



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPL SKLEROZ PATOGENEZİNİN FARKLI
BASAMAKLARINDA HLA-DQB1 VE HLA-DRB1 GEN
TRANSKRİPTLERİNİ HEDEFLEYEN MİKRO-RNA'LARIN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

Danışman
Prof. Dr. Nurten KARA

II. Danışman
Prof. Dr. Murat TERZİ

SAMSUN
2021

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**MULTİPL SKLEROZ PATOGENEZİNİN FARKLI
BASAMAKLARINDA HLA-DQB1 VE HLA-DRB1 GEN
TRANSKRİPTLERİNİ HEDEFLEYEN MİKRO-RNA'LARIN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

Danışman
Prof. Dr. Nurten KARA

II. Danışman
Prof. Dr. Murat TERZİ

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI tarafından **Prof. Dr. Nurten KARA** Danışmanlığında hazırlanan “**Multipl Skleroz Patogenezinin Farklı Basamaklarında HLA-DQB1 Ve HLA-DRB1 Gen Transkriptlerini Hedefleyen Mikro-RNA'ların Araştırılması**” konusundaki çalışma jürimiz tarafında 02.07.2021 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Nurten KARA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Şengül TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Serbülent YİĞİT Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Akın TEKCAN Amasya Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü		☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

.../.../2021

Prof. Dr. Ali BOLAT

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

10/06 /2021

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Multipl Skleroz Patogenezinin Farklı Basamaklarında HLA-DQB1 Ve HLA-DRB1 Gen Transkriptlerini Hedefleyen Mikro-RNA'ların Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 10.06.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : %1 çıkmıştır

10/06/2021

Prof. Dr. Nurten KARA

ÖZET

MULTİPL SKLEROZ PATOGENEZİNİN FARKLI BASAMAKLARINDA HLA-DQB1 VE HLA-DRB1 GEN TRANSKRİPTLERİNİ HEDEFLEYEN MİKRO-RNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Temmuz/ 2021

Danışman: Prof. Dr. Nurten KARA

Amaç: Multipl Skleroz (MS) hastalığı; inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyon ile karakterize, genç erişkinleri etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alellerinin MS gelişiminde rol oynadıkları bilinmektedir ve yapılan bazı çalışmalar, mikro-RNA'lara bağlı gelişen epigenetik modifikasyonların MS riski oluşturabileceğini göstermiştir. Amacımız, HLA-DQB1 ve HLA-DRB1 genlerinin MS ve bu genleri hedefleyen hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyonlarının hastalığın seyri ile olan ilişkisini incelemektir.

Materyal ve Metod: Toplamda 40 MS hastası ve 10 kontrol grubunun tam kandan izole edilen DNA ve RNA örneklerinden Real-Time PCR yöntemi ile HLA-DQB1*06:02 ve HLA-DRB1*15:01 alelleri ve hedef miRNA'ların ekspresyonu incelendi.

Bulgular: HLA-DQB1*06:02 ve HLA-DRB1*15:01 alelleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Analiz edilen miRNA'lardan hsa-miR-335-5p'nin MS'de upregülasyonu saptandı ($p<0.001$).

Sonuç: Elde edilen bilgiler doğrultusunda MS ile ilgili hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p üzerinde yapılan ilk epigenetik çalışmadır. MS'de miR-335-5p upregülasyonunun biyobelirteç potansiyeli taşıya bilecek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Multipl Skleroz, HLA-DQB1, HLA-DRB1, miRNA, Gen ekspresyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MICRO-RNAS TARGETING HLA-DQB1 AND HLA-DRB1 GENE TRANSCRIPTS IN DIFFERENT STAGES OF MULTIPLE SCLEROSIS PATHOGENESIS

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

PhD, July/ 2021

Supervisor: Prof. Dr. Nurten KARA

Aim: Multiple Sclerosis (MS) disease; is an autoimmune disease that affects young adults, characterized by inflammation, demyelination and axonal degeneration. In recent studies, it is known that HLA-DRB1 and HLA-DQB1 variants play a role in the development of MS, and some studies have suggested that epigenetic modifications due to micro-RNAs may pose a risk for MS. Our aim is to examine the relationship of HLA-DQB1 and HLA-DRB1 genes with MS and the relationship between hsa-miR-204-5p and hsa-miR-335-5p expressions targeting these genes and the course of the disease.

Materials and Methods: DNA and RNA isolated from whole blood of 40 MS patients and 10 control groups; HLA-DQB1*06:02 and HLA-DRB1*15:01 alleles and expression of target miRNAs were examined by Real-Time PCR method.

Results: There was no significant difference between the patient and control groups in terms of HLA-DQB1*06:02 and HLA-DRB1*15:01 alleles. We found that hsa-miR-335-5p to be upregulated in MS ($p < 0.001$).

Conclusion: According to the studies we have done, this is the first epigenetic study to the association of MS with hsa-miR-204-5p and hsa-miR-335-5p. This suggests that miR-335-5p upregulated in MS to be significant that could have the potential as a biomarker.

Keywords: Multiple Sclerosis, HLA-DQB1, HLA-DRB1, miRNA, Gene expression

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgilerini, yardımlarını, desteklerini, ilgi ve anlayışlarını hiç eksik etmeyen, birlikte çalışmaktan onur, gurur ve mutluluk duyduğum tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Nurten KARA ve Sayın Prof. Dr. Murat TERZİ'ye öncelikle teşekkür ederim.

Doktora eğitimime katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN, Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ, Doç. Dr. Şengül TURAL ve Araştırma Görevlisi Dr. Zülfinaz Betül ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi, birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, önderliği ile doktora eğitimimin başlamasını sağlayan, bilim yolunda ışığı ve katkıları ile üzerimde çok emeği olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı eski Başkanı Prof. Dr. Methiye Gönül Uğur'a yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan değerli amcam Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cevat NİSBET'e ve kıymetli eşi Veterinerlik Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özlem NİSBET'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda, çalışma grubunun oluşturulmasında yardım ve desteklerini özveriyle sağlayan Dilek YAĞMUR, Murat ŞENER ve Adife VESKE'ye, laboratuvar çalışmalarım sürecinde desteğini, anlayış ve ilgisini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM) Öğr. Gör. Dr. Eda UĞURTAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu süreçte hiç yalnız bırakmayan, hayatımın her alanında desteklerini ve fedakarlıklarını hissettiğim sevgili dostlarım Nihal KAPUCU, Uzm. Dr. Elif SÜRMELİ ve Uzm. Dr. Merve KARA ARSLAN'a ve her kararında yanımda olan, bana maddi manevi destek sağlayan ve eğitim sürecimde en büyük pay sahibi olan canım aileme yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.TIP.1901.19.004 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Multiple Skleroz.....	3
2.1.1. Multipl sklerozun tarihçesi	3
2.1.2. Patofizyoloji.....	5
2.1.3. Epidemiyoloji	5
2.1.4. Etiyoloji	6
2.1.5. MS Klinik Seyir Tipleri.....	10
2.1.6. MS Tedavisi.....	13
2.2. HLA Genleri	13
2.3. MS ve MikroRNA'lar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Demografik Veriler ve Kan Örneklerinin Toplanması.....	22
3.2. Çalışmada Kullanılan Ölçekler ve Yöntemler	22
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	23
3.2.2. Real TimePCR İle HLA Alellerinin Analizi.....	25
3.2.3. Kandan RNA İzolasyonu.....	26
3.2.5. Kantitatif PCR (qRT-PCR) İle miRNA Ekspresyon Analizi.....	30
3.3. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1.Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri	34
4.2. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 Alelleri.....	35
4.3. hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p Ekspresyon Düzeyleri	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	64
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALS	:Amyotrofik Lateral skleroz
APC	:Antijen Sunan Hücreler
CD 4⁺	:Cluster of Differentiation 4
CD 8⁺	:Cluster of Differentiation 8
cDNA	:Komplementer DNA
ceRNA	:Sitoplazmik Endojen RNA
CT	: Cycle Threshold
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DZ	:Dizigotik
EAE	:Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit
EBV	:Epstein Barr Virüsü
EDSS	:Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği
EDTA	:Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
6-FAM	:6-Karboksifloresin
HIPSC	:İnsan Kaynaklı Pluripotent Kök Hücreler
HLA	:İnsan Lökosit Antijenleri
HS	:Hipokampal Skleroz
IFN- γ	:İnterferon-Gama
IL	:İnterlökin
kb	:Kilobaz
KİS	:Klinik İzole Sendrom
lncRNA	:Uzun Kodlamayan RNA
mRNA	:Mesajcı RNA
mirDIP	:MicroRNA Data Integration Portal
miRNA	:Mikro RNA
MHC	:Major Doku Uyumu Kompleksi
MOG	:Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein
MRG	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	:Multiple Skleroz
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
MTLE	:Mezial Temporal Lob Epilepsi
MZ	:Monozigotik
OR	:Odds Ratio
PCR	:Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu

PPMS	:Primer Progresif Multiple Skleroz
qRT-PCR	:Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	:RNA Induced Silencing Complex
RNA	:Ribonükleik asit
RNase	:Ribonükleaz
RPM	:Rotations Per Minute
RRMS	:Relapsing Remiting Multiple Skleroz
SGN	:Spiral Ganglion Nöronların
SMA	:Spinal Muscular Atrophy
SNHL	:Sensörinöral İşitme Kaybı
SPMS	:Sekonder Progresif Multiple Skleroz
TAMRA	:6- karboksitetrametil-rodamin
TMPRSS3	:Transmembran Proteaz Serin 3
TNF α	:Tümör Nekroz Faktör-Alfa
3'UTR	:Translasyona Uğramayan 3' Bölgesi
VKİ	:Vücut Kitle İndeksi
WT	:Wild Tip
μg	:Mikrogram
μL	:Mikrolitre

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sisteminin inflamasyon ve demiyelinizasyonu ile karakterize kronik otoimmün bir hastalık olan ve nörodejeneratif semptomlar ile seyreden multiple sklerozun (MS), fizyopatolojik mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Hastalığın heterojen özellikte olması; klinik görünüm ve seyri, tedaviye cevap ve patolojik yönden hastalar arasında büyük farklılıklara yol açmaktadır. Bu farklılıklar, MS'in tek bir hastalık olmayıp, multifaktöriyel olarak görülme eğiliminin oluşmasına neden olmaktadır (Terzi, vd., 2007). Bilim dünyasının genel kanısı MS'in, kompleks geçişli hastalıkların neredeyse tamamında olduğu gibi çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak multifaktöryel kalıtımla ortaya çıkan, merkezi sinir sisteminin (MSS) inflamatuvar ve dejeneratif seyirli bir hastalığı olduğu şeklindedir. Monozigotik (MZ) ve dizigotik (DZ) ikizler ile ikiz olmayan kardeşler üzerinde yürütülen çalışmalar, MS genetiği ile ilgili önemli sonuçlar ortaya koymuştur (Sadovnick and Baird, 1988; Willer, vd., 2003).

MS genetiği ile ilgili olarak elde edilen verilerden, hastalığın patogeneğinde bazı genlerin önemli derecede rol oynadığı sonucu çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu insan lökosit antijeninin (HLA), MS için risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. İnsan lökosit antijenlerini (HLA) kodlayan genlerdeki varyasyonlar son yıllarda tanınır olsa da, bu genlerle ilgili incelenen polimorfizmler ve geniş bağlantı dengesizliği yoğun olan bölgeler, hastalıkla bu alellerin ilişkisini tanımlamayı zorlaştırmaktadır (Sawcer, vd., 2014).

HLA genleri, kromozom 6p21 üzerinde lokalize olup, major doku uyumu kompleksindeki (MHC) farklı antijenlerin yapısal ve fonksiyonel özeliğini kodlar. Bu antijenler; HLA-I, HLA-II, HLA-III şeklinde 3 gruba ayrılırlar (Čierny, vd., 2018). HLA Sınıf II'de; HLA-DR, -DQ, -DP antijenleri yer alır. HLA-DRB1, DQB1 HLA sınıf II'nin alt sınıflarıdır. HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 genlerindeki varyasyonların MS için risk taşıdığı bildirilmekle birlikte, bu genlerin sinirlere ve sinirleri çevreleyen miyelin kılıfına karşı oluşan otoimmün tepkiler ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüş olsa da, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alellerinin MS gelişimine etkisi tartışmalıdır (Čierny, vd., 2018).

Bununla birlikte, tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) değişik varyantlarının belirlenmesi, SNP verilerinden klasik HLA genotiplerini etkileyebilen istatistiksel yöntemlerin geliştirilmesi sonucunda, bu konuda çok sayıda çalışmalar

yapılarak önemli ilerlemelerin kaydedilmesine imkan vermiştir (Sawcer, vd., 2014). Ayrıca HLA genlerinin intronlarındaki değişimlerin hastalıklarla tam ilişkisi bilinmese de kodlanmayan RNA'larla ilişkili olduğu ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenleyicilerinden biri olan, mikro-RNA'ların (miRNA) merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmalarla birlikte, MS hastalığının patogeneğinde miRNA'ların fonksiyonları üzerine odaklanılmaya başlanmış ve HLA genlerinin ekspresyonundaki değişime neden olan epigenetik faktörlerden birinin Mikro-RNA'lar (miRNA) olduğu öne sürülmektedir (Clark, vd., 2018).

HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alelleri ile ilişkili 18 tane miRNA saptanmıştır (<https://www.genecards.org>, <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink>, <https://rnacentral.org>). Bu çalışmadaki amacımız, HLA-DQB1 ve HLA-DRB1 genlerinin MS ile olan ilişkisi ve bu genleri hedefleyen hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyonlarının hastalığın seyri ile olan ilişkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Skleroz

Multiple skleroz (MS); inflamasyon, demyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize, merkezi sinir sisteminin çoğunlukla beyaz cevherini çoklu bölgelerde tutan, genç erişkinlerde görülen, genetik ve çevresel etmenlerin rol aldığı, multifaktöriyel kalıtmı otoimmün kronik bir hastalıktır (Compston and Coles, 2002).

Yaşamı tehdit eden ölümcül bir hastalık olarak kabul edilmemesine rağmen, potansiyel olarak yıkıcı, uzun süreli komplikasyonlara sahip kronik bir nörolojik bozukluk olan MS, tamamen tedavi edilemez, çoğu tedavi yaklaşımı semptomatiktir ve zamanla yaşam kalitesinin düşmesine sebep olur. MS başlangıcının, yirmili otuzlu yaşlar gibi erken yaşlarda ortaya çıkabileceği düşünüldüğünde, hastalar uzun yıllar yaşam tarzlarından taviz vermek zorunda kalmaktadırlar (Zagon and McLaughlin, 2017). MS, hastaların çoğunda kronik progresif hareket güçlüğüne sebep olmaktadır. Çoğu hasta 15 yıl içinde çalışma hayatını terk eder ve depresyon, intihar ve boşanma oranları sağlıklı popülasyona göre önemli ölçüde artar. Hastaların yarısı, tanı konulmasının ardından gelen 20 yıl içerisinde yalnız hareket edememektedir ve yine hastaların %50'sinde hastalığın ilerlemesiyle önemli bilişsel eksiklikler gelişmektedir (Xue, vd., 2013).

