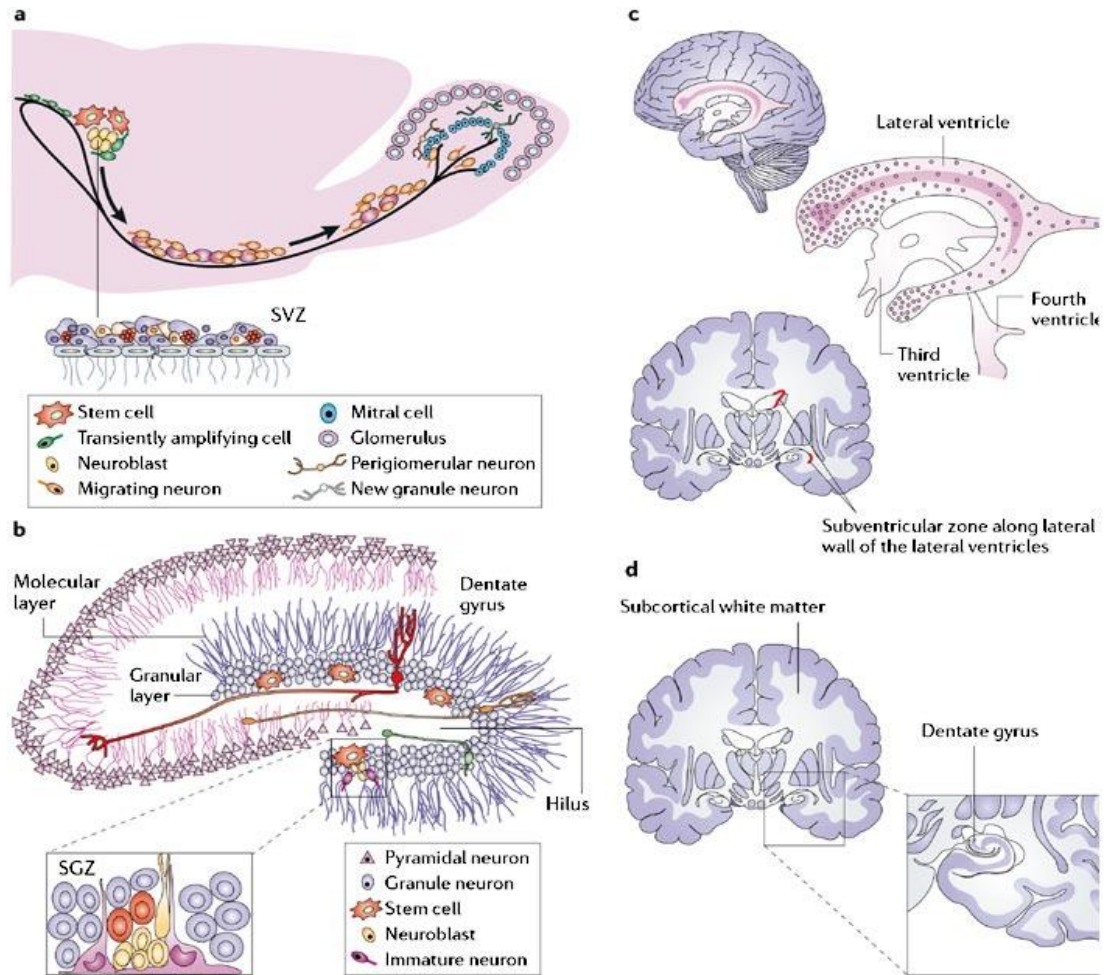


Şekil 1.8 : (a) Myelinize Sinir Fiberi (b) Myeline bir aksonun internod bölgesindeki transverse kesiti (c) Fare siyatik sinirinin ışık mikroskobu altındaki görünümü (Toluidine mavisi ile boyanmıştır. Myelin mavi renkte görülmektedir.) (d) Elektron mikroskobunda fare optik sinirinin myelinize aksonu (e) Okla gösterilen yeşil kısımlar ranvier düğümlerini gösterirken, kırmızı kısımlar myelinize bölgeyi göstermektedir. [40]

1.3.2 Oligodendrositler ve schwann hücreleri

Myelin meydana getiren oligodendrositler, oligodendrosit progenitor hücrelerden farklılaşarak oluşurlar. Oligodendrosit progenitor hücrelerin (OPH) esas kaynağı ise

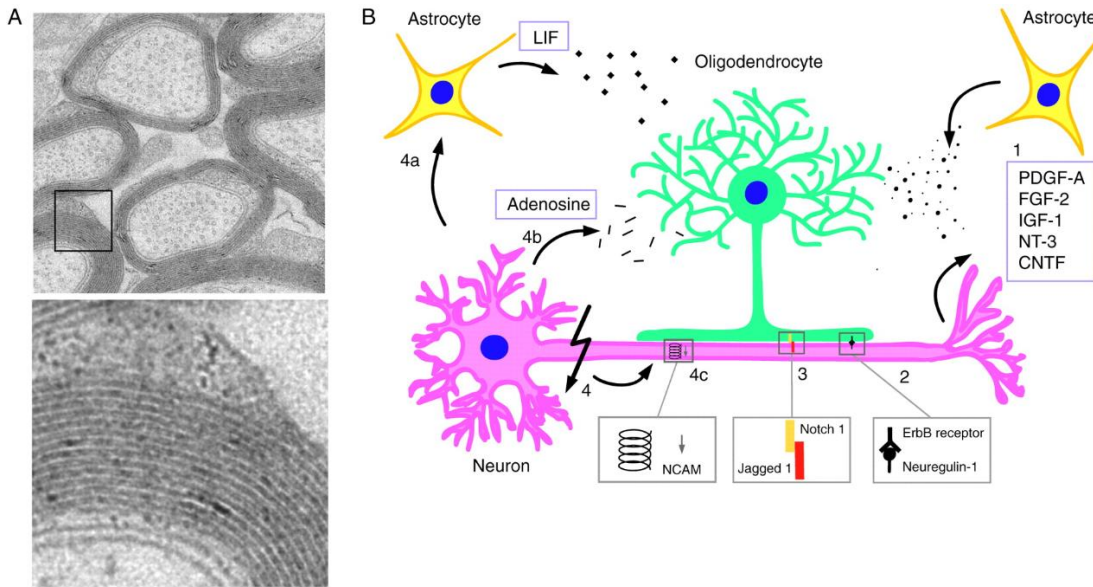
beyindeki Lateral Ventriküllerde yer alan Subventriküler bölgelerdir (şekil 1.9), subventriküler bölge aynı zamanda erişkin bireylerde nörogenesisin yani yeni sinir hücresi oluşumunun meydana geldiği bölgedir. Subventriküler bölgedeki hücrelerden Oligodendrosit gelişimi embriyonik gelişimin geç döneminde ve postnatal (doğum sonrası) erken dönemde gerçekleşir. Fareler için embriyonik gelişimin 12-14 günleri arasında Oligodendrosit hücreleri oluşturan öncü hücreler için marker olarak kabul edilen Kondroitin Sülfat proteoglikan (NG2) tespit edilirken, postnatal 4-12 günlerde oligodendrosit farklılaşması tamamlanır [41]. Schwann prekursor hücreleri, nöral krestten köken alarak embriyonik dönemin 12-13 günlerinde oluşur, 14-15 günlerde ise farklılaşarak olgun olmayan Schwann hücrelerini oluşturur ve bu hücreler doğuma kadar aynı formda kalır [42]. Tek oligodendrosit, schwann hücrelerinin aksine aynı anda birden fazla myelin katmanını oluşturabilir ve birden fazla nöron aksonunun myelinasyonunu gerçekleştirebilir.



Şekil 1.9 : (a), (c) Subventriküler Bölge, (b), (d) Subgranüler Bölge [43]

1.3.3 Myelinasyon ve remyelinasyon

Myelinasyon, sinir sisteminin gelişim döneminde sinir hücresi aksonunun çevresinde myelin kılıfın oluşmasıdır, remyelinasyon ise mevcut olan myelin kılıfın zarar görmesi veya kaybedilmesinin ardından myelin kılıfın yeniden oluşturulmasıdır. Remyelinasyon sonucu oluşan myelin kılıf daha incedir, Ranvier düğümleri arasında kalan internod kısımları daha kısadır. Remyelinasyonun gerçekleşebilmesi için ilk adımda, demyelinasyon ile yıkılmış olan myelinden kalan yıkım ürünlerinin makrofajlar aracılığı ile uzaklaştırılması gerekir, ikinci aşamada progenitör hücreler hasarlı bölgeye göç eder ve olgun oligodendrositlere farklılaşarak myelin kılıf yapısını yeniden oluştururlar [43]. İlginç şekilde, hasarlı bölgeye oligodendrositler yerleştirildiğinde myelin kılıfın yeniden oluşumu gözlenemez, remyelinasyonun gerçekleşmesi ancak oligodendrosit progenitör hücrelerin hasarlı bölgeye ulaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Myelin kılıfın oluşumunda görev alan temel faktörler Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1.10 : Myelin biyogenezinin düzenlenmesinde nöronal ve glial sinyaller (a) Elektron mikroskopunda Optik sinirdeki myelinize sinir fiberleri (b) (1) Oligodendrosit çoğalması ve sağkalımında görev alan, Astrositler ve veya nöronlar tarafından salınan büyüme/trofik faktörleri (PDGF, FGF-2, IGF-1, NT-3, CNTF) (2) Neuregulin ErbB resptörüne bağlanarak oligodendrosit sağkalımını ve olgunlaşmasını destekler. (3) Notch 1 reseptörünün Jagged 1 ile etkileşimi oligodendrosit farklılaşmasını inhibe eder. (4) Elektriksel aktivitedeki artış, astrositlerden LIF, ve nöronlardan adenosin gibi promyelinize faktörlerin salınmasına sebep olur ve aksonal hücre adezyon moleküllerinin ekspresyon düzeyini değiştirir [45].