MS, genellikle 20 ila 40 yaşları arasında başlar ve kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir. MS verilerine göre, dünya çapında 2 ila 5 milyon insanda MS görüldüğü ve Multipl Skleroz Uluslararası Federasyonu verilerine göre Avrupa'da hastalığın sadece doğrudan tedavi maliyetlerinin yılda 15 milyar Avronun üzerinde olduğu bildirilmiştir. Kanıtlar, diğer birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi, MS insidansının da artmakta olduğunu göstermektedir. MS etiyolojisi multifaktöriyel olmakla birlikte, son birkaç yılda hastalığın gelişimini etkileyen genetik varyantların tanımlanması katlanarak artmıştır (Sawcer, vd., 2014).

2.1.1. Multipl sklerozun tarihçesi

Hastalığın tanımlanmasına dair ilk yaklaşımlar, İngiliz patoloji profesörü Robert Carswell (1793-1857) ve bir Fransız patoloji-anatomi profesörü olan Jean

Cruveilhier'e (1791-1873) aittir. Carswell ve Cruveilhier hastalığın klinik ayrıntılarının çoğunu tarif etmişler, fakat farklı bir hastalık olarak tanımlamamışlardır. Özellikle Carswell, hastalığı "atrofi eşliğinde spinal kordun dikkat çekici lezyonu" olarak tanımlamıştır. İsviçreli patolog George Eduard Rindfleisch (1836-1908) 1863 yılında mikroskop kullanarak, inflamatuvar lezyonların kan damarlarının etrafına yayıldığını gözlemlemiştir.

Fransız nörolog Jean-Martin Charcot (1825-1893), 1868'de multiple sklerozu ayrı bir hastalık olarak tanımlayan ilk kişidir. Charcot önceki raporların yardımıyla ve hastalarda gözlemlediği klinik ve patolojik bulgulara dayanarak hastalığa "sclerose en plaques" adını vermiştir. Hastalığın tanısında bir dizi kriterlerin oluşturulmasına dair ilk girişimler yine Charcot tarafından yapılmış olup, hastalığın üçlü belirtileri; olağan dışı göz hareketleri (nistagmus), titreme (intention tremor) ve konuşma bozukluğu (telegraphic speech) günümüzde 'Charcot triadı' olarak bilinmektedir. Charcot ayrıca hastalarda, "belirgin hafıza azalması" ve "kavramada yavaşlama" olarak tanımladığı bilişsel değişiklikleri gözlemlemiştir (Compston, 1988).

Edinburgh Üniversitesi'nde çalışan patolog Dr. James Dawson, MS patolojisinde bir devrime yol açarak plakların mikroskopisini tarif etmiş, mikroskopik myelin hasarı ve beyinde oluşan kan damarı inflamasyonunu göstermiştir (Dawson, 1916). Amerikalı bilim adamı Dr. Thomas Rivers, MS'in viral bir hastalık olmadığını ve hayvanlara sağlıklı myelin enjekte ettikten sonra otoimmün bir yanıt oluşturarak MS semptomlarının oluşturulabileceğini göstermiştir. Hastalığın hayvanlardaki bu formuna deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) adı verilmiştir (Rivers, 1933).

Uluslararası Multipl Skleroz Derneği tarafından ilk kez 1965'te tanı kriterleri belirlenmiştir. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ise, ilk kez 1981 yılında bir MS hastası üzerinde yapılmıştır (Miller, vd., 2003). Hastalığın nedeni, patogenezi ve hastalığa yönelik etkili tedaviler hakkında teoriler 1990'lı yıllara gelindiğinde keşfedilmiştir ve MS belirti ve bulgularının iyileştirilmesi için olmasa da kontrolü için ilk tedaviler geliştirilmiştir. Özellikle 1990'lı yılların ikinci yarısında kullanılmaya başlanan immünmodülatör ilaçlar MS tedavisi için çok önemli gelişmelerden biridir (Compston, vd., 2008)

2.1.2. Patofizyoloji

MS'in karakteristik patolojik özelliği, demiyelinizan plaklara yol açan perivenüler inflamatuvar lezyonlardır (Karussis, 2014). Oligodendrosit hasarı ve demiyelinizasyon iltihaplanma sonucu ortaya çıkar. Aksonlar nispeten hastalığın erken evrelerinde korunur; ancak hastalık ilerledikçe geri dönüşü olmayan aksonal hasar gelişir (Trapp, vd., 1998). Enflamatuvar sızıntılar, MHC sınıf I sınırlı CD8+ T hücrelerinin baskın olduğu T lenfositleri içerir; B hücreleri ve plazma hücreleri de çok daha düşük sayılarda olmasına rağmen mevcuttur (Lassmann, 2013). RRMS 8 Relapsing Remiting Multiple Skleroz)'de derin lenfositik iltihaplanma ile "klasik aktif lezyon" hakimdir. Lezyonların, aktif mikroglia ve makrofajların dar bir kenarı ile çevrili inaktif bir lezyon çekirdeğine sahip olma eğiliminde olduğu ilerleyici hastalıkta daha az sıklıkla görülür (Prineas, vd., 2001). RRMS ve progresif MS arasındaki klinik farklılığa rağmen, patolojik olarak tanımlanmış enflamatuvar değişiklikler, her ikisinde de daha büyük ölçüde relapsing-remitting hastalıkta görülür. Relapsing-remitting ve progresif MS'deki inflamatuvar infiltratın bileşimi, progresif MS'de B hücreleri ve plazma hücrelerinin oranı daha yüksek olmasına rağmen benzerdir (Frischer, vd., 2009). T hücrelerinin ve B hücrelerinin sitokin profilinin veya aktivasyon aşamasının klinik hastalık türleri arasında farklılık gösterip göstermediği belirsizliğini korumaktadır (Lassmann, 2013).

Remiyelinizasyon, en yaygın olarak progresif hastalıkta olmak üzere tüm hastalık evrelerinde görülür. Sekonder progresif MS hastalarında daha yüksek demiyelinizasyon seviyeleri ve PPMS (Primer Progresif Multiple Skleroz)'de servikal omurilikte normal görünen beyaz maddede aksonal yoğunlukta azalma vardır. MS alt tipleri arasında tek bir karakteristik histolojik fark yoktur, bunun yerine belirli özellikleri gösteren alanların oranında bir farklılık vardır. Bu nedenle, MS'in üç klinik formu tanımlanırken, patolojik değişiklikler bir süreklilik oluşturur. Bu, yıllar içinde RRMS'den sekonder progresif MS'ye kadar olan hastalarda aşamalı klinik hastalık evrimi ile uyumludur (Lassmann, 2013).

2.1.3. Epidemiyoloji

MS, dünyadaki genç erişkin nüfusu arasında en yaygın görülen nörolojik hastalıklardan biridir (Compston, vd., 2008). MS başlangıcı, genellikle 20 ile 40

yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. Kadınlar erkeklerden iki ila üç kat daha sık etkilenir ve bu fark dünyanın bazı bölgelerinde artmaktadır (Amato, vd., 2018).

MS global medyan prevalansı, ülkeler arasında önemli farklılıklar görülmekle birlikte 100.000 kişide 35,9'dur (Walton, vd., 2020). Küresel Hastalık Yüğü Çalışması 2016 için sistematik bir analize göre; yaşa göre standardize edilmiş MS prevalansı en yüksek Kuzey Amerika'da (164,6/100.000), ardından Batı Avrupa (127,0/100.000) ve Avustralya'da (91,1/100.000) olup; en düşük prevelansa sahip ülkeler ise Doğu ve Orta Sahra altı Afrika ülkeleri (sırasıyla 3,3/100.000 ve 2,8/100.000) ve Okyanusya (2,0/100.000) olarak belirtilmiştir (Wallin, vd., 2019). Asya'nın farklı bölgelerinde (Hong Kong'da 0,77/100.000, İran'da 85,80/100.000) önemli bölgesel farklılıklar olmasına rağmen, genel olarak Asya ülkelerinin ortalama prevelansı Avrupa'ya göre daha düşüktür (2,2/100.000) (Eskandarieh, vd., 2016). Son çalışmalar, kuzey Japonya (18,6/100.000) dahil olmak üzere bir dizi bölgede artan bir prevalans olduğunu göstermiştir (Houzen, vd., 2018). Prevalans sadece gelişmekte olan ülkelerde değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerde de giderek artmakta ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (Piehl, 2018). İsveç'te MS prevalansı 1930'lardan 2011'e kadar 21,2/100.000'den 188,9/100.000'e yükselmiştir (Ahlgren, vd., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, dünya çapında 2 milyondan fazla kişinin MS'den etkilendiği belirtilmiştir (Browne, vd., 2014).

Ülkemizde yapılan araştırmalarda ise; kuzey doğusunda MS prevelansı 68,97/100.000, kadın erkek oranı 4/1, hastaların yaş ortalaması ise 35,1±10,2 olarak hesaplanmıştır (Alp, vd., 2012). Yapılan bir diğer çalışmada ülkemizin Orta Karadeniz Bölgesi'nde MS prevalansı 43,2/100.000 olarak saptanmıştır (Akdemir, vd., 2017).

2.1.4. Etiyoloji

Otoimmünite: Normal bireylerde az sayıda bulunan otoreaktif T ve B hücreleri, antijenlerine karşı toleranslarını kaybettiklerinde, hedef hücrelerde immün reaktivite işlemi başlar ve kendine ait antijenler yabancı antijen gibi algılanır. Bunun sonucunda otoimmünite gelişir. Miyelin proteininin %30'unu oluşturan MBP (Miyelin Bağlanma proteini), otoreaktif T hücreleri için primer hedef antijen adaylardan birisidir. MS hastalarının aktif döneminde immün hücrelerinde görülen

değişiklikler normal bireyler ile kıyaslandığında, MS'nin immün sistem fonksiyonundaki bozukluk sonucu ortaya çıkan bir hastalık olduğu desteklenmektedir (Bradley, 2004). MS için nedensel mekanizma olarak otoimmünite görülse de; hastalığın genetik, çevresel ve epigenetik faktörlerle multifaktöriyel kalıtmı olduğu düşünülmektedir (Conlon, vd., 1999; Hafler, vd., 2005).

Enfeksiyon: MS'in immün aracılı patogeneze bağlı olarak, enfeksiyöz ajanlar, hastalığın başlangıcı için olası tetikleyiciler olarak öne sürülmüştür. Araştırılan farklı patojenlerden EBV (Epstein Barr Virüsü) enfeksiyonu, MS ile en tutarlı ve en güçlü şekilde ilişkili olanıdır (Han, vd., 2002; Jaishankar, vd., 2014). Yapılan çalışmalarda, MS hastalarının neredeyse tamamının EBV için seropozitif olduğu bulunmuştur (Sharma, vd., 2014). EBV enfeksiyonları asemptomatik olarak daha yaygın görülürken, semptomatik olarak gözlemlenen enfeksiyöz mononükleoz öyküsü olan hastalarda MS gelişme riski normalden 2-3 kat daha fazla bulunmuştur (Correale and Gaitan, 2015). EBV enfeksiyonunun MS riskini artırdığı mekanizma net değildir, MSS'de direkt olarak inflamasyon oluşturduğu veya moleküler benzerlikten ötürü çapraz reaktif T hücreleri ve antikorların oluşumuna yol açtığı öne sürülmüştür (Han, vd., 2002; Jaishankar, vd., 2014). EBV enfeksiyonu ile artmış MS riskini destekleyen verilere rağmen, doğrudan bir nedensel ilişki kurmak güçtür.

Sigara: Sigara içmenin MS için bir risk faktörü (Odds Ratio (OR) ~ 1,6) olduğu gösterilmiştir (Han, vd., 2002). Sigaraya pasif maruziyetin de, MS riskinin artmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Sigara ve MS riski arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır; daha yüksek miktarda sigara ve kümülatif sigara içimi, artan risk ile ilişkilidir. Dahası, sigara içmek aynı zamanda hastalığın daha hızlı ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu ilişkiyi açıklamak için bazı duman bileşenlerinin akciğere doğrudan toksik etkisi ve dolaylı bir sistemik etkisi (peribronşiyal lenfatik dokunun aracılık ettiği) öne sürülmüştür (Han, vd., 2002).

İklim koşulları ve D vitamini: Güneşe maruz kalma, özellikle ultraviyole-B radyasyonuna maruz kalma, D vitamini seviyelerinin ana belirleyicisidir ve coğrafik olarak artan enlemlerle azalma eğilimindedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ekvatordan uzaklaştıkça MS insidansının arttığı saptanmıştır. Bu nedenle, D vitamini düzeylerinin MS prevalansındaki "enlem etkisi"nin temelini oluşturduğu öne

sürülmüştür. Yapılan birkaç çalışma, düşük D vitamini seviyeleri ile artmış MS riski ve artmış hastalık aktivitesi (klinik relapslar ve MR aktivitesi açısından) arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir, bu da hastalık seyri boyunca normal D vitamini seviyelerinin koruyucu etkisini düşündürmektedir. D vitamininin etki mekanizmaları tam olarak net olmasa da, bazı veriler D vitamininin aktif formunun (1,25-dihidroksikolekalsiferol) bağışıklık fonksiyonunun modülasyonunda bir rolü olduğunu göstermektedir (Han, vd., 2002; Alissa and Ferns, 2011).

Diyet ve Obezite: Yapılan birçok çalışmada özellikle ergenlik döneminde obezitenin MS gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmış ve yüksek vücut kitle indeksi (VKİ) MS için bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (Munger, vd., 2009; Munger, vd., 2013).

Malosse ve ark, tarafından yapılan çalışmada, süt tüketimi ile MS prevalansı arasında korelasyon saptanmıştır (Malosse, vd., 1992). Yağ ile MS prevalansı arasında da ilişki bulunmakla beraber, bu oran süte göre daha düşüktür. Bir süt ürünü olan peynir tüketimi ile MS gelişimi arasında bir ilişki bulunmamıştır (Malosse, vd., 1992). Bitkisel yağ ve balık yağlarının koruyucu özelliklerinin olup olmadığı hakkında çelişkili görüşler olmakla birlikte; özellikle balık yağında bol olarak bulunan Omega-6 yağ asitinin relapsların şiddetini azalttığı ve diyetle Omega-3 yağ asitinin katılmasının bu olumlu etkiyi daha da artırdığı belirtilmiştir (Lauer, 1997). Sütün içerisinde yer alan butirofilin isimli proteinin, MOG ile çapraz reaksiyona girerek MS’de rol oynadığı düşünülmektedir (Guggenmos, vd., 2004).