İlginç şekilde, hasarlı bölgeye oligodendrositler yerleştirildiğinde myelin kılıfın yeniden oluşumu gözlenemez, remyelasyonun gerçekleşmesi ancak oligodendrosit progenitör hücrelerin hasarlı bölgeye ulaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Myelinasyon süreci, insan hayatının ilk 2 yılında en belirgin düzeyde gerçekleşirken, beynin olgunlaşması adolesana ya da geç erişkinliğe kadar devam edebilir [44].

1.3.3.1 NRG1 (Neuregulin 1)

NRG1, epidermal büyüme faktörü ailesinden bir proteindir, 6 farklı alternatif splicing formu mevcuttur, epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile etkileşime girebilir, oligodendrositler ile erbb resptörü üzerinden etkileşir ve oligodendrosit sağkalımını artırır [35]. Schwann hücreleri, periferel sinir sistemindeki myelin oluşumu için gerekli olan özelleşmiş glial hücrelerdir. NRG ve reseptörleri, schwann hücrelerinin gelişimi için gereklidir, NRG aynı zamanda akson çevresinde oluşan myelin kılıfın kalınlığının belirlenmesinde de görev almaktadır [46, 47]. Park ve diğ. (2011) Neuregulin ve tiroid hormonu faktörlerinin birlikte kullanılmasının merkezi sinir sistemindeki myelinasyonu arttıran en iyi kombinasyon olduğunu göstermişlerdir [48]. NRG, kültür ortamında oligodendrosit sağ kalımını, olgunlaşmasını ve oligodendrosit progenitör hücrelerin çoğalmasını artırır [49]. Bununla birlikte, NRG1 null mutant fare deneylerinde ve NRG nin susturulduğu in vitro deneylerde MSS de myelinasyonun normal şekilde gerçekleştiği görülmüştür [50].

1.3.3.2 CNTF (Silier Nörotrofik Faktör)

Cntf etkisi sinir sistemi ile sınırlı olan polipeptid yapıdaki bir hormondur, nöron ve oligodendrositler için bir sağkalım faktörü iken, aynı zamanda inflamasyon sonucu oluşan yıkımın azaltılmasını da sağlar. CNTF' yi kodlayan gen insanda onbirinci kromozomun uzun (q) kolunda yer alır ve 2002 baz çifti büyüklüğündedir. CNTF evrim süreci içerisinde büyük ölçüde korunmuştur, fare ve tavşandan izole edilen CNTF %80 homologdur [51]. Çok sayıda protein yapılı nörotrofik faktörleri insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), silier nörotrofik faktör (CNTF), Lökemi inhibitör faktör (LIF), Nörotrofin-3 (NT 3), interlökin 6 (IL-6)) içeren sürekli sinyaller oligodendrositler ve öncüllerinin kültür ortamında programlı hücre ölümüne girmemesi için gereklidir. Eksojen CNTF nin gelişmekte olan sıçan optik sinirine iletilmesi oligodendrosit ölümünü %80 oranında azaltmıştır, ek olarak in vivo

koşullarda motor nöron sağkalımını da arttırmaktadır [52]. Myelin oluşumuna (myelinogenesis) etki değerlendirildiğinde, Nörotrofin 3 ve insülinin belirgin bir etkileri yokken, Lökemi inhibitör faktör ve Silier nörotrofik faktör myelinasyonu arttırmaktadır, CNTF oligodendrositlerin son olgunlaşma aşamasında etkili olmaktadır, GalC⁺ oligodendrositlerde, CNTF verilmesinin bir oligodendrosit olgunlaşma markerı olan MOG'u eksprese eden hücre sayısını 1.9 kat arttırdığı görülmüştür [53].

1.3.3.3 CXCR4 (fusin) (Kemokin Reseptör Tip 4)

CXCR4, CXCL12 ya da diğer ismi ile SDF1 (Stromal Kökenli Faktör 1) için spesifik olan bir alfa kemokin reseptörüdür. Kemokinler ise lökositleri enfeksiyon ya da inflamasyon alanı ile etkileşime sokan küçük molekül kütleli kemotaktik sitokinlerdir. CXCR4, G proteini eşlikli bir kemokin reseptörüdür ve reseptörün aktivasyonu MSS'deki hücrelerin çoğalma, hayatta kalma, olgunlaşma ve göçlerini etkileyen süreçlerde sorumludur. Kemirgen (rodent) embriyolarında MSS'de CXCL12 ve CXCR4 ekspresyonu tespit edilmiştir, erişkinlerde nöronlarda ve Nöral kök hücrelerde (NSC) CXCR4 ekspresyonu görülmektedir. CXCR4 ekspresyonu Nöral Kök Hücrelerin (NKH), hasarlı bölgeye ulaşması ile bağlantılıdır. CXCR4 ve CXCL12 ekspresyonunun Oligodendrosit Progenitor Hücrelerin (Oph) göçü ve olgunlaşması üzerinde etkilidir, CXCL12 ekspresyonu hasarlı bölgedeki aktif astrosit ve mikroglia hücreleri tarafından gerçekleştirilir [54]. Ubiquitin, CXCR4 için bir agonist olduğu tespit edilmiştir, ubiquitin-proteasome mekanizması ile protein yıkım süreci üzerinde etkilidir, aynı zamanda yakın tarihli çalışmalar bir immün düzenleyici ve baskılayıcı olduğunu da göstermektedir [55, 56, 57, 58]. Patel ve diğ. (2010), Kuprizon Fare modelinde, corpus callosumda astrositler tarafından gerçekleştirilen CXCL12 ekspresyonunun ve astrosit sayısının ilk 6 hafta içinde önemli ölçüde artmakta, süre 12 haftaya uzatıldığında ise astrosit sayısının ve CXCL12 ekspresyonunun belirgin ölçüde azalmakta olduğunu göstermişlerdir [59].

1.4 Hayvan Modelleri

Merkezi sinir sisteminden örnek almanın zor olması sebebi ile Multiple Skleroz'un incelenmesi için hastalığı belli ölçüde simüle eden değişik hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu modelleri kısaca aşağıdaki şekilde sıralamamız mümkündür.

- Otoimmün modeller
- Mutant Modeller
- Viral Modeller
- Kimyasal Temelli Modeller

1.4.1 Otoimmün modeller

Otoimmün modeller denildiğinde temel olarak, Deneysel Otoimmün Ensefalomyelitis (EAE) den bahsedilmektedir. EAE tam olarak MS in karşılığı olmasa da MS in birçok basamağını simüle etmektedir. MS araştırmaları için kullanılan en yaygın modeldir. EAE modelinde myelini oluşturan Myelin Bazik Protein (MBP), Proteolipid Protein (PLP), Myelin Oligodendrosit Glikoprotein (MOG) gibi çeşitli proteinler bütün ya da kısmi (antijen) olarak tam Freund adjuvanı ile birlikte denek hayvana enjekte edilir, beyin kan bariyeri (BBB) bütünlüğünü kaybeder, bunun sonucunda MSS ye infiltre olan immün sistemi hücreleri kendi myelin dokusuna karşı reaksiyon oluşturur [43]. EAE sürekli olarak kötüye giden, inflamatuvar ve demyelinizan bir hastalık oluşturur. EAE modelinde oluşan klinik durum, kullanılan denek hayvanının türüne, soyuna ve otoimmüniteyi oluşturmak için kullanılan antijenin türüne göre değişir. Bütün myelin enjeksiyonu C57BL/6j EAE ye sebep olmaz, MOG proteini enjeksiyonu ise kronik felçle sonuçlanan EAE'ye sebep olur, SJL ve ABH fareler ise bütün myelin enjeksiyonu ile ataklarla seyreden EAE oluştururlar [60]. EAE modelinde çeşitli organizmalar kullanılmaktadır, bu organizmalar aşağıda listelenmiştir.

- Fare
- Sıçan
- Gine Domuzu
- Marmoset
- Rhesus Maymunu
- Makak

1.4.2 Mutant modeller:

Mutant model olarak Shiverer mutant (Myelin Bazik Protein Mutantı), Rumpshaker-Jimpy (Proteolipid protein mutanı) gibi myelin yapısında yer alan proteinlerin

mutant versiyonlarını içeren mutant fareler geliştirilmiştir. Bunun yanında myelin yapısında yer alan Myelin bağlantılı glikoprotein (MAG) için knockout olan fareler de geliştirilmiştir [60].

1.4.3 Viral modeller

Theiler'in Mürin Ensefalomyelitis Virüsü (TMEV) ve Semliki Orman Virüsü gibi virüsler kullanılmakta, bunlar MSS de özellikle oligodendrositler için nörotrofik enfeksiyonu indüklemektedir. Bazılarında ise enfekte olmuş hücreler T-hücreleri ve humoral bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğramaktadır [60]. En yaygın olan TMEV dir. TMEV zarfı olmayan, enterik tek zincirli RNA virüsüdür [61].

1.4.4. Kimyasal temelli modeller

Kimyasal temelli modeller, toksin temelli modeller olarak da adlandırılabilir. Bu modellerde çeşitli kimyasallar demyelinasyon oluşturmak üzere kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan kimyasallar aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- Etidyum Bromür
- Lizolesitin
- 6-Aminonikotinamid
- Anti galaktoserebrozid+ antikor komplemant
- Kuprizon

Etidyum Bromür ya da Lizolesitin gibi direkt olarak MSS ye enjekte edilerek, ya da kuprizon gibi besine karıştırılarak verilir.

1.4.4.1 Lizolesitin

%1 lik tuz çözeltisi şeklinde demyelinizasyon ajanı olarak kullanılan bir membran çözücüsüdür, fare, kedi ve tavşan denekler üzerinde kullanılmaktadır. 1 ul çözelti farenin veya sıçanın omurilik beyaz maddesine enjekte edildikten sonra enjeksiyon bölgesinde 3-8 mm büyüklüğünde bir demyelinize alan meydana getirir. Lizolesitin uygulandığında, oligodendrositlerin bir kısmı ölürken, astrositlerde yalnızca küçük ölçüde bir kayıp olur, demyelinasyon hızlı gerçekleşir ve remyelinasyon da görülür [62]. Bunun dışında lizolesitin, kültür ortamındaki serebellar hücreler üzerindeki demyelinizan etkisi üzerine yapılan çalışmalar da mevcuttur [63].

1.4.4.2 Etidyum bromür

Yaygın olarak, hedeflenen beyaz madde bölgesine enjekte edilmektedir. %0,05 ve %0,1 lik çözeltiler şeklinde enjekte edilmektedir. Sıçan omuriliğinin dorsal funiculus bölgesine enjekte edildiğinde daha geniş, 4-8 mm lik bir demyelinasyon bölgesi oluşturur. Etidyum Bromür oligodendrositler, astrositler ve oligodendrosit progenitör hücreleri öldürür, demyelinasyon görece olarak yavaş gerçekleşir ve remyelinasyon görülür [62, 64].

1.4.4.3 Kuprizon modeli

Kuprizon bir bakır şelatörüdür, yani iyon formdaki bakıra bağlanarak çökelek oluşturur ve diğer reaksiyonlara katılmasını önler, Kuprizon etkisinin ortaya çıkması için uzun süreli uygulama gerekir, kuprizon modelinde demyelinasyonu izleyen remyelinasyon görülür. Kuprizon karıştırılmış yem ile beslenme demyelinasyona, oligodendrositlerin ölmesine sebep olurken, oligodendrosit progenitör hücreleri ve astrositleri öldürmez [62]. Fareler genel olarak %0,2 kuprizon karıştırılmış yem ile beslenir, %0,5 dozu yüksek bulunmakta ve gelişimin erken döneminde (ilk 4 hafta) tolere edilememektedir, 8 haftalık farelerde ölüm oranı %20 ye kadar düşer [65]. Literatür incelendiğinde deneye 6-9 haftalık fareler ile başlanıldığı genel olarak 0-6 hafta kuprizon ile besleme uygulandığı ve ardından normal beslemeye dönüldüğü görülebilir, 6 haftalık uygulamanın sonunda corpus callosum nerdeyse tamamiyle demyeline olmuştur, normal beslenmeye geçildiğinde remyelinasyon görülür. 6 haftalık uygulama sonucunda C57BL/6j fareler için CC'a ek olarak korteksin de tamamiyle demyeline olduğu görülmüştür, süre 12 haftaya uzatıldığında kortekste remyelinasyon belirgin ölçüde gecikmektedir. C57BL/6j farelerin aksine, Balb c farelerde kısmi kortikal demyelinasyon görülür [66]. 0-6 haftanın üzerindeki uygulamalarda demyelinasyon akuttan kroniğe dönüş göstermekte ve 12 haftalık uygulama ile remyelinasyon kapasitesi neredeyse tükenmektedir^[65]. Literatürde kronik demyelinasyon oluşturmak için kuprizon uygulamasının uzatıldığı deneylerin yanında, toplam deney süresinin (demyelinasyon+remyelinasyon) 6 hafta ile kısıtlandığı çalışmalar da mevcuttur. Demyelinasyon seyri fare soyları arasında farklılık göstermektedir, bu çalışmada kullanılan C57bl/6j soyu farelerde esas demyelinasyon Corpus Callosum bölgesinde gerçekleşmektedir. EAE modelinin aksine Beyin Kan Bariyeri bütünlüğünü

korumaktadır [67]. EAE modelinde, kuprizon verildiğinde T hücre aracılı otoinflamasyon durdurulmaktadır [68]. Kuprizon modelinde oluşan lezyonlar, CD3+ olgun T hücreleri lezyon bölgesinde mevcut olmasa da ve kan damarlarında inflamasyon görülmesi de, MS'da görülen 3.tip lezyonlara benzemektedir [65].

Bakır metabolizması:

Beynin normal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için kuproenzimler (bakıra bağlı çalışan enzimler) önemlidir [69], vücutta Cu^{+2} (cupric) ve Cu^{+1} (cuprous) formları bulunmaktadır, en fazla bulunan Cu^{+2} dir. X bağlantılı resesif bir hastalık olan ve bakır metabolizmasında problem oluşturan Menkes Hastalığı'nda karaciğer ve beyinde Cu akümüasyonu azken, böbrek ve boşaltım yollarında yüksektir ve ilerleyici nörodejenerasyon görülür [70, 71]. Bakır, süperoksit dismutaz, sitokrom C oksidaz gibi 30 farklı proteinin doğru şekilde fonksiyon göstermesi için gereklidir. Serumdaki bakır düzeyi inflamasyon ve enfeksiyon durumlarında artar, enfeksiyonda aktive lenfatik hücrelerin interlökin 2 (IL-2) sentezi için gereklidir, IL-2 nin antijen seçici sitotosik T hücrelerinin gelişimi, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olduğu düşünüldüğünde, Cu nun bağışıklık sistemi için önemi anlaşılabilir [72].

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Farelerin Bakımı:

C57BL/6J cinsi 80 adet fareden 55 tanesi denek grubu olarak 12 hafta boyunca %0.2 kuprizon içeren diyetle tabii tutuldu, diğeri 25 tanesi ise aynı koşullarda normal yemle beslenmiştir. 12 hafta sonunda denek grubu 4 hafta daha normal diyetle tabii tutulmuştur, iki haftada bir denek grubundan 3 ve kontrol grubundan 1 fare, bayıldıktan sonra canlı iken kalbinden şırınga ile kanı alınmış, kurban edilmiştir. Sonraki aşamada kafatası açılarak beyin izolasyonu gerçekleştirilmiştir, izole edilen beyin bir kısmı RNA izolasyonu için kullanılmak üzere RNAase free tüpe konularak saklanmıştır.

2.2. Fare Beyninden RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için Roche High Pure RNA Tissue Kit kullanılmıştır.

1. 1,5 ml'lik nükleaz free tüpe, 400µl Lysis/Binding tamponu ve parçalanmış beyin dokusu eklenir ve bir şırınga ile çek bırak yapılarak homojen bir görüntü elde edilir.
2. Mikrosantrifüjde maks. hızda 2 dakika boyunca santrifüjlenir. Bundan sonraki adımlar için sadece süpernatant kısmı kullanılır.
3. 200 µl absolut etanol lizat süpernatanta eklenir ve iyice karıştırılır.
4. High pure filtreli tüp toplama tüpü ile kombine edilerek kullanılır ve örneğin tamamı üst hazneye pipetle boşaltılır. (maks. hacim 700 µl)
5. Standart bir masaüstü santrifüjde 30 san. maks. hızda (13000xg) santrifüjlenir. Santrifüj sonunda filtreli üst haznesinde sıvı kalmaması gereklidir. Aksi takdirde santrifüj süresi uzatılır, üst haznede sıvının kalmadığı aşamaya kadar kısa sürelerle aynı hız mertebesinde (13000 x g) santrifüj uygulanır, üst haznede sıvı kalmadığı aşamada santrifüj kesilir.

6. Filtreli tüp, toplayıcı tüpün içinden çıkarılır ve toplayıcı tüpün içindeki sıvı boşaltılır. Filtreli tüp, tekrar toplayıcı tüpün içine konularak, kullanılmaya devam edilir.
7. Her izolasyon için 90 µl DNA İnkübasyon Tamponu (Beyaz kapaklı), 1,5 ml'lik steril tüpe eklenir ve 10µl DNase 1 working çözeltisi eklenip karıştırılır. Çözelti pipetle filtreli tüpün üst haznesine boşaltılır. +15 +25 °C ta 15 dakika inkübe edilir.
8. 500 µl yıkama tamponu 1 (siyah kapak), filtreli tüpün üst haznesine eklenir. 15 san. 8000xg de santrifüj uygulanır. Filtreli tüp, toplayıcı tüpün içinden çıkarılır ve toplayıcı tüpün içindeki sıvı boşaltılır. Filtreli tüp, tekrar toplayıcı tüpün içine konularak, kullanılmaya devam edilir.
9. 500 µl yıkama tamponu 2 (mavi kapak), filtreli tüpün üst haznesine eklenir. 15 san. 8000xg de santrifüj uygulanır. Filtreli tüp, toplayıcı tüpün içinden çıkarılır ve toplayıcı tüpün içindeki sıvı boşaltılır. Filtreli tüp, tekrar toplayıcı tüpün içine konularak, kullanılmaya devam edilir.
10. 300µl yıkama tamponu 2 (mavi kapaklı), filtreli tüpün üst haznesine eklenir. 2 dak. tam hızda (13000xg) santrifüj.
11. Filtreli tüp, alt haznedeki sıvı ile temas ettirilmeden, toplayıcı tüpten dikkatlice çıkarılır. Filtreli, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
12. 100 µl elution tampon, filtreli tüpün üst haznesine eklenir. 1dak. 8000xg santrifüj
13. Mikrosantrifüj tüpü, artık eluted RNA yı içermektedir.
14. İzole edilen RNA nın bir kısmı -80°C ye kaldırılırken, geri kalan kısım cDNA sentezi için kullanılmıştır.