MS Genetiği: MS’de genetik faktörlerin rol oynayabileceği ihtimali, ilk kez 19. yüzyılın ikinci yarısında ailevi olguların fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Tüm kompleks geçişli hastalıklarda olduğu gibi genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi MS’e yatkınlığı belirlemektedir (Compston, vd., 1998).

Aile içinde nüks riski, genetik paylaşım yüzdesi ile artmaktadır. Örneğin, monozigotik ikizlerde risk %35 iken, dizigotik ikizlerde % 6 ve kardeşlerde ise %3 oranındadır (Compston and Coles, 2002). Son yıllarda yayınlanan bir meta-analizde, ailesel MS prevalansı tüm MS fenotipleri için ~%13 olarak bildirilmiştir (Harirchian, vd., 2017).

MS'in kalıtsallığı poligeniktir ve her biri hastalık riskinde küçük bir artışla ilişkili olan birkaç gende polimorfizmler içerir. Bunlar arasında, HLA sınıf I ve HLA sınıf II genlerindeki polimorfizmler, MS için en yüksek riski taşımaktadır (Compston and Coles, 2002; Olsson, vd., 2017).

Genom çaplı ilişki çalışmalarda, MS için 200'den fazla genetik risk varyantı tanımlanmıştır; her varyantın hastalık riski üzerinde küçük bir etkisi vardır ve bu varyantların farklı kombinasyonları muhtemelen farklı hastalarda genetik yatkınlığa katkıda bulunmaktadır (Baranzini, vd., 2017). Bu varyantların çoğu, bağışıklık sistemine dahil olan genleri kodlamaktadır. Örneğin HLA-DRB1*15:01 polimorfizmleri ve IL2 ve IL7R'deki polimorfizmler dahil olmak üzere kromozom 6'daki HLA genleri ve diğer sistemik immün bozuklukların yüksek riskiyle ilişkilidir. T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonunda yer alan genlerdeki polimorfizmler (IL2 ve IL7R gibi), adaptif ve doğal bağışıklığın diğer bileşenlerindeki (tümör nekroz faktörünü (TNF) modüle eden genler gibi) polimorfizmlerle birlikte, hastalığın önemli özelliklerindendir (De Jager, vd., 2009; Cotsapas, vd., 2018). MS'in risk genleri diğer nörodejeneratif hastalıklar ile örtüşmezken; sinir sisteminde net işlevlere sahip yalnızca birkaç gendeki mutasyonlar, MS riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (örneğin, *MANBA* ve *GALC*). Daha önce belirtildiği gibi, bazı polimorfizmler, özellikle HLA genlerindeki, çevresel risk faktörleri ile etkileşime girebilmektedirler. Örneğin, MS riskini artıran ve koruyucu HLAA*02 alelini taşımayan HLA-DRB1*15:01 aleli; sigara içenlerde (OR 13,5) (Hedstrom, vd., 2011), EBV enfeksiyonu olan bireylerde (OR 16,0) (Sundqvist, vd., 2012) ve adolesan obezitesi olanlarda (OR 16,2) önemli ölçüde daha yüksek MS riski taşımaktadır (Hedstrom, vd., 2014). Ayrıca, D vitamini metabolizmasına dahil olan genlerdeki polimorfizmler (*GC* ve *CYP24A1* gibi), MS riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Mokry, vd., 2015 ; Olsson, vd., 2017).

Çevresel risk faktörlerinin, bağışıklık sistemi ve MSS'deki erken hastalık mekanizmalarına katkıda bulunmak için MS yatkınlık genleri ile nasıl etkileşime girdiğini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

MS ve Epigenetik: Epigenetik düzenleme, DNA sekansında değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunun modifikasyonu olarak tanımlanan biyolojik bir fenomendir ve şu anda MS'in genetik ve çevresel riskleri arasındaki etkileşimlerin

temelini oluşturduğu öne sürülmektedir. Epigenetiğin moleküler mekanizmaları arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve mikroRNA'lar bulunur. Köken etkisi ve kadın hastalardaki boylamsal artış gibi MS epidemiyolojik çalışmalarından elde edilen gözlemsel veriler, moleküler temel belirsizliğini korusa da, MS gelişiminde epigenetik mekanizmaların rol oynadığını düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, Epstein-Barr virüsü, sigara ve D vitamini gibi MS gelişimi ile ilgili çevresel faktörlerin, bazı deneysel ortamlarda epigenetik mekanizmalar yoluyla gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bir çalışma, MS için uyumsuz üç monozygotik ikiz çift arasında periferik kan CD4⁺ T hücrelerinde DNA metilasyon profilleri arasında tekrarlanabilir bir fark olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, birkaç çalışma, genlerin düzensiz DNA metilasyonunun, MS beyin örneklerinde anormal immün reaksiyonlar ve miyelin proteinlerinin transkripsiyon sonrası modifikasyonları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, MS hastalarından elde edilen beyin dokularında ve periferik kan immün hücrelerinde anormal mikroRNA profilleri bildirilmiştir (Miyazaki and Niino, 2015).

2.1.5. MS Klinik Seyir Tipleri

Lublin ve arkadaşları tarafından 1996 yılında relapsing-remitting, primer progresif, sekonder progresif, progresif relapsing olmak üzere dört başlık altında tanımlanan MS klinik alt tipleri; 2013 yılında güncellenerek klinik izole sendrom (KİS), relapsing (ataklı) MS ve progresif (ilerleyici, kötüleşen) MS olarak üç başlık altında tanımlanmıştır. Bu temel seyirler içerisinde hastalık aktivitesinin (atak oluşması, MR'da lezyon aktivitesi) ya da hastalık ilerlemesi/ özürüllüğün giderek artması, hastalığın alt seyirlerini belirlemede önem kazanmıştır. Güncel sınıflamada Progresif relapsing terimi artık kullanılmayıp, bu hastalar progresif-aktif hastalar grubuna dahil edilmiştir. Klinik izole sendrom (KİS) terminolojisi kullanılmış ve MS alt tipleri arasına alınmıştır. Radyolojik izole sendrom ise, hastalar klinik belirti ve bulgulara sahip olmadığından bir MS fenotipi olarak sayılmamıştır (Efendi, 2018).

Klinik İzole Sendrom (KİS)

Klinik izole sendrom (KİS); izole optik nöropati, medulla spinalis tutulumu, beyin sapı sendromu ve daha nadir olarak hemisferik tutulum şeklinde klinik bulgularla ortaya çıkan, MR'da MS'i düşündüren semptomatik veya asemptomatik

(sessiz) multifokal beyaz cevher lezyonların gözleendiği, merkezi sinir sisteminde inflamasyon ve demiyelinizasyon ile karakterize ilk nörolojik tablodur (Miller D, vd., 2005).

Cinsiyet dağılımı MS'e benzer şekilde kadın erkek oranı 2.5/1 olarak hesaplanmıştır (McAlpine and Compston, 2005). Sıklıkla genç erişkin yaşlarda (20-45 yaş arası), ataklar akut veya subakut dönemde tipik olarak 2-3 hafta içinde semptomları pik yapar şeklindedir. Bu tanıyı alan hastanın takiplerinde MS gelişirse bu duruma "ilk klinik olay" adı verilir (Jacobi, vd., 2008).

MS'li hastaların % 85'i optik sinirleri, beyin sapını veya omuriliği ilgilendiren KİS olarak başlamaktadır. KİS'li hastaların ise % 30-70'inde MS ortaya çıkmaktadır (Miller D, vd., 2005). MS'te erken tedavinin faydaları göz önüne alındığında, MS'e dönüşüm riskini belirlemek oldukça önemlidir (Kappos, Polman, vd., 2006). KİS'ten MS'e dönüşüm için genetik, çevresel ve immunolojik etmenler, MR, BOS, klinik tablo olmak üzere birçok risk faktörü ifade edilmiş olmasına rağmen, pratikte MR ve BOS incelemesi ile değerlendirilmektedir (Miller DH, vd., 2012). MR'da sessiz beyin lezyonları görüldüğünde, MS gelişme riski daha yüksektir. İnfratentorial bölgede; özellikle beyin sapında lezyon görülmesinin, MS dönüşümü açısından daha riskli olduğu belirtilmiştir (Tintore, vd., 2010). Optik nörit veya duysal belirtilerle ortaya çıkan bir KİS sonrasında, MR'da lezyon görülmemişse veya az sayıda ise, ikinci atağa kadar geçen süre uzunsu ve beş yıl içinde herhangi bir özörlölük ortaya çıkmamışsa, MS'e bağı özörlölük gelişme olasılığı düşüktür (Miller D, vd., 2005).

Yapılan bazı çalışmalarda, oligoklonal bant dışında intratekal B hücre yanıtı gösteren kızamık, kızamıkçık ve varisella zoster gibi nörotropik virüslere karşı oluşan IgG antikorları ve MS'te B hücresi anahtar düzenleyicilerinden biri olan *CXCL13*'ün artmış BOS konsantrasyonlarının, MS dönüşümünde anlamlı olabileceği bildirilmiştir (Brettschneider, vd., 2009; Brettschneider, vd., 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda; genetik ve immunolojik faktörler, erken çocukluk veya ergenlik çağında geçirilmiş enfeksiyonlar, sigara, güneş maruziyeti ve D vitamini düzeyi gibi diğere çevresel faktörlerin de, KİS hastalarının MS'e dönüşüm riski ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2010). Tüm bunlara rağmen KİS'te prognozu belirlemede kullanılabilecek, kesinlik kazanmış, genetik veya çevresel belirteç bulunmamaktadır. KİS tablosu ile başvuran hastaların

yakın izlenmesi ve düzenli olarak klinik ve laboratuvar yöntemleri ile değerlendirilmesi gerekmektedir (Miller, vd., 2005).

Relapsing-Relmitting MS (RRMS)

RRMS, MS'in en yaygın şekli olup; vakaların yaklaşık yüzde 85'i bu şekilde başlamaktadır. Çoğunlukla erken yaşlarda görülür. RRMS, akut ataklar (relapslar) ve ardından tam veya kısmi remisyonlar ile karakterizedir. RRMS ataklarının tedavisinde, immünomodülatör ilaçlar (IMT) ve immün modifiye edici tedaviler veya steroidler gibi akut antiinflamatuvar ajanlar kullanılabilir (Skleroz, 2016; Kappos, Traboulsee, vd., 2006; Goodin, 2014). Hastalık ardışık ataklar arasında devam eder ve nüksü tahmin edilemez. Ayrıca, bazı relapslardan sonra tam remisyon sağlanamayabilir. RRMS, genellikle hastalık süresi uzadıkça MS'in sekonder progresif formuna dönüşmektedir (Lublin and Reingold, 1996).

Primer Progresif MS (PPMS)

Tüm MS hastalarının %10-15'i bu gruptadır ve daha geç başlangıçlı olma eğilimindedir. Hastalığın başlangıcından itibaren ilerleme olması ve giderek kötüleşen nörolojik fonksiyonlar ile karakterizedir (Nielsen, vd., 2017). Arada zaman zaman platolar veya hafif geçici düzelmeler görülebilmektedir. Tipik olarak ileri yaş miyelopatili erkek popülasyonda görülür (Garg and Smith, 2015). Hastalığın ilerlemesi oldukça değişkendir; bazı hastalarda kısa bir süre için önemli bir sakatlığa sebep olurken, bazılarında bu süreç on yıldan fazladır. PPMS hastalarında en belirgin ve yaygın ilerleme omurilik fonksiyon bozukluğudur (Birnbau, 2009).

Sekonder Progresif MS (SPMS)

Sekonder progresif MS, başlangıçta relapsing-relmitting MS olan hastaların yaklaşık % 65'inde görülür ve nihayetinde belirli bir remisyon dönemi olmaksızın akut ataklar arasında progresif nörolojik düşüş yaşanır (Compston and Coles, 2008; Lublin and Reingold, 1996). Arada ataklar, hafif iyileşme veya duraklamalar olabilir (Lublin and Reingold, 1996). Hastalığın başlangıcı ile, relapsing-relmitting'den sekonder progresif MS'ye dönüşüm arasındaki ortalama süre 19 yıldır (Rovaris, vd., 2006). Akson kayıpları, sekonder progresif multipl sklerozda görülen en önemli bozukluktur (AINA, 2002).

2.1.6. MS Tedavisi

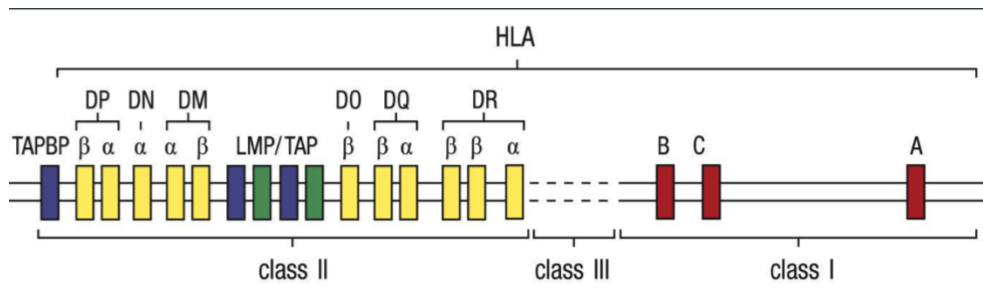
MS tedavisi çeşitli ilaçları içerir ve ilaçların çoğu immünosupresyona dayalıdır, ancak immünosupresyon yaklaşımının kanser gelişimi ve enfeksiyon riski vardır (Inglese and Petracca, 2015). MS tedavisinde bir başka seçenek de bağışıklık sistemi fonksiyonunu düzenlemek için interferonlar, glatiramer asetat, çeşitli hedeflere karşı monoklonal antikorlar ve sfingozin-1-fosfat reseptör modülatörleri gibi “hastalık modifiye edici ajanların” kullanılmasıdır (Dargahi, vd., 2017). Ayrıca MS'in evresine ve hastanın ilaca bireysel yanıtı ve adaptasyonuna bağlı olarak hastaya verilecek ilaca karar verilmesi önemli bir konudur (Gajofatto and Benedetti, 2015; Tillery, vd., 2017).

2.2. HLA Genleri

HLA genleri, kromozom 6p21 üzerinde lokalize olup, major doku uyumu kompleksindeki (MHC) farklı antijenlerin yapısal ve fonksiyonel özeliğini kodlamaktadırlar. Bu antijenler; HLA-I, HLA-II, HLA-III şeklinde 3 gruba ayrılmaktadırlar (Čierny, vd., 2018).

MHC molekülleri, bağışıklık hücreleri lökositler ile, diğer lökositler veya vücut hücreleri arasındaki etkileşimlere arabuluculuk ederler (Khan, vd., 2008). MHC I ve II moleküllerinin fizyolojik rolleri; peptitlerin T hücrelerine tanıtılması, bağışıklık sisteminin tüm proteinlere karşı tepkisinin kontrolü ve organ naklinin red edilmesidir.

MHC sınıf II'ye karşılık gelen HLA'lar, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ ve HLA-DR'dir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. MHC gen yapısı (Karakükcü, 2016).

Bu moleküller, profesyonel immün antijen sunan hücrelerde (APC) yapısal olarak eksprese edilir, ancak diğer hücrelerde interferon γ tarafından da indüklene

bilmektedirler. Timustaki epitel hücrelerinde ve periferdeki APC'lerde eksprese edilirler. MHC sınıf II ekspresyonu, APC'lerde MHC sınıf II transaktivatör olan CIITA tarafından yakından düzenlenir. CIITA yalnızca profesyonel APC'lerde ifade edilir, ancak profesyonel olmayan APC'ler de CIITA aktivitesini ve MHC II ifadesini düzenleyebilmektedirler. Bahsedildiği gibi interferon- γ (IFN- γ), CIITA'nın ekspresyonunu tetikler ve ayrıca MHC sınıf II negatif hücreler olan monositleri, yüzeylerinde MHC sınıf II eksprese eden fonksiyonel APC'lere dönüştürmekten sorumludur.

HLA-DRB1, DQB1 HLA sınıf II'nin alt sınıflarıdır. HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 genlerindeki varyasyonların MS için risk taşıdığı bildirilmiştir. HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 genlerinin sinirlere ve sinirleri çevreleyen miyelin kılıfına karşı oluşan otoimmün tepkiler ile ilişkili olabileceği ileri sürülse de, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alellerinin MS gelişimine etkisi tartışmalıdır (Čierny, vd., 2018).

MHC genlerinin çok fazla polimorfizme sahip olması, patojenik organizmalar tarafından empoze edilen dengeleyici seçimden ve MHC varyantları ile enfeksiyona duyarlılık arasında geniş çapta bildirilen ilişkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir ve patojenlerin MHC evrimini yönlendirmedeki rolü ile tutarlıdır (Bodmer, 1972; Spurgin and Richardson, 2010).

MHC araştırmalarının çoğu, amino asit dizisi varyasyonlarına odaklanmıştır. Bununla birlikte, MHC çeşitliliğinin daha az dikkat çeken bir yönü, bireyler tarafından taşınan MHC varyantlarının sayısıdır. Bireyler tarafından taşınan bu varyant sayısı tipik olarak popülasyonda bulunan sayıdan çok daha düşüktür. Örneğin insanlarda, tamamen heterozigot bir bireyde 12-14 farklı varyanta izin veren 6–7 klasik MHC lokusu vardır, ancak insan popülasyonunda bu lokuslar arasında toplanan halihazırda tanımlanmış MHC alellerinin sayısı 17.000'i aşmaktadır (Goüy de Bellocq, vd., 2008). Bir popülasyonda ayrılan çoğu alelin patojenlerden seçilerek muhafaza edildiği düşünüldüğünde, bu tür bir tutarsızlık, herhangi bir bireyin MHC çeşitliliğinin, bir konakçının karşılaşılabileceği tüm patojen spektrumuna etkili bir şekilde yanıt vermek için yeterli olmayacağını düşündürmektedir (Spurgin and Richardson, 2010). Bu, çok yüksek MHC çeşitliliğini ifade etmenin bazı içsel nedenleri olduğu anlamına gelir. Bireysel MHC çeşitliliğini geliştiren olası bir mekanizma, timustaki negatif seleksiyon sırasında kendiliğinden tepkimeye giren T

hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır. Son zamanlarda, Migalska ve ark, tarafından MHC sınıf I varyantlarının ekspresyonu ile bankadaki T hücre reseptör repertuarı arasında negatif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Migalska, vd., 2019). Bununla birlikte, artan otoimmünite riski veya antijen sunan hücreler düzeyinde kritik MHC-peptit ligand konsantrasyonlarına ulaşma ihtiyacı gibi alternatif mekanizmalar da rol oynayabilmektedir (Borghans, vd., 2003).

"Multipl skleroz" ve "HLA" üzerine literatür taraması yapıldığında, iki binden fazla çalışma ortaya çıkmaktadır. MS ile HLA ilişkisi ilk olarak 1970'li yıllarda tanımlanmıştır ve MS'in özünde antijene özgü bir otoimmün hastalık olduğu fikriyle tutarlıdır (Bertrams, vd., 1972; Maito, vd., 1972). HLA lokusunun MS riski ile ilişkisi, incelenen tüm popülasyonlarda ve ayrıca primer progresif ve relapsing-remitting hastalarda gözlenmiştir.

HLA-DRB1

HLA-DRB1, HLA sınıf II beta zinciri paraloglarına aittir. Sınıf II molekülü, her ikisi de zara sabitlenmiş bir alfa (DRA) ve bir beta zincirinden (DRB) oluşan bir heterodimerdir. Hücre dışı proteinlerden türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynar. Sınıf II moleküller, antijen sunan hücrelerde ifade edilir. Beta zinciri yaklaşık 26-28 kDa'dır ve altı ekson içerir. Ekson 1 lider peptidi kodlar, ekson 2 ve 3 iki hücre dışı alanı kodlar, ekson 4 transmembran alanını ve ekson 5 ise sitoplazmik kuyruğu kodlamaktadır. DR molekülü içinde beta zinciri, peptit bağlanma spesifikliklerini belirten tüm polimorfizmleri içerir. Yüzlerce DRB1 aleli tanımlanmıştır ve bazı alellerin belirli hastalıklar veya durumlarla ilişkili sıklıkları artmıştır. Örneğin, DRB1*13:02 aleli, demans üzerindeki koruyucu etkisi ile ilişkilendirilmiştir (James and Georgopoulos, 2019).

MHC sınıf II molekülünün antijen sunan bir beta zinciri ve alfa zinciri HLA-DRA ile kompleks halinde, HLA-DRB1-sınırlı CD4-pozitif T hücrelerinde alfa-beta T hücre reseptörü (TCR) tarafından tanınmak üzere, profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerinde antijenik peptitler açığa çıkarır. Bu, enfeksiyöz ajanları ve transforme hücreleri ortadan kaldırmak için, hem antikor aracılı immün yanıt hem de makrofaj aktivasyonu olmak üzere antijene özgü T-helper efektör işlevlerine rehberlik etmektedir (Muehling, vd., 2016; Galperin, vd., 2018). Tipik olarak,

lizozomlarda endositozlu antijenlerin proteolizinden kaynaklanan 10 ila 30 amino asitlik hücre dışı peptit antijenleri sunar (Stern, vd., 1994). Tümör mikroçevresinde, büyük olasılıkla apoptotik tümör hücrelerinin fagositozu veya salgılanan tümör proteinlerinin makropinositozu yoluyla tümörde yerleşik APC'lerde üretilen, antijenik peptitleri tanıtır (Abelin, vd., 2019). Özellikle timusta T hücresi seçimi ve merkezi bağışıklık toleransı ile ilgili bir mekanizma olan makrotofajiden sonra, otolizozomlarda tutulan hücre içi proteinlerden türetilen peptitleri sunar (Adamopoulou, vd., 2013). İmmünodominant epitopların seçimi iki işleme modunu takip eder; bunlardan biri patojen türevli antijenik peptitler için 'önce bağla, sonra kes/düzeltil' şeklinde iken, otoantijenler/self-peptitler için ise 'önce kes, sonra bağla' şeklindedir (Kim A, vd., 2014). Peptit N-terminalinin 1. pozisyonundaki ankor kalıntısı, genellikle büyük bir hidrofobik kalıntı, MHCII molekülleri ile yüksek afiniteli etkileşim için esastır (Stern, vd., 1994).

Allel DRB1*15:01: Th1 hücrelerine kapsid proteini VP2'den (SNNSATLIVPYVNAVPMDSM) türetilen ve viral temizliğe katkıda bulunan bir HRV-16 epitopunu sunabilir. MBP'den (ENPVVHFFKNIVTPR) türetilen bir öz peptidi görüntüler. Th1 hücrelerine tümörle ilişkili antijen WT1'den (KRYFKLSHLQMHSRKH) türetilen immünojenik bir epitop sunabilir, bu muhtemelen çok çeşitli katı ve hematolojik malignitelerde etkili antitümör bağışıklığı sağlar (Smith, vd., 1998; Fujiki, vd., 2008; Muehling, vd., 2016).

HLA-DQB1

HLA-DQB1, HLA sınıf II beta zinciri paraloglarına aittir. Bu sınıf II molekül, her ikisi de zara sabitlenmiş bir alfa (DQA) ve bir beta zincirinden (DQB) oluşan bir heterodimerdir. Hücre dışı proteinlerden türetilen peptitleri sunarak bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynar. Sınıf II molekülleri, antijen sunan hücrelerde (APC: B lenfositleri, dendritik hücreler, makrofajlar) ifade edilir. DQ molekülü içinde hem alfa zinciri hem de beta zinciri, dört farklı molekülle sonuçlanan peptit bağlanma özelliklerini belirleyen polimorfizmleri içerir. Bu polimorfizmlerin tiplendirilmesi rutin olarak kemik iliği nakli için yapılır. Alternatif splicing, birden çok transkript varyantı ile sonuçlanır. HLA-DQB1 ekspresyonu en çok akciğerde ve lenf düğümünde olsada, 19 dokuda daha ifade edilmektedir (NCBI, Gene ID: 3119, 2021).

Antijen sunan hücrelerin (APC) endositik yoluna ulaşan antijenlerden türetilen peptitleri bağlar ve bunları CD4 T hücreleri tarafından tanınmaları için hücre yüzeyinde sunar. Peptit bağlama yarığı, 10 ila 30 kalıntı peptitleri barındırmaktadır. MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan peptitler, çoğunlukla lizozomal proteazlar ve diğer hidrolazlar tarafından işlendikleri endositik yola erişen proteinlerin bozunmasıyla üretilmektedir. APC tarafından endositozlanmış olan ekzojen antijenler bu sayede MHC II molekülleri yoluyla sunum için hazırdır ve bu nedenle, bu antijen sunum yolu genellikle eksojen olarak adlandırılır. Normal dönüşümlerinin bir parçası olarak lizozomlarda bozunma yolunda olan zar proteinleri de endozomal/lizozomal bölümlerde yer aldığından, eksojen antijenler, endojen bileşenlerden türetilenlerle rekabet etmelidir. Otofaji ayrıca endojen peptitlerin bir kaynağıdır ve otofagozomlar yapısal olarak MHC sınıf II yükleme bölmeleriyle kaynaşmaktadır. APC'lere ek olarak, epitel hücreleri gibi gastrointestinal sistemin diğer hücreleri, MHC sınıf II moleküllerini ve CD74'ü eksprese eder ve gastrointestinal sistemin olağandışı bir özelliği olan APC'ler gibi davranır. Bir antijen sunan bir MHC sınıf II molekülü üretmek için, üç MHC sınıf II molekülü (bir alfa ve bir beta zincirinin heterodimerleri) bir heterononamer oluşturmak üzere ER'de bir CD74 trimer ile birleşmektedir. Bu kompleksin antijen işlemenin gerçekleştiği endozomal/ lizozomal sisteme girmesinden kısa bir süre sonra, CD74, CTSS ve CTSL dahil olmak üzere çeşitli proteazlar tarafından sıralı bir bozunmaya uğrar ve CLIP (sınıf II ile ilişkili değişmez zincir peptidi) olarak adlandırılan küçük bir parça bırakır. CLIP'in çıkarılması, CLIP'in serbest bırakılması için alfa-beta-CLIP kompleksine doğrudan bağlanma yoluyla HLA-DM tarafından kolaylaştırılmaktadır. HLA-DM, birincil yüksek afiniteli antijenik peptitler bağlanana kadar MHC sınıf II moleküllerini stabilize eder. Bir peptite bağlanan MHC II molekülü daha sonra hücre zarı yüzeyine taşınır. B hücrelerinde, HLA-DM ve MHC sınıf II molekülleri arasındaki etkileşim, HLA-DO tarafından düzenlenir. Birincil dendritik hücreler (DC'ler) ayrıca HLA-DO'yu ifade etmektedir. MHC II moleküllerine antijen yüklemesinin düzenlenmesinde, asitleştirmeyi ve proteolizi arttıran ve verimli peptid yüklenmesi sağlayan lizozomal mikro-ortam yer almıştır (UniProtKB-P01920, 2021).

2.3. MS ve MikroRNA'lar

Gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenleyicilerinden biri olan miRNA'lar; tipik olarak 18-23 nükleotitli, endojen madde ya da protein kodlamayan RNA'lardır. Hücre çoğalması, gelişimi ve farklılaşması, apoptoz, hücre metabolizması süreçleri ve birçok hastalığın patogeneğinde miRNA'ların önemli rol oynadığı anlaşılmıştır.

Gen ekspresyonundaki değişimde miRNA'ların fonksiyonu iki şekilde gerçekleşir. Birincisi; miRNA dizisi, hedef mRNA'nın 3'UTR'si ile tamamen eşleştiğinde, hedef mRNA'nın bozulmasını indükler. Diğer taraftan, miRNA ipliği hedef mRNA'nın 3'UTR'si ile tam olarak eşleşmediğinde translasyon önlenir. Mikro-RNA'ların gen ekspresyonunu etkilemesinin ikinci yolu ise, promoter bölgelerin DNA metilasyonunu ve aynı zamanda histon modifikasyonlarını modüle etmesidir (Bartel, 2004).

Eksozom ile ilişkili miRNA'lar, yakın zamanda hem otoimmün hem de nörolojik bozukluklarda yer alan yeni bir diagnostik biyobelirteç olmuştur (Farh, vd., 2015). Dolaşımdaki miRNA'ların; MS hastalarının serum, plazma ve beyin omurilik sıvısı dahil vücut sıvılarında düzensiz olduğunu gösteren yeni kanıtlar da ortaya çıkmıştır. Eksozomla ilişkili miRNA'ların, MS hastalığı için kolayca erişilebilir bir kan bazlı analiz sunabileceği varsayılmıştır. MS hastaları ile yapılan bir kohort çalışmasında, kantitatif PCR ile miRNA'ların ekspresyonu saptanmıştır (Manna, vd., 2018).