2.3. cDNA Sentezlenmesi

cDNA sentezi için Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır.

1. Aşağıdaki reaksiyon karışımı tüpte, buz üzerinde hazırlanır.

Template RNA (10µl)

Primer-oligo dT (1µl)

Water (1µl)

Nazikçe karıştırılır ve mikrosantrifüjde 3-5 saniye spin down yapılır.

2. 70°C de 5 dak. boyunca inkübe edilir, buz üzerinde soğutulur ve kısa bir santrifüj uygulanır.
3. Tüp buzun üzerine yerleştirilir ve aşağıda belirtilen sıraya uyularak bileşenler eklenir.

5x reaksiyon tamponu (4µl)

Ribolock(1µl)

10 mM dNTP karışımı (2µl)

4. oligodT primerler için 37°C' de 5 dak. inkübe edilir.
5. 1 µl Rever Aid M-MuLV Reverse Transkriptaz eklenir.
6. Karışım 42°C'de 60 dak. inkübe edilir.
7. Reaksiyonu durdurmak için 70°C'de 10 dakika ısıtılır.
8. Buz üzerinde soğutulur.

2.4. Taqman Prob ile Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

2.4.1. qRT-PCR öncesi

Sentezlenen cDNA ile PCR gerçekleştirilmeden önce aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmelidir.

1. Uygun referans genler belirlenir.
2. Hedef genler için primerler ve proplar dizayn edilir.
3. Cuprizone ile beslenen farelerden, qRT-PCR analizi ile ekspresyon analizi yapılacak olan haftaların seçilmesi
4. Örnekler için cDNA konsantrasyonları eşitlenilmeli, ve pool yapıp yapılmayacağı belirlenmelidir.

2.4.1.1 Referans genin seçilmesi

Referans gen olmak üzere ve elde edilen verilerin normalizasyonu için uygun bir gen seçilmelidir. Referans gen belirli özellikleri taşımalıdır.

- Hedef gen ile eşzamanlı olarak amplifiye olmalıdır.
- Mümkün olduğu kadar sabit bir düzeyde eksprese olmalı ve deneysel uygulamadan etkilenmemelidir.

Seçilen referans genler:

- I. Gapdh
- II. Pgk1

2.4.1.2. Primer ve prob dizaynı:

Roche Applied Science internet sitesindeki Universal Problibrary Assay Design Center kullanılmıştır.

1. Assay Design Center ekranında, ilgilenilen organizma (*Mus musculus*) seçilir.
2. Sekans dizisi, gen adı ya da sekans ID'si girilir.
3. Ardından design seçeneği seçilir. Sistem gerekli probu, forward ve reverse primeri belirler.
4. Çok sayıda varyanta sahip genler (IGF1, IGF2) için dizayn yapılırken, varyantların sahip olduğu ortak sekans bölgeleri Avrupa Biyoenformatik Enstitüsü(EBI) sitesindeki ClustalW2 programı üzerinden analiz edildikten sonra, prob ve primer dizaynı Assay Design Center'da bu ortak diziler için yapılır.
5. Dizayn edilen primerler NCBI'nin sitesindeki primer blast ile analiz edilir.

*Gapdh için "Universal ProbeLibrary Mouse GAPD Gene Assay" kullanılmıştır.

Aşağıdaki aday hedef gen listesinden (Çizelge 2.1) seçilen Neuregulin 1 (NRG 1), Silier Nörotrofik Faktör (CNTF), C-X-C Kemokin reseptörü Tip 4 (CXCR4) için Lightcycler 480 cihazı ve Roche Universal Prob Library problemleri ile (qRT) gerçek zamanlı kantitatif PCR ekspresyon analizi yapılmıştır.

Çizelge 2.1 : Aday Hedef Genler için dizayn edilen primerler ve UPL prob listesi.

| GEN ADI | Forward Primer | Forward Primer Tm (°C) | Reverse Primer | Reverse Primer Tm (°C) | Prob |
|----------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------|
| igf1 | gaccgaggggcttttacttc | 60 | catccacaatgctgtctga | 60 | #67 |
| igf2 | cgcttcagttgtctgttcg | 59 | gcagcactctccacgatg | 60 | #40 |
| cntf | ttgattccacaggcacaaaa | 60 | ccctgcctgactcagaggt | 60 | #76 |
| Gstp1 | tgccaccctcatctacaccaac | 59 | gacagcagggtctcaaagg | 59 | #105 |
| Pdgfr α | gtcgttgacctgcagtgga | 60 | ccagcatggtgatacctttgt | 59 | #80 |
| Cxcr4 | tggaaccgatcagtgtagt | 59 | gggcaggaagatcctattga | 59 | #38 |
| LIF | aaacggcctgcatctaagg | 60 | agcagcagtaagggcacaat | 59 | #109 |
| FGF2 | cggctctactgcaagaacg | 59 | tgcttgagttgtagttgacg | 60 | #4 |
| Nrg1 | caggaactcagccacaaaca | 59 | cccagtcgtggatgtagatgt | 59 | #68 |
| Myt1 | ggccatgcatgaaaatgtact | 59 | gcaatgggacatccagataaa | 59 | #71 |
| Pgk1 | tacctgctggctggatgg | 60 | cacagcctcggcatatttct | 60 | #108 |

2.4.1.3 qRT-PCR ile analiz edilecek haftaların belirlenmesi:

Deneyin, 0, 4, 6, 8, 10, 12, 16. haftalarındaki kontrol ve denek grubu c57bl/ 6j fareler için qRT-PCR ile gen ekspresyon düzeyleri ölçülecektir. Hangi haftalardaki farelerin sakrifiye edileceğine karar verilirken, kuprizon modeli ile ilgili mevcut literatür incelenmiş ve buna göre hareket edilmiştir. 12. hafta daha önceki çalışmalarda kronik demyelinasyon için bir eşik noktası olarak belirlendiği için 12.haftada kuprizon beslenmeden çekilmiştir, 12-16. haftalar arası dönemde kronik demyelinasyon sonrası beyinde hedef genlerin ekspresyon düzeyinin ne şekilde değiştiğine bakılmıştır.

2.4.1.4 cDNA ların nanodrop ile ölçülmesi:

260nm/280nm değerleri ve cDNA miktarı her örnekten 0,8uL kullanılarak nanodrop ile ölçülmüştür. Nanodrop ölçümü az miktarda örnek hacmi gerektirdiği için tercih edilmiştir, 3 ölçümde bir PCR grade distile su ile ölçüm alınarak nanodrop kalibrasyonu sağlanmıştır. Saf cDNA 260/280nm ölçümü 1,8 olmalıdır, 1,8 den büyük ölçüm RNA kontaminasyonuna işaret ederken , 1,8 den küçük değerler protein kontaminasyonuna işaret etmektedir. 1,6-2 arasındaki değerlere sahip olan örnekler qRT-PCR analizi için kullanılmıştır. Saklama koşulları sebebi ile içeriğini kaybeden bir kısım örnek, çalışmada kullanılamamıştır.

2.4.1.5. Örnekler için cDNA konsantrasyonlarının eşitlenilmesi ve pool yapılması:

Değişik cDNA konsantrasyonlarına sahip cDNA örnekleri, uygun miktarda distile su eklenerek eşit konsantrasyona getirilir.

- 1 hedef gen için 2 adet housekeeping gen kullanılarak qRT-PCR analizi yapılacaktır. Her ekspresyon ölçümü 3 kez gerçekleştirilecektir ve her qRT-PCR deneyi için 5µl cDNA gerekmektedir. Buradan hareketle cDNA örnekleri, ng/µl cDNA içerecek şekilde, distile su eklenerek seyreltilecektir.
- Seçilen her hafta için, örneklerden elde edilen cDNA dan pool oluşturulur. Pool yapılmadan önce ilk olarak pool yapılacak örneklerdeki cDNA konsantrasyonları eşitlenir. qRT-PCR yapılacağı zaman mevcut pool konsantrasyonları kullanılabilir en düşük konsantrasyonlara getirilerek qRT-PCR analizine sokulur. Böylece çok sayıda reaksiyon için gerekli örnek sağlanmaktadır.