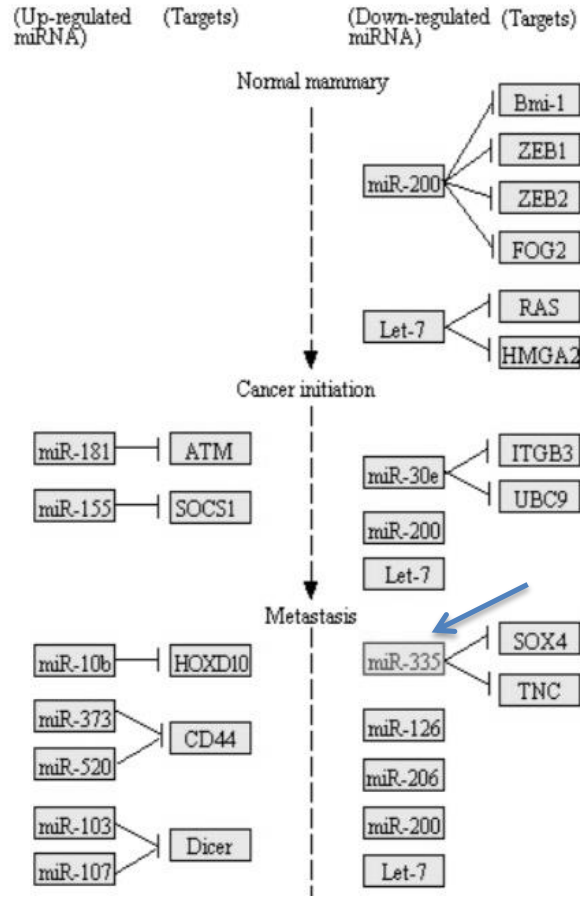
İnsanda ve deneysel hayvan modellerinde MS üzerine birçok miRNA araştırılması yapılmıştır. Fenoglio C ve ark.tarafından yapılan bir çalışmada; miR-21, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b, miR-155 ve miR-326, miR-15a, miR-19a, miR-22, miR-210 ve miR-223'ün upregülasyonu; miR-15b, miR-181c ve miR-328 gibi bazı miRNA'ların ise anlamlı downregülasyonu saptanmıştır (Fenoglio, vd., 2011). Yapılan bir başka çalışmada ise, mir155 ve mir-326'nın tanısal belirteçler olabilecek düzeyde anlamlı olduğu belirtilmiştir (Ma, vd., 2014).

İmmün sistem hücrelerinin fonksiyonlarını ve görevlerini düzenleyen miRNA'lar ile ilgili, MS hastalarında yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu yapılan çalışmalarda birçok miRNA araştırılmış; özellikle miR-155 ve miR-146a'nın bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca miRNA'ların, MS tanısı

alan olgularda prognostik değerlerinin olabileceği ve ileri dönemde tedavi hedefi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Sarıdaş, 2018).

hsa-miR-335: miR335 miRNA dizisi 22 nükleotid uzunluğundadır ve insanda bulunur. hsa-mir-335 geni, genomik konumu 7q32.2'dir (LncBase, MalaCards, TarBase, MirGeneDB, GeneCards, ENA, RefSeq, miRBase). hsa-mir-335 ile ilişkili hastalıklar arasında Meme Kanseri ve Uterine leiomyoma yer alır. Kanseri metastazının genel düzenleyicilerini araştıran Tavazoie ve ark. (2008), miR335'i, insan meme kanseri hücreleri metastatik potansiyel artıkça ekspresyonun özellikle kaybolduğu bir dizi mikroRNA'dan biri olarak tanımladı. Malign hücrelerde miR335 ekspresyonunu in vivo olarak insan kanser hücrelerinde akciğer ve kemik metastazını baskıladığı gösterilmiştir. mir-335 tarafından düzenlenen 6 metastaz geni tanımlanmış olup bunlar hücre iskeleti kontrolünde (*COL1A1*), sinyal iletiminde (*PTPRN2*, *MERTK* ve *PLCB1*) ve hücre göçünde (*TNC* ve *SOX4*) fonksiyon gösteren genlerdir. miR335'in progenitör hücre transkripsiyon faktörü *SOX4*' ve hücre dışı matris bileşeni Tenascin C'yi (*TNC*) hedefleyerek metastazı ve göçü baskıladığı bilinmektedir (şekil 2.2).

Breast cancer



Şekil 2.2. Kanseri yolağındaki miRNA'lar (KEGG PATHWAY Database, 2021)

hsa-miR-204: MIR204'ün 9q21.12 kromozomu üzerindeki *TRPM3* geninin (608961) intron 8'inde yer aldığını belirtmiştir (OMIM 610942, 2021).

Mikroarray ve Northern blot analizleri ile Sun ve ark. (2004), miR204'ün insan böbreğinde yüksek oranda eksprese edildiğini, kalp, dalak, akciğer, kas ve prostatta çok az veya hiç ekspresyonu olmadığını bildirmişler. Sun ve ark, (2004), böbrek gelişiminde rol oynayan bir gen olan *ETS1* için bir bağlanma bölgesi içeren miR204 geninin yukarısında yüksek oranda korunmuş ve transkripsiyonu olmayan bir bölge tanımlamışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma kapsamına 18 yaş üstü kadın ve erkek MS hastaları alınmıştır. Örneklem büyüklüğü power analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Power analizi sonucuna göre; %85 test gücü ve %95 güven aralığında hasta grupları ve hasta sayıları belirlenmiştir.

OMÜ KAEK 2018/258 karar no'lu araştırma projemizin, amacı, yaklaşımı ve yöntemi, izole edilen DNA'ların kullanılabilirliği OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 26.05.2018 tarihli etik kurulda incelenmiş ve etik açıdan uygunluğu oy birliği ile kabul edilmiştir.

Hasta ve Kontrol grubu:

- **Yineleyen-Düzelen MS (Relapsing-Remitting MS):** MS hastalarının yaklaşık %20'si bu gruptadır. Ataklar ve iyileşmelerle seyreder. Tekrarlayan ataklar sonrasında bazı sekeller kalabilir (n=28).

- **İkincil İlerleyen MS (Sekonder Progresif MS):** Başlangıcı Relapsing-Remitting MS olup, bu hastaların bir kısmı bu tipe dönüşür. Tekrarlayan ataklar sonrası düzelme zorlaşır hatta durabilir (n=8).

- **Birincil İlerleyen MS (Primer Progresif MS):** Ataklarla birlikte ya da atak olmaksızın seyreder. Giderek artan bir ilerleme söz konusudur (n=4).

- **Kontrol grubu (n=10)**

- 18 yaşını doldurmuş olması

- Tanı almış herhangi bir nörolojik/otoimmün hastalığının olmaması

Hasta ve kontrol grubu olmak üzere toplam 50 birey çalışılmıştır. Çalışmaya katılacak hastalar, OMÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniği'ne, Orta Karadeniz bölgesinin farklı illerinden başvuran MS tanılı hastalar arasından gönüllülük esasına göre seçilmiştir. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise; DNA ve RNA izolasyonu OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'da; gen ekspresyon analizleri (Real time PCR) ise Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM) laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Demografik Veriler ve Kan Örneklerinin Toplanması

Bu araştırmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve Mc-Donald kriterlerine göre (Thompson vd. 2017) MS tanısı almış gönüllü hastalar dahil edilmiştir. Hasta grubu 40, kontrol grubu ise 10 bireyden oluşmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarındaki tüm bireyler, özellikle Orta Karadeniz Bölgesi'nde yaşamakta olan kişiler arasından seçilmiştir. Kontrol grubu ile hasta grubu birbirine benzer demografik özellikleri olan bireylerden oluşturulmuştur.

MS tanısı; hasta hikayesi ve hastalığın klinik seyri ile birlikte nöroloji uzmanı tarafından Mc-Donald kriterlerine göre hastalığın doğrulanması sonucunda konulmuştur.

Çalışmaya alınma kriterleri:

- 18 yaşını doldurmuş olması
- Revize McDonald 2017 kriterlerine göre MS tanısı konulması
- Tanı almış başka nörolojik/otoimmün hastalığının olmaması

Araştırmaya alınan hasta ve kontrol gruplarındaki tüm bireyler, araştırmanın kapsamı, içeriği ve yöntemi hakkında hem sözlü hem de yazılı olarak tarafımızca bilgilendirilmişlerdir ve kendilerinden ya da yasal vasilerinden EK-A'da yer alan "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzaları alınmıştır. Her bir bireyden EDTA'lı tüplere 2'şer ml venöz kan alınıp, izolasyon işlemi yapılana kadar kan örnekleri -80C'de saklanmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Ölçekler ve Yöntemler

Kullanılan Cihazlar

- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Isı bloğu (VWR, ABD)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- Santrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- DNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- Isı döngü cihazı: Thermal Cyler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD)

- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- Kantitatif eş zamanlı PCR cihazı: Stratagene Mx3000P qPCR System (Agilent, ABD)

Kullanılan Kimyasallar

- %100'lük etanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Kloroform (MERCK, Almanya)
- İsoopropanol

Kullanılan Kitler

- DNA izolasyon kiti: Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ABD)
- miRNA izolasyon kiti: TaqMan® miRNA ABC Purification Kit (Applied Biosystems, ABD)
- cDNA sentez kiti: TaqMan™ Small RNA Assays Kit (Applied Biosystems, ABD)
- Revers transkripsiyon primerleri: TaqMan™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR Master Mix: TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR primer-problar: TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-204-5p ve TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-335-5p (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR için endojen kontrol primer-prob: TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B (Applied Biosystems, ABD)

3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden, Thermo Fisher (DNA İzolasyon Kiti 50 rxn Thermo Fisher K182001) kit kullanım yöntemine göre DNA'lar saflaştırıldı.

1. Steril ependorf tüp içerisine 200µl tam kan örneği konuldu.
2. Ependorf tüp içerisindeki kan örneği üzerine 20 µL Proteinaz K eklendi.
3. Örneğe 20 µL RNase A eklendi ve kısa vorteks yapılarak homojenize edildi.

Daha sonra oluşan homojen karışım oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. 200 µL PureLink® Genomik Lizis / Bağlama Tamponu eklendi ve homojen bir çözelti elde etmek iyice vortex yapıldı.

5. Protein sindirimini desteklemek için karışımı 55 °C olan ısı bloğunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. Lizata 200 µL % 96–100 etanol eklendi ve ardından homojen bir çözelti elde etmek için 5 saniye vortex yapıldı.

7. Tüp içerisindeki tüm karışım (~640 µL) steril 2ml’lik “PureLink® Spin column” kolonu içine aktarıldı.

8. Oda sıcaklığında 10.000×g’de 1 dakika santrifüj yapıldı.

9. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve spin kolon, temiz bir ‘Pure Link® Collection Tube’ toplama tüpüne yerleştirildi.

10. 500µl “Pure Link® Genomic Wash Buffer I” kolonun üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 10.000×g’de 1 dakika santrifüj yapıldı.

11. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve ardından 500µl ‘Wash Buffer II’ eklendi ve oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakikas antrifüj yapıldı.

12. Spin kolonunu 1,5 mL’lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve spin kolonuna 40 µl ‘Pure Link® Genomic Elution Buffer’ eklendi.

13. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon yapıldı ve sonra spin kolon, odasıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılarak elde edilen genomik

DNA, 1.5ml’lik bir mikro santrifüj tüpünde toplandı ve spin kolon atıldı.

Elde edilen DNA örneklerinin optik dansiteleri ve konsantrasyonları 260/280 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) ile ölçölüp bir sonraki çalışmaya kadar örnekler -20°C de saklandı.

3.2.2. Real TimePCR İle HLA Alellerinin Analizi

HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alelleri Real-Time PCR’da SYBR Green yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntemde SYBR green floresan boyasını içeren bir PCR mixi olan “SsoAdvanced™ Universal Inhibitor-Tolerant SYBR®Green Supermix” (ürün no: 172-5016, BioRad, USA) kullanıldı. İlgili bölgeler için primerler, IMGT / HLA veri tabanı kullanılarak tasarlanmış olup,NCBI/BLAST veri bankasında kontrol edilmiştir (<http://www.ebi.ac.uk/>; www.ncbi.nlm.nih.gov) ayrıca yapılan benzer çalışmalarla da kıyaslanmıştır (Hu, vd., 2014; Momany, vd., 2017). Kullanılan primer dizileri ve ampikon uzunlukları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan primer dizileri ve ampikon uzunlukları

Gen adı	Primer	PCR product	Annealing	Tm
HLA-DRB1*1501	F: 5’-TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3’ R: 5’-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT-3’	261 b	60	61.79 63.06
HLA-DQB1*0602	F: 5’-CGTGCGTCTTGTGACCAGAT-3’ R: 5’-GCTGTTCCAGTACTCGGCAT-3’	121 bp	58	60.67 60.11

Daha sonra primerler yardımıyla ve gerekli olan PCR koşullarını sağlayarak hedef bölge çoğaltıldı. Real-Time PCR reaksiyonu karışımı ve miktarları Tablo 3.2’te verilmiştir.

Tablo 3.2. SYBR Green yönteminde kullanılan PCR karışımı ve miktarları

Bileşenler Örnek Başına	Miktar 1x(µl)
SsoAdvanced™ Universal Inhibitor-Tolerant	5
SYBR® Green Supermix	
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Kalıp DNA	2
Steril distile su	2
Toplam	10

Hazırlanan reaksiyon karışımı, 96'lık well plate'e aktarılarak, plate spinner cihazında döndürüldükten sonra, Stratagene Mx 3000p Real time cihazına yerleştirilmiş ve Tablo 3.3'te belirtilen programa göre reaksiyon başlatılmıştır.

Tablo 3.3. SYBR Green yönteminde uygulanan PCR koşulları

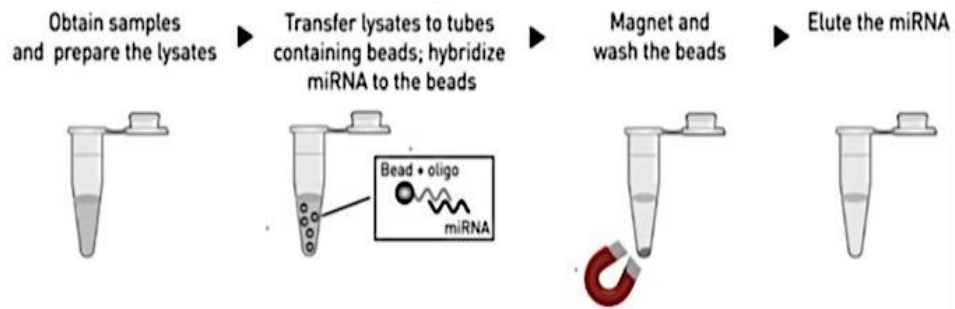
İşlem	Sicaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu	98	3 dk	1
Amplifikasyon	98	15 sn	40
	60	30 sn	
Melting curve	95	1 dk	1
	55	30 sn	
	95	30 sn	

3.2.3. Kandan RNA İzolasyonu

TaqMan® miRNA ABC Purification Kit Yöntemi ile Kandan RNA İzolasyonu

1. Steril ependorf tüp içerisine 10 µl tam kan örneği konuldu.
2. Ependorf tüp içerisindeki kan örneği üzerine 20 µL Lysis Buffer eklendi. Sonra 30 saniye vortex ile karıştırıldı ve ardından kısaca santrifüj yapıldı.
3. 120 µL ABC Tamponu eklendi. 30 saniye vortex yapıldı ve sonra kısaca santrifüj yapıldı.
4. Örneklerin olduğu ependorf tüpler buz üzerine yerleştirildi.
5. TaqMan® miRNA ABC Purification Kit içinde olan manyetik boncukları (Beads) çözelti içinde süspansiyon haline gelene kadar vortekslendi.
6. Sonra bir dakika ultrasonik su banyosu kullanarak sonikasyon yapıldı ve ardından tekrar bir kaç saniye vortex yapıldı. Daha sonra sıvıyı tüplerin altına toplamak için çok kısa bir santrifüj yapıldı.
7. Her örnek için, LoBind 1,5 mL mikrofüj tüplerine 80 µL Beads (toplam 80 × 106 boncuk) dağıtıldı.
8. Çözeltiyi temizlemek için tüpler mıknatıslı manyetik bir rafta en az 1 dakika bekletildi. Pelleti (Beads) bozmadan süpernatant dikkatlice alındı ve atıldı.
9. Hazırladığımız ve buz üstünde beklettiğimiz lizatı Beadslerin olduğu tüpe aktarıldı. Süspansiyon haline gelene kadar vortekslendi, ardından sıvıyı tüplerin altına toplamak için kısa süre santrifüjlendi.

10. Beadsleri miRNA'ya hybridize etmek için tüpler, 1200 rpm'de 40 dk, 30 °C termomikser içinde çalkalandı.
11. Çözeltiyi temizlemek için tüpler mıknatıslı manyetik bir rafta en az 1 dakika bekletildi. Pelleti (Beads) bozmadan süpernatant dikkatlice alındı ve atıldı.
12. Peletlere 100 µL Wash Buffer I eklendi ve beadleri çözelti içinde yeniden süspanse etmek için kısa süre vorteks ve santrifüj yapıldı.
13. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler en az 1 dakika manyetik rafa yerleştirildi. Solüsyon temizlendiğinde ve şeffaf olunca, toplanan beadsleri bozmadan süpernatant atıldı.
14. Beadslere 100 µL Wash Buffer II eklendi ve Beadsleri solüsyonda yeniden süspanse etmek için kısaca vorteks ve santrifüj yapıldı.
15. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler en az 1 dakika manyetik rafa yerleştirildi. Solüsyon şeffaf hale gelince toplanan beadsleri bozmadan süpernatant atıldı.
16. Üçüncü bir yıkama için 14-15'te yer alan aşamalar tekrarlandı.
17. Pelete 100 µL Elution buffer eklendi, kısaca vorteks ve santrifüj yapıldı.
18. miRNA'yı Beadslerden ayırmak için, termomikserde 1200 rpm'de 70 °C, 3 dk çalkalandı.
19. Tüpler en az 1 dakika manyetik rafa yerleştirildi.
20. Süpernatant temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne dikkatlice aktarıldı.
21. İzolasyon sonrası elde edilen miRNA örnekleri, sonraki işlemlere kadar -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. TaqMan® miRNA ABCpurification kitinin iş akışı.

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4473087#/4473087>)

Covid-19 pandemi nedeni ile daha uzun süre bekletilen kanlardan, daha yüksek RNA konsantrasyonu elde etmek için TriZol yöntemi kullanıldı. 100 µl RNAase free su ile dilüe edilen RNA'ların miktarı ve saflığı 250 ± 100 ng/µl ve 260/280 od değerleri $1,78\pm15$ elde edildi.

TriZol Yöntemi ile Kandan RNA İzolasyonu

TriZol yöntemi ile kan örneklerinden miRNA izolasyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Steril endorf tüp içersine 200µl tam kan örneği konuldu.
2. Ependorf tüp içersindeki kan örneği üzerine 700µl Trizol eklendi ve vorteks yapılarak homojenize edildi.
3. Oluşan homojen karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Homojen karışım üzerine 140µl kloroform eklendi ve 20 saniye kuvvetlice vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrasında, +4°C'de $12.000\times g$ 'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrası tüpte oluşan üst sıvı fazı yeni bir steril tüp içine aktarıldı.
8. Sıvı faz üzerine 350 µl isopropanol eklendi ve maksimum hızda vortekslendi.
9. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonrasında, +4°C'de $12.000\times g$ 'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
11. Süpernatant atıldı, dipte oluşan beyaz veya şeffaf pellet üzerine 700 µl, %75 ethanol eklendi. Sonrası iyice pipetaj yapıldı.
12. +4°C'de $7.500\times g$ 'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
13. Süpernatant atıldı, endorf tüpte dipte kalan RNA'lar oda sıcaklığında 10-15 dk bekleterek hafifçe kurutuldu. Üzerine 50 µl RNAase free su eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.
14. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı Nano-drop ile 260nm'de ölçüldü.
15. RNA örneği, sonraki işlemlere kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA içindeki miRNA örneklerinden cDNA sentezi için, TaqManTMSmall RNA Assays kiti kullanıldı. miRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan cDNA sentezi, PCR reaksiyon karışımının içerikleri Tablo 3.4'de

verilmiştir.

Tablo 3.4. cDNA sentezi için kullanılan PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler Örnek Başına	Miktar 1x (µl)
10 mM dNTP	0,15
MultiScribe™Revers Transkriptaz (50U/µl)	1
10X Revers Transkripsiyon	1,5
Buffer RNase İnhibitör (20U/ µl)	0,19
Nükleaz içermeyen su	4,16
Toplam	7

miRNA örneklerinden cDNA sentez işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. cDNA sentez kitinin bileşenleri buz üzerinde çözüldü.
2. Test edilecek her bir RNA örneği ve 5X RT primerler buz üzerinde çözüldü.
3. İçeriği dibe toplamak için tüpler vortekslenmeden kısa bir santrifüj edildi.
4. cDNA sentez reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı ve buz üzerinde tutuldu.
5. Her bir RNA örneği ve su kontrolüne (NTC) 7 µl cDNA sentez reaksiyon karışımı eklendi ve 5µl RNA örneği ile karıştırıldı.
6. Elde edilen toplam 12µl'lik RT master mix + RNA karışımına 3µl 5X RT primer eklendi. Tüpler inversiyon yapılarak iyice karıştırıldı ve karışım kısaca santrifüj yapılarak tüpün dibinde toplandı.
7. Her bir örneğe ait tüplere, bu işlemlerden sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyon yapıldı.
8. Daha sonra tüpler ısı döngü cihazı içine konuldu ve Tablo 3.5'teki PCR programı ile reaksiyonlar gerçekleştirildi.
9. Reaksiyon sonrasında cDNA örnekleri, Real-Time PCR (qRT-PCR) analizi gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.5.cDNA sentezi PCR programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Başlangıç	16	30
Reverse transkripsiyon	42	30
RT inaktivasyon	85	5
İsteğe bağlı aşama	4	∞

3.2.5. Kantitatif PCR (qRT-PCR) İle miRNA Ekspresyon Analizi

qRT-PCR yöntemi, nükleik asitlerin amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyallerinin ölçülmesiyle sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Reaksiyon döngüleri ve floresan boya veya problemlerin verdiği sinyalin okunması, aynı cihazda ve aynı tüp içerisinde gerçekleşmektedir. PCR ürünü ve floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır. Aynı reaksiyon tüpü içerisinde hem çoğaltma, hem de çoğaltılan bölgenin saptanabilmesi; tekniği hızlı, kullanışlı, güvenilir ve pratik bir hale getirmektedir (Logan and Edwards, 2004).

Çalışmamızda, özgün dizilere bağlanan, en yüksek sinyal veren prob sistemi olan iki-işaretli TaqMan® prob yöntemi kullanıldı. Bu teknolojiye problemler, 5'-3' uçlarından kovalent bağlı florofofor (6-karboksifloresin= 6-FAM) moleküllerle işaretlenmiştir. 5' ucunda haberci (reporter), 3' ucunda ise baskılayıcı "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) moleküller bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Denatürasyon sonrasında prob, tek iplikli hale gelen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Uzama evresinde polimeraz enzimi, prob ile karşılaştığında sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar ve serbest kalan haberci (reporter), sinyal oluşturmaya başlar. Her döngü sonunda hedef bölgenin çoğalmasına bağlı olarak, sinyal şiddetindeki artış gözlemlenir (Mullah and Andrus, 1997; Didenko, 2001).

3.2.5.1. Primerlerin Seçimi

hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p'nin mikro-RNA genleri ile ilgili bilgiler 'www.ncbi.nlm.nih.gov' sitesinden elde edildi. Primer seçimi için olgun mikro-RNA'lara ait dizilerin belirlenmesinde ise 'http://www.mirbase.org' veritabanı kullanıldı. Mikro-RNA genlerine ve mikro-RNA'lara ait bilgiler ve primer dizileri Tablo 3.6 ve 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.6. hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p'nin'ye ait diziler

Primer	
hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU

Tablo 3.7. hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p'nin'ye ait tanımlar

	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-335-5p
Gen Adı	MIR204	MIR335
Gen ID	has-miR-204	has-miR-335
Genomik Yerleşim	9q21.12	7q32.2
miRBase ID	MI0000284	MI0000816
miRbase Erişim Numarası	MIMAT0000265	MIMAT0004703

3.2.5.2. hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeylerinin ölçümü

hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p'nin qRT-PCR'ı için 'TaqMan®Universal Master Mix II with UNG' master mix ile 'TaqMan®MicroRNA Assay hsa-miR-204-5p ve TaqMan®MicroRNA Assay hsa-miR-335-5p' kullanıldı. Veri normalizasyonu için endojen kontrol olarak 'TaqMan®MicroRNA Assay RNU6B' kullanıldı.

qRT-PCR analizi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. TaqMan®MicroRNA Assay (20X) ve cDNA örnekleri buz üzerinde çözündürüldü.
2. 'TaqMan®Universal Master Mix II, with UNG' kullanmadan önce şişesi hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.

3. Her bir assay için yapılacak reaksiyon sayıları hesaplandı. Her reaksiyon iki tekrarlı olarak hesaplandı ve yapıldı.
4. Her plate, cDNA örneklerinin her biri için bir miRNA assay, bir endojen kontrol assay ve bir kalıp içermeyen kontrol (no template control: NTC) içerecek şekilde hazırlandı.
5. qRT-PCR reaksiyonu toplam 20µl hacimle gerçekleştirildi.
6. qRT-PCR reaksiyon karışımı, her bir assay için ayrı ve steril 1,5mL'lik mikro santrifüj tüplerinde, Tablo 3.8'deki bileşenler ve miktarlar ile hazırlandı. Tüpler hafifçe karıştırıldı ve kısaca santrifüj yapıldı.
7. qRT-PCR reaksiyon karışımı ve cDNA örnekleri, her bir örnek için üç tekrar olacak şekilde 96-kuyucuklu plate içine mikro pipetler ile aktarıldı.
8. Hazırlanan plate, eş zamanlı PCR cihazına yüklendi.
9. Isı döngü cihazı ayarları Tablo 3.9'de verilen qRT-PZR programına göre ayarlandı ve reaksiyon gerçekleştirildi.

miRNA'ların ekspresyon analizleri, qRT-PCR (Agilent Mx3000P qPCR System) cihazı kullanılarak yapıldı.

qRT-PCR yapıldıktan sonra miRNA ekspresyon düzeyleri, hedef miRNA'ların CT değerlerinin endojen kontrolün CT değerine normalize edildiği $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak belirlendi. Gen ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile hesaplandı.

Tablo 3.8. qRT-PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler Örnek Başına	Miktar 1x (µl)
TaqMan®MicroRNA Assay (20X)	1
TaqMan®Universal Master Mix II, with UNG	10
CDNA	1,33
Nükleaz içermeyen su	7,67
TOPLAM	20

Tablo 3.9. miR-204-5p ve miR-335-5p ekspresyon düzeylerinin ölçüldüğü qRT-PCR programı

İşlem	Sıcaklık (⁰ C)	Zaman	Döngü sayısı
UNG Aktivasyonu	50	2 dk	1
Enzim Aktivasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlanma/Uzama	60	60 sn	

3.3. İstatistiksel Analiz

Araştırmaya dahil edilen MS hastası ve sağlıklı kontrol birey sayısı, power analizi yapılarak (%87 testin gücü ve %95 güven aralığında) belirlenen 3 çalışma grubu (relapsing remitting (n=28), sekonder progresif (n=8), primer progresif (n=4)) ve kontrol grubu (n=10) olmak üzere toplam 50 bireyden oluşmuştur.

Bu çalışmada kandan izole edilen miR-204p, miR-335p ekspresyon seviyelerindeki değişimler farklı istatistiksel testler kullanılarak hesaplandı. RRMS, SPMS, PPMS ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar ve miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların RRMS tanılı hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için öncelikle normallik testi için Shapiro-Wilk Test, korelasyon analizi, ikili karşılaştırmalarda Mann-whitney-U Testi ve ikiden fazla grup karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis ve Anova Testi uygulanmıştır. Çalışmada yapılan tüm istatistiksel analizlerde SPSS 22.0 (Armonk, ABD) sürümü kullanıldı ve sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1.Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri

Bu çalışmada, HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alelleri ile hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyonlarının, MS ile olan ilişkisinin araştırılması amacıyla; 40 MS hastası ile, kendisinde ve ailesinde MS ve diğer başka bir hastalık öyküsü olmayan 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak incelendi.