2.4.2. qRT PCR analizinin yapılması

qRT PCR analizine başlamadan önce ilk aşamada uygun prob, primer konsantrasyonları ve gerekli örnek konsantrasyonunun belirlenmesi için optimizasyon yapılmıştır. Amplifikasyon eğrilerine bakılarak prob ve primer konsantrasyonları yarı yarıya düşürülmüştür. Primer dimer v.b. durumların kontrolü için (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) gibi 4 farklı örnek konsantrasyonu kullanılarak verimlilik ve hata miktarları belirlenmiştir. 1,8-2,0 arasındaki verimlilik (efficiency) değerleri yeterli olarak kabul edilmiştir. Ct değerininin de örnek miktarının el verdiği ölçüde $10 < Ct < 30$ olmasına dikkat edilmiştir. 30 un üstünde olduğu ölçümlerde cDNA konsantrasyonu olabildiği ölçüde arttırılmıştır. Deney için Universal Probe Library problemleri kullanıldığı için, $MgCl_2$ konsantrasyonu uygun şekilde optimize edilen "probe master" kullanılmıştır, probe master polimerazı içermektedir.

Referans Genler: Gapdh, Pkg1

Kullanılan Hedef Genler: CXCR4, CNTF, NRG1

Primer ve problemler, master çözüldükten sonra, kısa süre spin yapılır ve pipetle çek bırak yapılarak iyice karıştırılır.

20µl lik PCR reaksiyonu için mix, Çizelge 2.2 deki ölçülere uygun olarak hazırlanmıştır. Mix hazırlandıktan sonra vorteks yapılmaz. Çoklu deneyler için gereken hacim tablonun hacim kısmındaki değerler reaksiyon sayısı ile çarpılarak bulunmuştur.

96 kuyulu Lightcycler 480 plate kullanılmıştır, Her kuyuya 15µl mix yüklendikten sonra, 5µl cDNA ilave edilmiştir. Buharlaşarak ortaya çıkan kayıpları önlemek için Üzeri Lightcycler 480 Sealin Foil ile kapatılmıştır. Deneylerde, referans ve hedefler için yüklemeler aynı plate ve farklı kuyulara yapılmıştır.

Programda Dual Colour Hydrolysis Probe seçilmiştir. Gapdh referans geni için 533-580nm (VIC) dalgaboyu kullanılırken, hedef genler ve Pkg1 referans geni için 465-510 nm (FAM) dalgaboyu kullanılmıştır.

Hedef genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklik her iki referans gene göre ayrı ayrı ve iki referans genin ortalamalarına göre olmak üzere 3 farklı şekilde hesaplanmıştır. Hesaplamalarda "Advanced Relative Quantification" kullanılmıştır. ARQ kullanılırken yüksek doğruluk seçeneği tercih edilmiştir.

Çizelge 2.2 : qRT PCR mix içeriği.

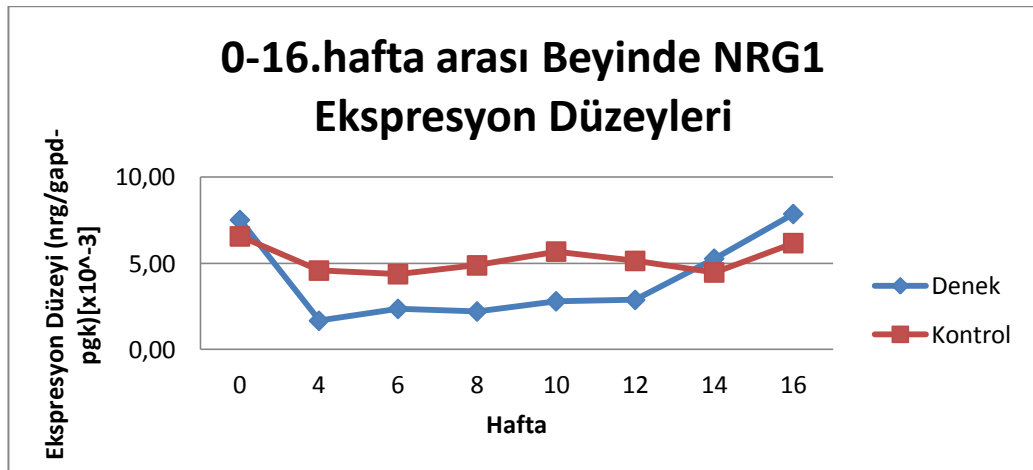
| Bileşen | Konsantrasyon | Hacim | Son Konsantrasyon |
|-------------------------------|----------------------|--------------|--------------------------|
| Primer (Forward) | 20µM | 0,2 µl | 400 nM |
| Primer (Reverse) | 20 µM | 0,2 µl | 400 nM |
| UPL prob | 10µM | 0,2 µl | 200 nM |
| Light Cycler 480 Probe Master | 2x | 10,0 µl | 1x |
| Su | - | 4,4 µl | |
| Toplam Hacim | | 15,0 µl | |

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

NRG1, CNTF ve CXCR4 hedef genleri için qRT-PCR yöntemi ile bulunan ekspresyon düzeyleri aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j fareler ve normal beslenmeye tabi tutulan kontrol grubundaki aynı soy farelerin beyinlerinde NRG1 geninin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak).

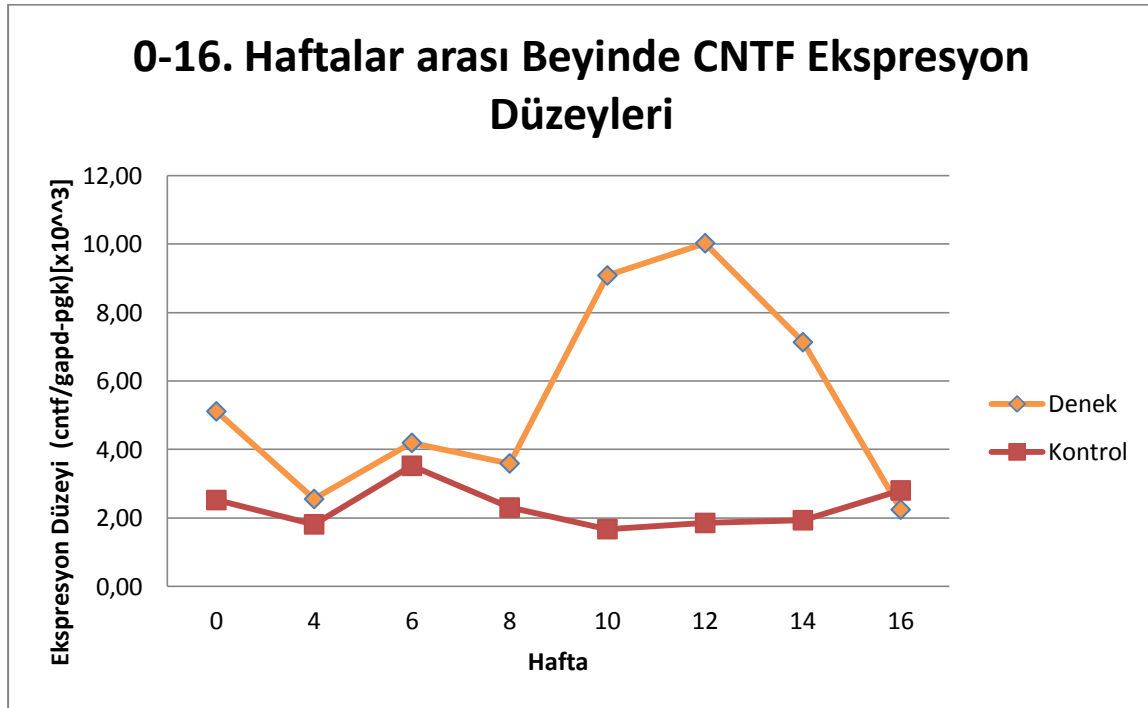
| Hafta | Denek ($\times 10^{-3}$) | Denek Std Sapma | Kontrol ($\times 10^{-3}$) | Kontrol Std Sapma | P değeri |
|-------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------|----------|
| 0 | 7,51 | 0,149 | 6,56 | 0,164 | |
| 4 | 1,67 | 0,542 | 4,58 | 0,134 | <0,001 |
| 6 | 2,36 | 0,347 | 4,37 | 0,071 | <0,001 |
| 8 | 2,21 | 0,257 | 4,88 | 0,161 | <0,001 |
| 10 | 2,80 | 0,265 | 5,68 | 0,200 | <0,001 |
| 12 | 2,88 | | 5,14 | | |
| 14 | 5,27 | 0,111 | 4,47 | | |
| 16 | 7,86 | | 6,17 | | |



Şekil 3.1 : 0-16 haftalar arasında NRG1 hedef geninin ekspresyon değişimi

Çizelge 3.2 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j fareler ve normal beslenmeye tabi tutulan kontrol grubundaki aynı soy farelerin beyinlerinde CNTF geninin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak) .