MS'li 40 hastadan 26'sı (%65) kadın, 14'ü (%35) erkekti. Hasta grubunun yaş aralığı 24 ile 74 yaş aralığında değişmekte idi. Hasta grubunun genel yaş ortalaması 44,84; erkek hastaların yaş ortalaması 45,92 ve kadın hastaların yaş ortalaması ise 44,25 olarak belilendi (Tablo 4.1). MS grubunun demografik özelliklerini incelediğimizde, hastaların %72.5'i 20-40 yaş arasında tanı almışlardır. Hastaların %70'inin takip süresi 10 yıldan fazladır ve %75'inin yıllık atak oranı 0,5'in altındadır (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Tüm grupların demografik özellikleri

	Kontrol	RRMS	SPMS	PPMS
Hasta sayısı	10	28	8	4
Yaş ortalaması	40,8	42,17	44,75	60,5
Cinsiyet K/E	6/4	17/11	6/2	3/1

Tablo 4.2. MS grubu demografik özellikleri

	Hasta Sayısı (%)
Cinsiyet	
Kadın	n: 26 (65%)
Erkek	n: 14 (35%)
Tanı alma yaşı	
<20 yaş	n: 2 (5%)
20-40 yaş	n:29 (72,5%)
>40 yaş	n: 9 (22,5%)
Takip süresi	
0-5 yıl	n: 6 (15%)
5-10 yıl	n: 6 (15%)
>10	n: 28 (70%)
Toplam atak sayısı	
1-2	n: 15 (37,5%)
3-5	n: 13 (32,5%)
> 5	n: 12 (30%)
Yıllık atak oranı	
	n:30 (75%)
	n:8 (20%)
	n:2 (5%)
<0,5	
0,5-1	
>1	
EDSS	
	n: 14 (35%)
0-2	n: 12 (30%)
2,5-4,5	n: 14 (35%)
>4,5	

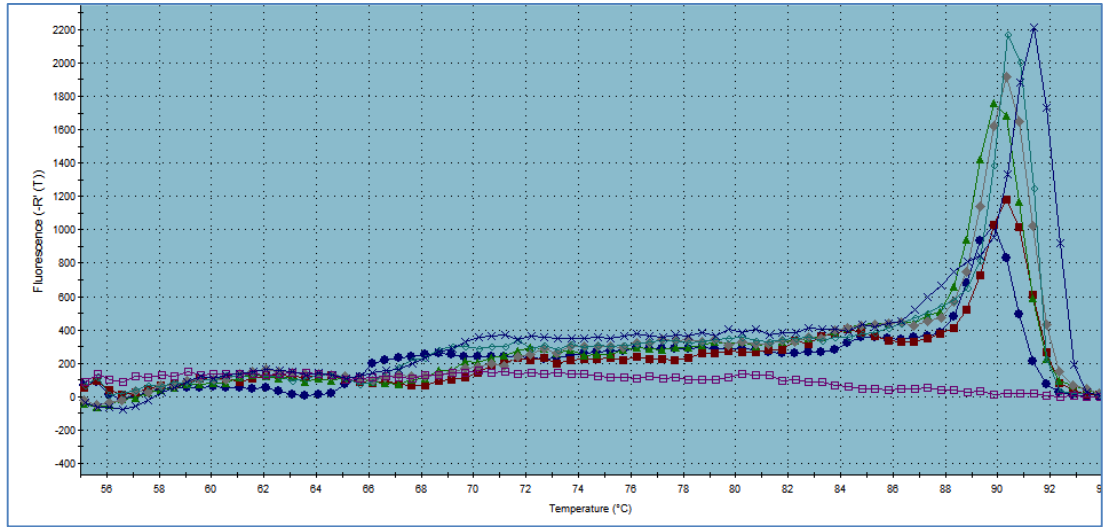
4.2. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 Alelleri

HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alelleri , MS ve kontrol gruplarında SYBR Green- qPCR yöntemi ile analiz edildi ve bunun için MxPro3000 QPCR Software kullanıldı. Bu yöntem ile HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alellerin varlığı analiz edildi. Toplam 40 MS hastasından oluşan grupta, 13 hastada HLA-DQB1*06:02 ve 4 hastada HLA-DRB1*15:01 ve 16 hastada her iki alel saptandı. Kontrol grubunda ise toplamda 10 bireyden 5'inde HLA-DQB1*06:02 ve 2 bireyde HLA-DRB1*15:01 ve 3 bireyde her iki alel saptandı. Kontrol ve MS grupları arasında her iki alelin varlığı açısından anlamlı bir ilişki bulunamadı (Tablo 4.3).

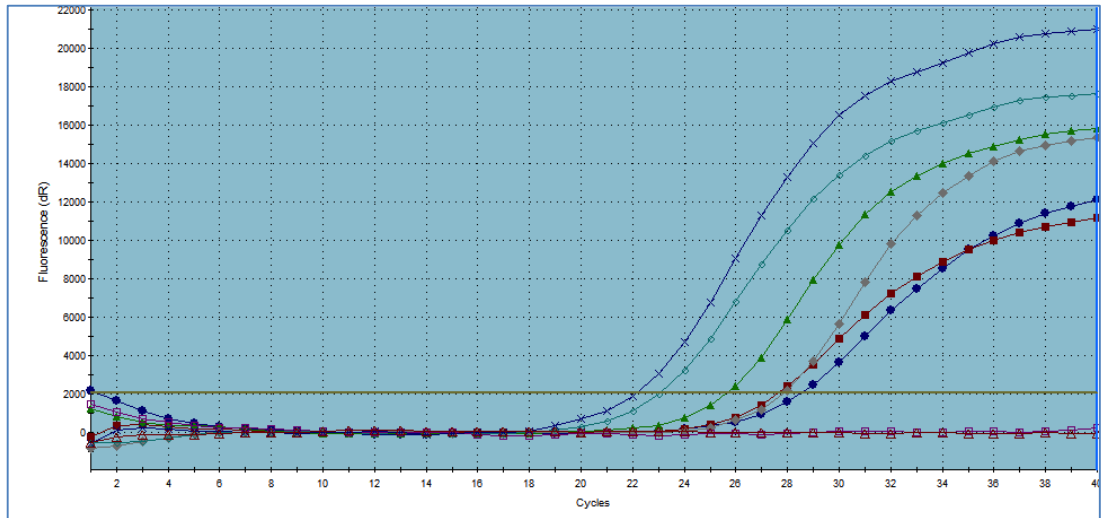
Tablo 4.3. MS ve sağlıklı kontrol gruplarında HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 anlamlılık değerleri

	MS (n)	Kontrol (n)	P değeri
HLA-DQB1*06:02	13	5	0,5
HLA-DRB1*15:01	4	2	0,6
Her İki Aleli Taşıyan Bireyler	16	3	0,2

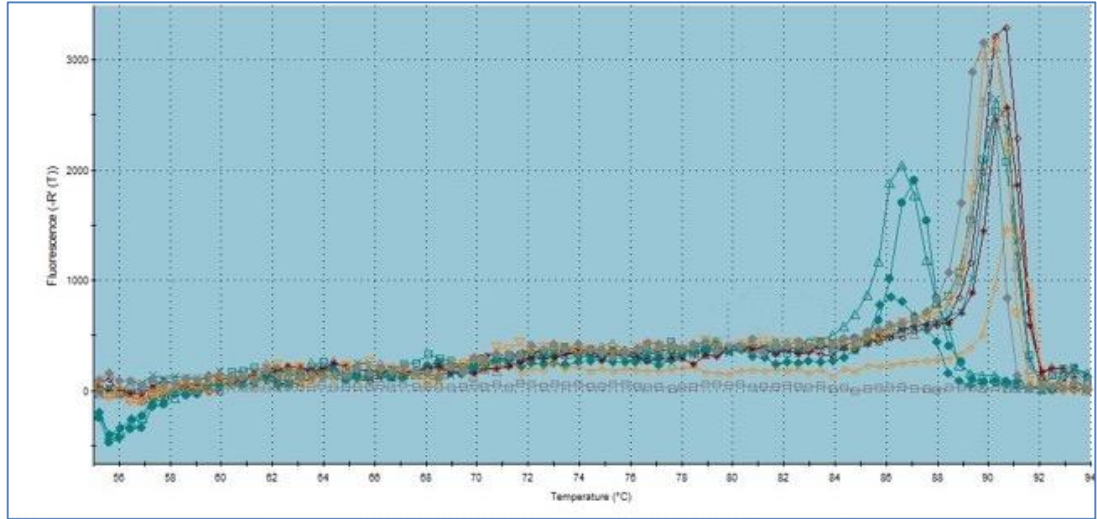
Melting curve analizinde; HLA-DQB1*06:02 aleline bakılan tüm DNA’larda ortalama $89.21 \pm 0,5$ erime noktası saptandı (şekil 4.1) ve HLA-DRB1*15:01 alelinde ise ortalama $88,93 \pm 1,93$ erime noktası saptandı. HLA-DRB1*15:01 aleli iki sıcaklıkta ($86,6 - 90,3$) daha fazla görüldü (şekil 4.3). Kontrol ve MS gruplarında; HLA-DQB1*06:02 ve HLA-DRB1*15:01 alellerinin amplifikasyon grafikleri şekil 4.2 ve 4.4’de verilmiştir.



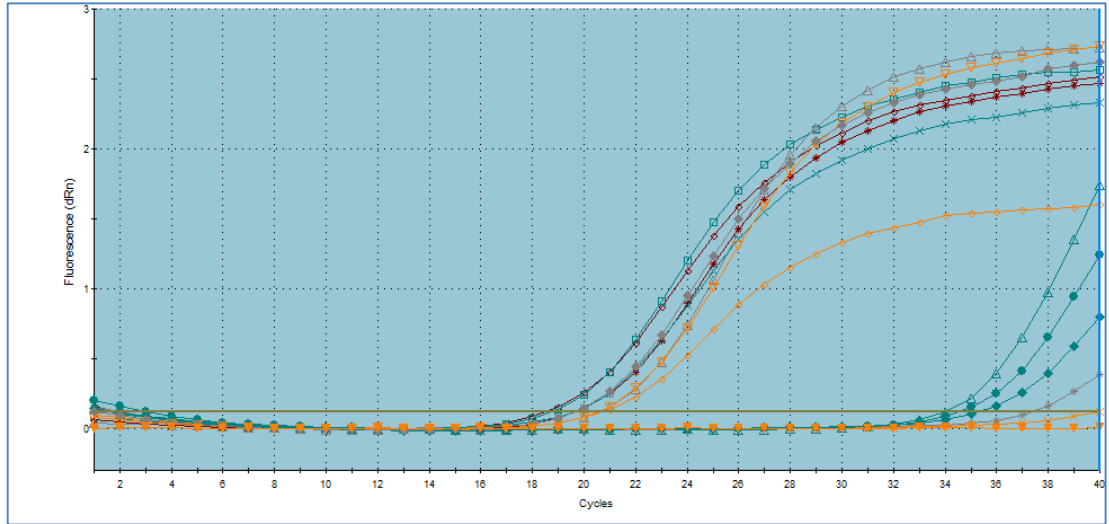
Şekil 4.1. Kontrol ve MS gruplarında; HLA-DQB1*06:02 alelin sıcaklık eğrisi



Şekil 4.2. Kontrol ve MS gruplarında; HLA-DQB1*06:02 alelin amplifikasyon grafiği



Şekil 4.3. Kontrol ve MS gruplarında; HLA-DRB1*15:01 alelin sıcaklık eğrisi



Şekil 4.4. Kontrol ve MS gruplarında; HLA-DRB1*15:01 alelin amplifikasyon grafiği.

4.3. hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p Ekspresyon Düzeyleri

Sağlıklı bireylere (n:10) ve RRMS (n:28), SPMS (n:8), PPMS (n:4) MS grubu hastalarına ait periferik kan örneklerinden izole edilen hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p mikroRNA'larının ekspresyon düzeyleri, kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile toplamda 40 MS ve 10 kontrol grubunda analiz edildi. Veri normalizasyonu için endojen kontrol olarak snoRNA-U6 (TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B) kullanıldı. qRT-PCR yapıldıktan sonra miRNA ekspresyon düzeyleri, hedef miRNA'ların CT (cycle threshold) değerlerinin endojen kontrolün CT değerine normalize edildiği $\Delta\Delta CT$ (Delta-DeltaCT) metodu kullanılarak belirlendi.

$$\Delta CT (MS) = CT (MS) - CT (\text{referans gen})$$

$$\Delta CT (\text{kontrol}) = CT (\text{kontrol}) - CT (\text{referans gen})$$

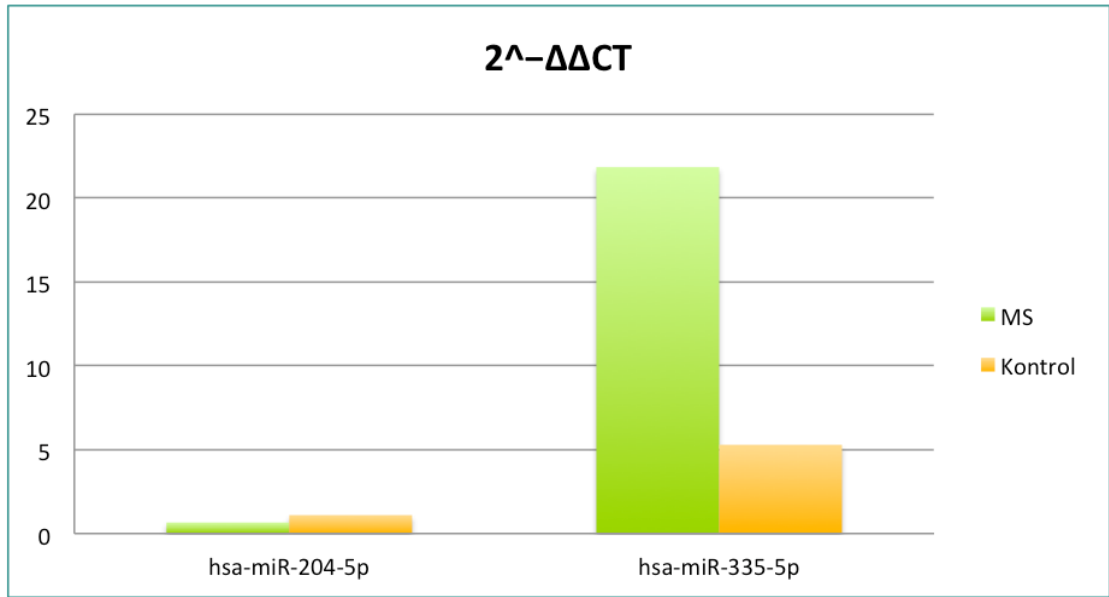
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (MS) - \Delta CT (\text{kontrol})$$

$$\text{miRNA ekspresyonundaki rölâtif değışimler} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Gen ekspresyonundaki rölâtif değışimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile hesaplandı. Bu değeriendirme sonucunda, MS hastalarının hsa-miR-335-5p'nin ekspresyon düzeyleri kontrol grubunun ekspresyon düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı fark bulunurken ($P= 0.001$), hsa-miR-204-5p'nin ekspresyon düzeyleri kontrol grubunun ekspresyon düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamadı ($P= 0.335$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kontrol ve MS gruplarında hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeylerinin Anlamlılık değeri