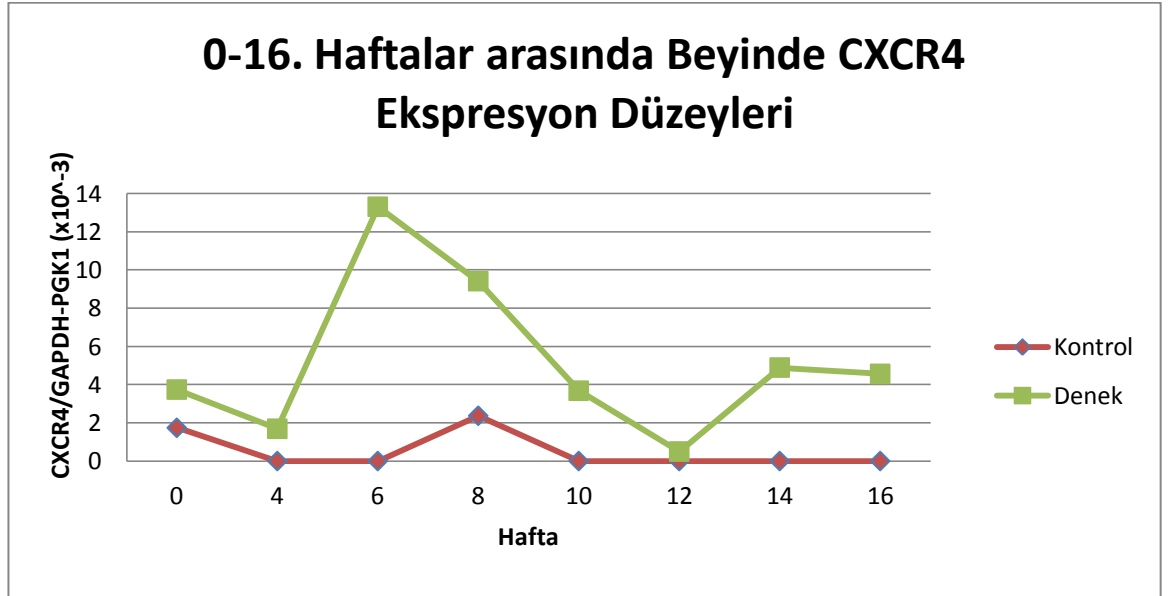
| Hafta | Denek($\times 10^{-3}$) | DenekStd Sapma | Kontrol($\times 10^{-3}$) | Kontrol Std Sp. | P değeri |
|-------|---------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------|----------|
| 0 | 5,11 | 0,488 | 2,52 | 0,166 | |
| 4 | 2,55 | 0,244 | 1,81 | 0,130 | |
| 6 | 4,19 | 0,764 | 3,52 | 0,194 | 0,021 |
| 8 | 3,59 | 0,325 | 2,30 | 0,286 | 0,037 |
| 10 | 9,08 | 1,004 | 1,67 | 0,225 | <0,001 |
| 12 | 10,02 | | 1,85 | | |
| 14 | 7,13 | 0,532 | 1,93 | | |
| 16 | 2,24 | | 2,80 | | |



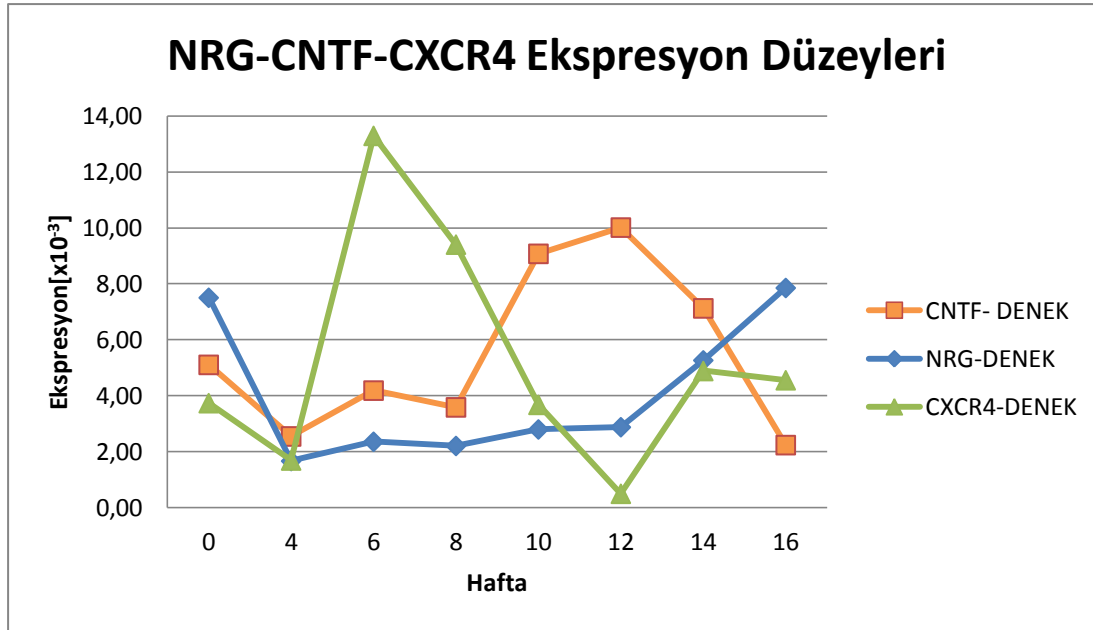
Şekil 3.2 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j fareler ve normal beslenmeye tabi tutulan kontrol grubundaki aynı soy farelerin beyinlerinde CNTF geninin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak)

Çizelge 3.3 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j fareler ve normal beslenmeye tabi tutulan kontrol grubundaki aynı soy farelerin beyinlerinde CXCR4 geninin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak).

| Hafta | Denek (x10 ⁻³) | Denek Std Sapma | Kontrol (x10 ⁻³) | Kontrol Std Sapma | P değeri |
|-------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------|----------|
| 0 | 3,74 | 0,282 | 1,74 | 0,149 | |
| 4 | 1,69 | 0,185 | ~0 | | 0,04 |
| 6 | 13,3 | 0,569 | ~0 | | 0,015 |
| 8 | 9,41 | 0,407 | 2,37 | 0,496 | 0,004 |
| 10 | 3,68 | 0,313 | ~0 | | 0,002 |
| 12 | 0,05 | | ~0 | | |
| 14 | 4,89 | 0,053 | ~0 | | <0,001 |
| 16 | 4,56 | | ~0 | | |



Şekil 3.3 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j fareler ve normal beslenmeye tabi tutulan kontrol grubundaki aynı soy farelerin beyinlerinde CXCR4 geninin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak)



Şekil 3.4 : 12 hafta boyunca %0,2 kuprizon ile beslendikten sonra 4 hafta boyunca normal beslenmeye tabi tutulan C57BL/6j farelerin beyinlerinde CXCR4, CNTF, NRG genlerinin ekspresyonundaki değişim (gapd-pgk ekspresyonunun ortalamasına rölatif olarak)

Kuprizon uygulaması ile beraber denek grubunda, beyinde NRG ekspresyonu belirgin ölçüde düşmekte, fakat bu düşüş 0-4 hafta arasında gerçekleşmekte ($p<0,001$) ve 12. haftaya kadar ekspresyon yakın düzeylerde seyretmektedir (4-10.hafta $p<0,001$), 12.haftada kuprizon uygulamasının bitirilmesinden sonra 4 hafta içerisinde başlangıçtaki düzeyine geri dönmektedir. Dolayısı ile, 6-12 hafta arasında NRG ekspresyonunda belirgin bir düşüş yoktur, bu da akut demyelinasyondan, kronik demyelinasyona geçiş sürecinde NRG ekspresyonundaki düşüşün etkili olmadığını göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, NRG1 ile tiroid hormonunun beraber kullanımının myelinasyonu arttıran en iyi kombinasyon olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında NRG1 geni susturulsa dahi Merkezi Sinir Sisteminde myelinasyon devam etmektedir. NRG1, MSS myelinasyonu için zorunlu bir faktör olmasa da, kuprizon uygulamasından belirgin şekilde etkilenmektedir. Dolayısı ile remyelinasyon sürecinde farklı alternatif yolların rol aldığını ve bu farklı alternatif yolların kuprizon uygulaması ile zarar gördüğünü düşünebiliriz.

Kuprizon uygulaması ile beraber CNTF ekspresyonu denek grubunda ilk 4 hafta içerisinde düşmektedir ($p<0,05$). 4-8 haftalar arası dalgalanma gösterip, 8-12. haftalar arasında belirgin şekilde artmakta ve başlangıç düzeyinin iki katını geçmektedir (8-10.hafta $p<0,001$), 12.haftada kuprizonun beslenmeden çekilmesi ile

başlangıçtaki düzeyinin yarısına ve yaklaşık olarak 4.haftadaki düzeyine gerilemektedir. Multiple Skleroz'da zaman içerisinde kronik demyelinasyona girilmesinde ve remyelinasyon sürecinin başarısız olmasında oligodendrosit hücrelerinin ölmesinin yanında, oligodendrosit progenitör hücrelerin farklılaşmasında ortaya çıkan problemlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. CNTF, giriş kısmında da belirtildiği üzere oligodendrosit sağkalımı ve olgunlaşması için önemli bir faktördür, 8-12.hafta arasında ekspresyonu artmasına rağmen, remyelinasyon sekteye uğramaktadır. Dolayısı ile, remyelinasyonun oligodendrosit olgunlaşmasından önceki bir aşamada yani OPC lerin demyelinize bölgeye göç etmesi aşamasında bozulduğu düşünülebilir. Başka faktörlerin de oligodendrosit sağkalımı ve olgunlaşması üzerinde etkili olduğu unutulmamalıdır.

C57BL/6 denek farelerden alınan beyin örneklerinde, NRG, CNTF ve CXCR4 için gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelendiğinde, 6 hafta üzerinde %0,2 kuprizon karıştırılmış yem ile beslenme sonucu ortaya çıkan akut demyelinasyondan kronik demyelinasyona geçiş süreci ile sadece CXCR4 geninin ekspresyon düzeyindeki değişim paralellik göstermektedir, ilk 4 hafta içerisinde düşüş görülürken ($p<0,05$), 6 hafta sonunda CXCR4 ekspresyonu maksimum düzeye ulaşmıştır ($p<0,05$). 6 haftadan sonra düşmeye başlamış ve 12.haftada ekspresyon düzeyi minimum düzeye inmiş (6-10 hafta $p<0,005$), kuprizonun beslenmeden çekildiği 12. haftadan sonraki 4 hafta içinde yaklaşık olarak başlangıçtaki düzeyine geri dönmüştür ($p<0,001$). CXCR4 ün oligodendrosit progenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göçü ve olgunlaşması üzerinde etkili bir faktör olduğu düşünüldüğünde, 12 hafta sonunda CXCR4 ekspresyonunun neredeyse bitmesi, oligodendrosit progenitör hücrelerin demyelinasyona uğrayan bölgeye göçünde ve myelin oluşturacak olan olgun oligodendrositlere olgunlaşmasında problem oluşturabilir. Bu sebeple, CXCR4 ekspresyonundaki düşüşün, kronik demyelinasyona sebep olan önemli bir etken olduğu kabul edilmelidir. CXCR4 ekspresyonundaki düşüş remyelinasyonu daha başlangıçta, OPClerin hasarlı bölgeye göçü sırasında sekteye uğratabilir. 8-12. hafta arasında CNTF ekspresyonu artmasına rağmen, kronik demyelinasyonun ortaya çıkması da bu öneriyi desteklemektedir. Patel ve diğ (2010), Kuprizon modelinde CXCR4 kemokin reseptörünün ligandı olan CXCL12'nin corpus callosumdaki ekspresyonunun, kuprizon uygulamasının 6.haftasından 12.haftasına kadar belirli oranda düştüğünü göstermişlerdir, fakat bu düşüş CXCR4 ekspresyonunda

gerçekleşenden çok daha hafiftir, bunun yanında astrositler tarafından gerçekleştirilen CXCL12 ekspresyonu düşmekte ve astrosit sayısı da azalmaktadır, astrositler cuprizone uygulamasından zarar görmektedir. CXCL12 ekspresyonundaki düşüş, Patel ve diğ. (2010) tartışma kısmında önerildiğinin aksine CXCR4 ekspresyonundaki düşüşü açıklayabilecek seviyede değildir.

Cuprizone modelinde OPClerin korunduğu düşünüldüğünde, CC de CXCR4 ekspresyonu ve CXCR4+ OPC sayısı niçin azalmaktadır? Daha önce yapılan çalışmalar, kültür ortamındaki hasarlı astrositlerin, interferon gamma (IFN- γ), interlökin 1 alfa (IL 1 α), interlökin 6 (IL-6), Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α) salgıladıklarını göstermiştir [73]. IFN- γ nın hücre yüzeyindeki CXCR4 reseptör sayısını ve CXCR4 ekspresyonunu azalttığı [74]. düşünüldüğünde bu durum açıklanabilir. Patel ve diğ göre, 6-12. hafta arasında astrosit hücreleri zarar görmektedir, dolayısı ile astrositlerin IFN- γ salgılaması beklenebilir, bunun yanında demyelinizasyon ürünlerini fagosite edecek olan makrofaj hücrelerini çağırmak için hasarlı bölgede IFN- γ salgılanmaktadır, IFN- γ CXCR4 ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir, CXCR4 ekspresyonundaki azalma bu şekilde açıklanabilir [75]. Cuprizone beslenmeden çekildikten sonra 12-16. haftalar arasında ekspresyon başlangıç düzeylerine dönse de, maksimum düzeye ulaştığı 6.haftadan çok daha düşük düzeydedir.

MS deki süreç için ayrıca, ubiquitin-CXCR4 etkileşimine dayalı mekanizma önerilebilir. Ubiquitin bir immün düzenleyici ve CXCR4 ün ubiquitin için tercih edilen bir ligand olması önemlidir, normalde ubiquitin bağlandığı molekülü yıkıma götüren bir süreç başlatmaktadır ve inflamasyonun baskılanmasında etkili olmaktadır. Multiple sklerozda, merkezi sinir sisteminde inflamasyon oluştuğunda, ubiquitin lökositleri inflamasyon bölgesine çeken CXCR4 e bağlanarak yıkıma gitmesini sağlayabilir, bununla otoinflamasyonun baskılanmaya çalışıldığı düşünülebilir. MSS immün baskılanmış bir ortam sayılabileceği için CXCR4 MSS de nöronal kök hücrelerin göçü gibi farklı görevler edinmiştir, CXCR4 MSS de aynı zamanda myelini oluşturacak oligodendrosit hücrelerin olgunlaşması ve oph lerin göçü içinde gereklidir. CXCR4'ün ubiquitin-proteasome aracılı yıkıma gönderilmesi, oph göçünü daha ilk adımda durduruyor olabilir. Ubiquitin aracılı sürecin kanıtlanması için, ubiquitin MSS'de CXCR4 reseptörüne bağlandığının kanıtlanması gereklidir. Bu amaçla EAE fare modeli kullanılabilir,denek farelerin

beyinlerinden elde edilen protein, BN-PAGE (blue native polyacrilamid gel electrophoresis) yöntemi ile analiz edilerek, CXCR4-ubiquitin etkileşimi kanıtlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Url-1** <http://www.elp.manchester.ac.uk/pub_projects/2002/MNQJ9PP2/ Web-pages/ bloodbrainbarrier.htm>, alındığı tarih: 23.11.2011
- [2] **Hiremath M. M. ve diğ.** (1998). Microglia/Makrophage Accumulation during Cuprizone Induced Demyelination in C57BL/6j Mice , *Journal of Neuroimmunology*, Vol.92, Issue 2, Sf. 38-49
- [3] **Url-2** <http://serendip.brynmawr.edu/bb/neuro/neuro98/202s98-paper1/> Boyce.html, alındığı tarih: 04.12.2011
- [4] **Nagelkerken L.** (1998). Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelinating disease, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol.31, No.1, Sf. 55-60
- [5] **Kornek B, Lassmann H.** (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note, *Brain Pathol*, vol. 9, Sf. 651–656
- [6] **Kuhlman T., Viron M.** (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis, *Brain*, 131, Sf.1749-1758
- [7] **Goldschmidt T., Antel J. ve diğ.** (2009). Remyelination capacity of the MS Brain decrease with disease chronicity, *Neurology*, 72(22), Sf.1914-1921
- [8] **Kuhlmann T., Goldschmidt T., Antel J. ve diğ.** (2009). Gender differences in the histopathology of MS?, *Journal of Neurology Science*, 286 (1-2), Sf. 86-91
- [9] **Silver J. Miller J.** (2004). Regeneration beyond glial scar, *Nature Reviews:Neuroscience*, vol.5, Sf.147-156
- [10] **Rolls A, Shechter R, London A, Segev Y, Jacob-Hirsch J, et al.** (2008). Two Faces of Chondroitin Sulfate Proteoglycan in Spinal Cord Repair: A Role in Microglia/Macrophage Activation, *PLoS Med*, 5(8), e171.
- [11] **Url-3** <<http://library.med.utah.edu/kw/ms/etiology.html>>, alındığı tarih: 23.11.2011
- [12] **Cudrici C. ve diğ.** (2006). Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement, *JRRD*, vol. 43, No.1, Sf. 123-132
- [13] **Trapp B. D., Ransohoff R. M. ve diğ.** (1999). Neurodegeneration in Multiple Sclerosis, *The Neuroscientist*, Vol.1, No.5, Sf. 48-57
- [14] **Roncaroli F.** (2005). Neuropathology of Multiple Sclerosis, *ACNR*, Vol.5, No.2, Sf. 16-22
- [15] **Rosati G.** (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update, *Neurol Sci*, 22, Sf. 117-139

- [16] **Sheikh A., Stratchan** (2004). The hygiene theory: fact or fiction?, *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, Vol. 12, Issue. 3, Sf. 232-236
- [17] **Biedermann T., Röcken M.** (1999). Th1/Th2 Balance in Atopy , *Springer Semin Immunopathology*, Vol. 21, Sf. 295-316
- [18] **Hayes C. E.** (2000). Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis, *Proceedings of The Nutrition Society*, 59, Sf. 531-535
- [19] **Deseilligny S. P.** (2009). Cilinical implications of possible role of Vitamin D in Multiple Sclerosis, *Journal of Neurology*, 256(9), Sf. 1468-1479
- [20] **Url-4** <http://www.channing.harvard.edu/MS_and_EBV.htm> alındığı tarih: 17.12.2011
- [21] **Ascherio A. ve diğ.** (2001). Epstein Barr Virus antibodies and risk of Multiple Sclerosis, *The Journal of American Medical Association*, 286(24), Sf. 3083-3088
- [22] **Delorenze G. N. ve diğ.** (2006). Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis, *Archives of Neurology*, Vo.63, No.6, Sf. 839-844
- [23] **Compston A., Coles A.** (2008). Multiple sclerosis, *Lancet* , 372, Sf. 1502-1517
- [24] **Hoppenbrouwers I. A., Hintzen R. Q.** (2011). Genetics of multiple sclerosis, *Biochemica et Biophysica Acta*, Vol 1812, Issue 2, Sf. 194-201
- [25] **DeJong** (2002). Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region, *Neurology*, 59(4), Sf. 549-555
- [26] **Kantarci O. H., Goris A., Hebring D. D.** (2005). *IFNG* polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis, *Genes Immunology*, 6(2), Sf.153-161
- [27] **The Internation Multiple Sclerosis Genetics Consortium** (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis by a Genomewide Study, *The New England Journal of Medicine*, 357, Sf. 851-862
- [28] **Anderson M. Alvarez J.** (1994). Cerebrospinal Fluid in Diagnosis of Multiple Sclerosis: A concensus report, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Physchiatry*, 57, Sf. 897-902
- [29] **Url-5** <<http://www.mult-sclerosis.org/mssymptoms.html>>, alındığı tarih: 22.11.2011
- [30] **Roland M.** (2010). Molecular Basis of Multiple Sclerosis 1st Edition. *Springer*, sf.31
- [31] **Ge Y.** (2006). Multiple Sclerosis: The role of MRI Imaging, *American Journal of Neuroradiology*, 27, Sf. 1165-1176
- [32] **Demir G. A.** (2010). Multiple Skleroz Tedavisi, *Klinik Gelişim*, Cilt. 23, No.1, Sf.65-69
- [33] **Jacobs L. D., Cookfair D. L.** (1996). Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis, *Annals of Neurology*, 39(3), Sf. 285-294