	P değeri	
	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-335-5p
Kontrol- MS	0.335	0.001



Şekil 4.5. Kontrol ve MS gruplarında; hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri

Toplam 40 hastanın tamamında miR-335-5p'nin ekspresyon düzeyinde artış gözlemlendi; miR-204-5p'nin ekspresyon düzeyinde ise 28 hastada azalma, 3 hastada artış saptandı ve 9 hastada ise kontrol grubuna göre farklılık gözlenmedi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Tüm grupların miRNA ekspresyon ortalama $2^{-\Delta CT}$ değerleri

	$2^{(-Ort. (Delta(CT)))}$			
	Kontrol	RRMS	SPMS	PPMS
hsa-miR-204-5p	1.1	0.7	0.6	0.55
hsa-miR-335-5p	5.29	14.17(32.80 SD)	5.62 (3.58 SD)	107.49 (206.16)

Tablo 4.6. RRMS alt grup miRNA ekspresyon ortalamaları

		Ortalama $2^{-\Delta CT}$	
		hsa-miR-204-5p	hsa-miR-335-5p
Tanı yaşı	<20 yaş	0,705	3,54
	20-40 yaş	0,753	17,29
	>40 yaş	0,553	4,63
Takip Süresi	0-5 yıl	0,6	15,04
	5-10 yıl	0,99	9,44
	>10	0,59	15,45
Toplam atak sayısı	1-2	0,73	12,27
	3-5	0,91	20,09
	>5	0,59	6,68
Yıllık atak oranı	<0,5	0,65	14,62
	0,5-1	0,84	14,60
	>1	0,35	6,74
EDSS	0-2	0,96	11,33
	2,5-4,5	0,57	21,15
	>4,5	0,32	4,92

Tablo 4.7. miRNA'ların; RRMS, KİS, RİS ve kontrol grubu median değerleri

	Median (Min.- Max.)			
	Kontrol	RRMS	SPMS	PPMS
hsa-miR-204-5p	0,285 (0,01-4,36)	0,5150 (0,11-2,20)	0,46 (0,12-1,31)	0,34 (0,09-1,43)
hsa-miR-335-5p	2,9 (0,0- 17,01)	5,96 (1,59-174,61)	5,48 (2,15-12,76)	5,34 (2,57-416,74)

Yapılan istatistiksel sonuçlarda RRMS, SPMS, PPMS ve kontrol grubu arasındaki hsa-miR-204-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Gruplar arası miR-335-5p ekspresyonunda kontrol ve RRMS arasında

(p=0,041), RRMS ve PPMS arasında (p=0,029) ve SPMS ile PPMS arasında (p=0,038) anlamlı farklar saptandı.

Tablo 4.8. MS gruplar arasında hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeyleri

	P değeri	
	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-335-5p
Kontrol- RRMS	0.335*	0.041*
Kontrol- SPMS	0.997*	0.174*
Kontrol- PPMS	0.075*	0.465*
RRMS- SPMS	0.890**	0.943**
RRMS- PPMS	0.864**	0.029**
SPMS- PPMS	0.988**	0.038**

* Corralation **one way anova

RRMS alt grupları değerlendirildiğinde ise cinsiyet, yıllık atak oranı, EDSS, takip süreleri, tanı yaşı ve atak sayıları ile hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyonlarında pozitif bir ilişki saptanmadı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Demografik ve klinik özelliklerine göre RRMS grubun da hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeyleri

RRMS	P değeri	
	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-335-5p
Cinsiyet	0,657	0,371
Tanı yaşı	0,935	0,847
Takip Süresi	0,263	0,937
Toplam atak sayısı	0,428	0,518
Yıllık atak oranı	0,243	0,548
EDSS	0,419	0,555

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Multipl skleroz (MS), beyin ve omuriliğin kronik inflamatuvar, dejeneratif ve demiyelinizan bir bozukluğudur. Otoreaktif T lenfositlerin aktivasyonundan kaynaklanan miyelin ve aksonlardaki hasar ile karakterizedir (Oksenberg and diğerleri, 2008; Agrawal and Yong, 2007) ve Multipl sklerozun etiyolojisi multifaktöriyeldir (Ramagopalan, vd., 2008). Birçok popülasyonda yapılan bağlantı çalışmaları, kromozom 6p21.3 üzerindeki insan lökosit antijeninin (HLA), MS ile tutarlı bir şekilde bağlantılı olan tek bölge olduğunu göstermektedir (Lincoln vd., 2005; Hafler vd., 2007).

Genetik çalışmalar, bağışıklık sisteminin MS duyarlılığına en büyük genetik katkıyı sağladığını göstermektedir. Yine de; bağışıklıkla ilgili bu genler, inflamasyonun MS'de neden MSS (Merkezi Sinir Sistemi) ile sınırlı olduğunu açıklayamaz. MS hastalarının MSS'inde, onları inflamasyona karşı daha savunmasız hale getiren, altta yatan bir düzensizlik olduğu varsayılmaktadır. MS ve MSS ile ilişkili gen sayısının az olması, MSS'deki epigenetik değişikliklerin bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, miRNA aracılı transkripsiyon sonrası düzensizlik nedeniyle değişebilen spesifik MSS yolakları araştırılmaktadır. MS ile ilgili yolaklar arasında, hücre adezyon molekülleri ve kanserdeki mikroRNA'lar bulunur (MalaCard Human Disease database).

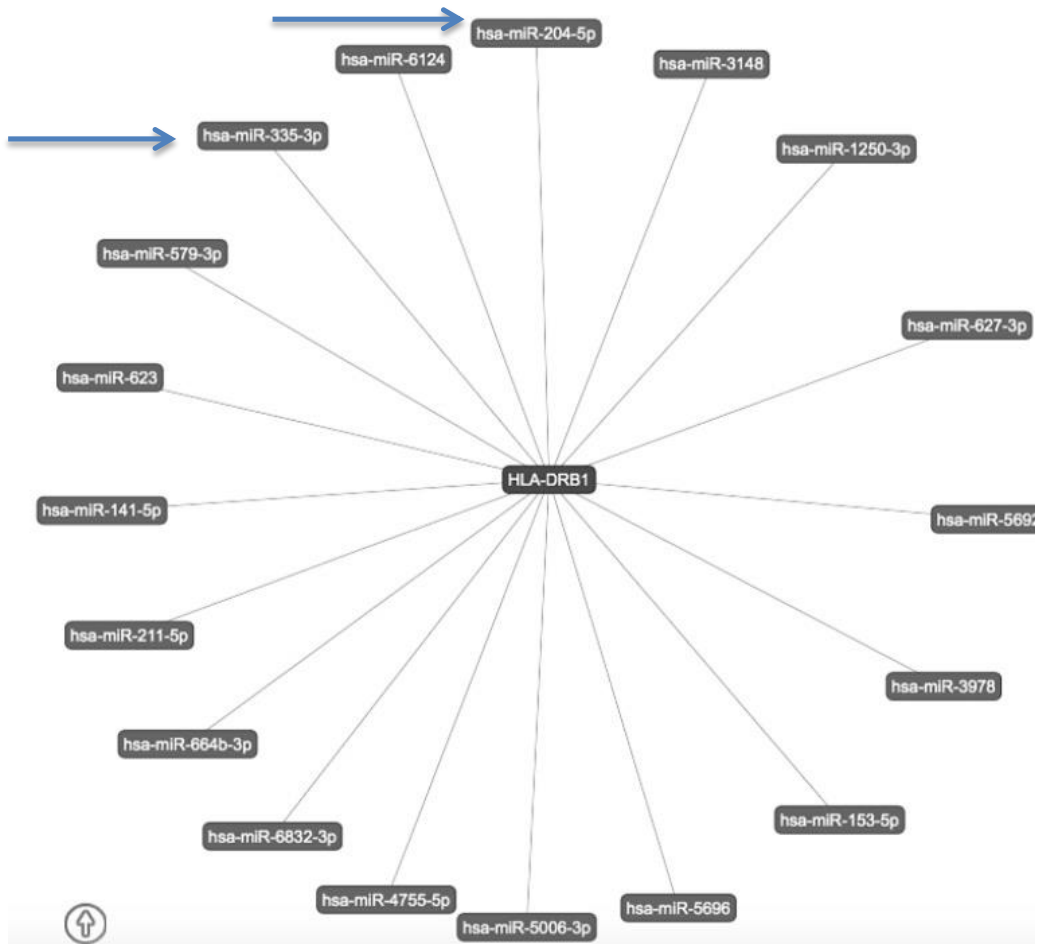
MS patofizyolojisinin anlaşılmasında son yıllarda, miRNA'ların ekspresyonu incelenmiştir. MS hastalarında miRNA ekspresyon profilleri ilk olarak 2009 yılında çalışılmıştır (Moore, 2009). Yapılan çalışmalar yıllar içinde artmasına rağmen, MS gelişimi ile ilgili miRNA çalışmaları Türkiye'de ve dünyada halen oldukça az sayıdadır ve miRNA'ların ekspresyonu ile MS duyarlılığı etkileme yolları hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu çalışmalarda materyal olarak; serum, plazma, periferik kan mononükleer hücreleri, CD4⁺, CD8⁺, T lenfositleri, B lenfositleri, serebral beyaz cevher lezyonları, tanıli hastalar ve laboratuvar ortamında MS modeli oluşturulan hayvanlarda incelenmiş ve ekspresyonlarında anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Çalışmamızda MS gelişimi ile miRNA'lar arasındaki bağlantıyı ortaya koyabilmek ve hastalık progresyonu ile ilişkisini saptayabilmek için, klinik pratikte

kullanımı daha kolay olan tam kandan qRT-PCR analiz tekniği ile miRNA ekspresyon düzeylerini değerlendirdik.

Bu çalışmada McDonald 2017 revize kriterlerine göre 28 RRMS, 8 SPMS, 4 PPMS tanılı birey yani toplamda 40 MS hastası ve 10 sağlıklı kontrol grubu değerlendirilmiştir. Tüm otoimmün hastalıklarda olduğu gibi MS de kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmektedir (Hernán, vd., 2000). MS'in cinsiyete göre dağılımına bakıldığında, erkek/kadın oranı 1/2 olarak saptanmıştır (Bradley, vd., 2008). Diğer çalışmalara baktığımızda erkek/kadın oranının Batı Yunanistan'da 1/1,3; İran'da 1/3,11; Japonya'da 1/2,9 ve Danimarka'da 1/2 olduğu görülmektedir (Papathanasopoulos, vd., 2008; Houzen, vd., 2008; Koutsouraki, vd., 2010; Elhami, vd., 2011). Çalışmamızda olgularımızın erkek/kadın oranı 1/1,8 olup ve hastalığın başlangıç yaşı literatür ile uyumlu olarak çoğunlukla 20-40 yaşları arasında (%72.5) saptanmıştır (Bradley, vd., 2008).

MS genetiği ile ilgili mevcut verilerden yola çıkarak yaptığımız çalışmada, MS genetiğinde önemli rolü olan HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alelleri ile birlikte, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 genlerini hedefleyen miRNA'ları bulmaya çalıştık. HLA-DRB1 ile zayıf ilişkisi bildirilmiş olan 18 miRNA "miR Target Link Human" veritabanında saptanırken, HLA-DQB1 genini hedefleyen bir miRNA saptanamadı. Bulunan miRNA'lar ile yapılan literatür taramaları sonucunda, hsa-miR-204-5p ve hsa-miR-335-5p ekspresyonlarının MS ile ilişkisi incelenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. HLA-DRB1'i hedefleyen 18 mikroRNA (miRTargetLink, 2021).

MicroRNA Data Integration Portal (mirDIP) üzerinde yaptığımız incelemelerde, hsa-miR-335 ekspresyonunun HLA-DRB1 ile yüksek ilişkili olduğu ve hsa-miR-204 ekspresyonunun ise orta derecede ilişkisi olduğu saptandı. Ayrıca çalıştığımız her iki miRNA'nın HLA-DQB1 geni ile de orta derece ilişkileri olduğu saptandı.

Çalışmamızda Orta Karadeniz bölgesinde yaşayan MS hasta grubu ve kontrol grubunda HLA-DQB1*06:02 ve HLA-DRB1*15:01 alelleri SYBR green kullanarak Real-Time PCR yöntemi ile inceledi ve istatistiksel olarak MS ve kontrol grup arasında anlamlı bir fark saptanamadı.

Bizim bulgularımızdan farklı olarak; sınıf II HLA-DRB1*15:01 alelini, MS riskini anlamlı düzeyde arttırdığı (olasılık oranı (OR) ~ 3) gözlemlenirken, sınıf I HLA- A*02 aleli ise MS riskini anlamlı düzeyde azalttığı rapor edilmiştir (OR ~ 0,6). HLA-A*02'nin yokluğu ve DRB1*15:01'in varlığı kombine OR ~ 5 değerine sahiptir (Olsson, vd., 2017).

Yine Kuzey Avrupa popülasyonlarında HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 haplotiplerinin sık gözlenmesi, MS ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Afrika popülasyonları MS ile ilişkili haplotipik çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik Kuzey Avrupa popülasyonları ile karşılaştırıldığında, farklı dengesiz bağlantı paternlerinin varlığı anlaşılmıştır (OMIM 126200). MS'ten sorumlu HLA genlerinin lokalizasyonu için, Oksenberg ve ark. tarafından, iyi tanımlanmış Afro-Amerikan vaka verileri üzerinden 2 lokusla ilgili vaka çalışması gerçekleştirilmiştir (Oksenberg, vd., 2004). İlgili çalışmada HLA-DRB1*15 ile MS arasında bir ilişki olduğu gösterilmiş ve bu da HLA-DQB1*06:02'den bağımsız olarak MS'te DRB1 lokusunun birinci derecede rol aldığına işaret etmiştir. Afrika kökenli Amerikan hastalarının aday kromozomlarının önemli bir kısmının, Afrika kökenli bir aile ile tutarlı haplotipler sergilediği tespit edilmiştir (Manna, vd., 2018).

Bu risk alelleri ve haplotipler arasındaki karmaşık etkileşimlerin varlığını desteklemek için yapılan SNP tabanlı çalışmalar, henüz ikna edici kanıtlar sağlayamamış olsa da, bu türden etkileşimlerin önerilmesi dikkat çekici olmuştur. Araştırmacılar, bu etkileşimlerin doğalarını güvenilir şekilde tanımlamak ve ilgili alelleri saptamak için, çok büyük örnek sayılarına ihtiyaç olduğunu belirtilmektedir (Sawcer, vd., 2014).