- [34] **Stone L. A., Frank J. A.** (1995). The effect of interferon- β on blood—brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing—remitting multiple sclerosis, *Annals of Neurology*, Vol.37, Issue 5, Sf. 611-619
- [35] **Murdoch D, Lyseng-Williamson K. A.** (2005). Spotlight on subcutaneous recombinant interferon-beta-1a (Rebif) in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Biodrugs*, Vol.19, Number 5, Sf. 323-325
- [36] **Url-6** <http://www.dartmouth.edu/~dons/part_3/chapter_23.html>, alındığı tarih: 28.11.2011
- [37] **Url-7** <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000684.htm>>, alındığı tarih: 28.11.2011
- [38] **Url-8** <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/cidp/cidp.htm>>, alındığı tarih: 28.11.2011
- [39] **Url-9** <<http://chklovskii.cshl.edu/quanhomepage.html>>, alındığı tarih: 12.12.2011
- [40] **Susuki ve diğ.** (2010). Myelin: A Specialized Membrane for Cell Communication, *Nature Education*, 3(9), Sf. 59
- [41] **Polito A., Reynolds R.** (2005). NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system, *Journal of Anatomy*, Vol 207, Issue 6, Sf.707-716
- [42] **Bhatheja K., Jeffrey F.** (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration, *Cells in Focus*, Vol. 38, Issue. 12, Sf. 1995-1999
- [43] **Url-10** <<http://cogweb.ucla.edu/CogSci/Myelinate.html>>, alındığı tarih: 15.11.2011
- [44] **Url-11** <http://www.nature.com/nrc/journal/v6/n6/fig_tab/nrc1889_F1.html>, alındığı tarih: 16.11.2011
- [45] **Simons M., Trajkovic K.** (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis, *Journal of Cell Science*, 119, Sf. 4381-4389
- [46] **Lyons D. A.** (2005). *erbb3* and *erbb2* Are Essential for Schwann Cell Migration and Myelination in Zebrafish, *Current Biology*, Vol. 15, Sf. 513–524
- [47] **Galin V. Michailov, Michael W. Sereda, Bastian G. Brinkmann, Tobias M. Fischer, Bernhard Haug, Carmen Birchmeier, Lorna Role, Cary Lai, Markus H. Schwab, Klaus-Armin N.** (2004). Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness, *Science*, Vol. 304, no. 5671, Sf. 700-703
- [48] **Park SK, Solomon D, Vartanian T.** (2001). Growth factor control of CNS myelination, *Dev Neurosci.*;23(4-5), Sf. 327-37.
- [49] **Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C.** (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy, *Trends Mol. Med.*, 7: Sf. 115–121

- [50] **Brinkmann, B. G. ve diğ.** (2008). Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system, *Neuron*, 59, Sf. 581–595
- [51] **Lam A., Fuller F. ve diğ.** (1991). Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor, *Gene*, 102(2), Sf. 271-6
- [52] **Barres B. A. ve diğ.** (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival, *Development*, 118, Sf. 283-295
- [53] **Bruno Stankoff ve diğ.** (2002). Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Enhances Myelin Formation: A Novel Role for CNTF and CNTF-Related Molecules, *The Journal of Neuroscience*, 22(21), Sf. 9221-9227
- [54] **Palin J. R., McCandles E. E.** (2009). CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination, *PNAS*, Vol. 107, No.24, Sf. 11062-11067
- [55] **Majetschak M., Krehmeier U.** (2002). Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness, *Blood*, Vol. 101, no.5, Sf.1882-1890
- [56] **Wang J. Maldonado A.** (2006). The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases, *Cell Molecular Immunology*, 3(4), Sf. 255-261
- [57] **Saini V., Marchese A.** (2010). CXC Chemokine Receptor 4 Is a Cell Surface Receptor for Extracellular Ubiquitin, *The Journal of Biological Chemistry*, 285, Sf. 15566-15576
- [58] **Wang J., Maldonado M. A.** (2006). The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases, *Cell Molecular Immunology*, 3(4), Sf. 255-261
- [59] **Patel J. R., Erin E. M., Dorsey D.** (2010). CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination, *PNAS*, Vol 106, No. 24, Sf. 11062-1067
- [60] **Baker D., Jackson S.** (2007). Models of Multiple Sclerosis, *ACNR*, Vol.6, N.6, Sf. 10-12
- [61] **Url-12** <<http://www.mult-sclerosis.org/experimentalautoimmuneencephalomyelitis.html>>, alınığı tarih:16.11.2011
- [62] **Rodriguez M.** (2007). Advances in Multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases. *Springer*, Sf.197
- [63] **Birgbauer E.** (2004). Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system, *Journal of Neuroscience Research*, Vol.2, Issue.8, Sf. 157-166
- [64] **Carlton WW.** (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 8, Sf. 512–521
- [65] **Kipp M., Clarner T., Dang J.** (2009). The Cuprizone Animal Model: New Insight into an Old Story, *Acta Neuropathology*, 118(6), Sf. 723-736

- [66] Skripuletz T. ve diğ. (2008). Cortical Demyelination Is Prominent in the Murine Cuprizone Model and Is Strain-Dependent, *American Journal of Pathology*, 172(54), Sf. 1053-1061
- [67] Bakker D. A., Ludwin S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination: Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases, *Journal of Neurological Sciences*, Vol 78 Issue 2, Sf. 125-137
- [68] Mana P., Fordham S. A. (2008). Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation, *Journal of Neuroimmunology*, Vol 210 Issue 1, Sf. 13-21
- [69] Prohaska J. R. (1993). Persistent Regional Changes in Brain Copper, Cuproenzymes and Catecholamines Following Perinatal Copper Deficiency in Mice, *The Journal of Nutrition*, 7 Sf. 1226-34
- [70] Url-13 <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/menkes/menkes.htm>>, alındığı tarih: 18.11.2011
- [71] Tümer Z., Moller L.B. (2010). Menkes Disease, *European Journal of Human Genetics*, 18, Sf. 511-18
- [72] Arredondo M. (2005). Iron and copper metabolism, *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 26 Issue 4-5, Sf.313-327
- [73] Lau L. T. (2001). Astrocytes Produce and Release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma Following Traumatic and Metabolic Injury, *Journal of Neurotrauma*, 18(3), Sf. 351-359
- [74] Miyamasu H., Nagase M. (2002). Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils, *Journal of Leukocyte Biology*, 71, Sf. 711-717
- [75] Mana P., Dilares D. (2006). Deleterious Role of IFN γ in a Toxic Model of Central Nervous System Demyelination, *American Journal of Pathology*, vol.168(5), Sf. 1464-1473

EKLER

EK A: qRT-PCR için Lightcycler 480 cihazında kullanılan program 3 aşama içermektedir. Preinkübasyon, amplifikasyon ve soğutma.

EK A**Çizelge A.1 : Pre-inkübasyon (Pre-inkübasyon).**

| | |
|--------------------------|------|
| Analysis Mode | None |
| Cycles | 1 |
| Segment | - |
| Ramp Rate (°C/s) | 4,4 |
| Target Temp. (°C) | 95 |
| Time(min) | 10 |
| Acquisition Mode | None |

Çizelge A.2 : Amplifikasyon (Amplification).

| Analysis Mode | Quantification | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Cycles | 45 | | |
| Segment | Denaturation | Annealing | Extension |
| Ramp Rate (°C/s) | 4,4 | 2,2 | 4,4 |
| Target Temp. (°C) | 95 | 60 | 72 |
| Time(min) | 10 | 25 | 10 |
| Acquisition Mode | None | None | Single |

Çizelge A.3 : Soğutma (Cooling).

| | |
|--------------------------|------|
| Analysis Mode | None |
| Cycles | 1 |
| Segment | |
| Ramp Rate (°C/s) | 2,2 |
| Target Temp. (°C) | 40 |
| Time(min) | 30s |
| Acquisition Mode | None |

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad:Gökhan Terzioğlu

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi Gemi ve Deniz Teknolojisi Mühendisliđi Bölümü (2008)

Yüksek Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Bölümü (2009-2010 Güz - 2011-2012 Güz)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/ SUNUMLAR

Terzioğlu G., Avşar T., Çakan G., Çelikyapı G., Bozkurt S. U., Demirel G. Y., Siva A., Altuğ T., Turanlı E., Kronik Kuprizone Fare Modelinde CXCR4 Kemokin Reseptör Geninin Ekspresyonunun Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR İle Tayini, 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi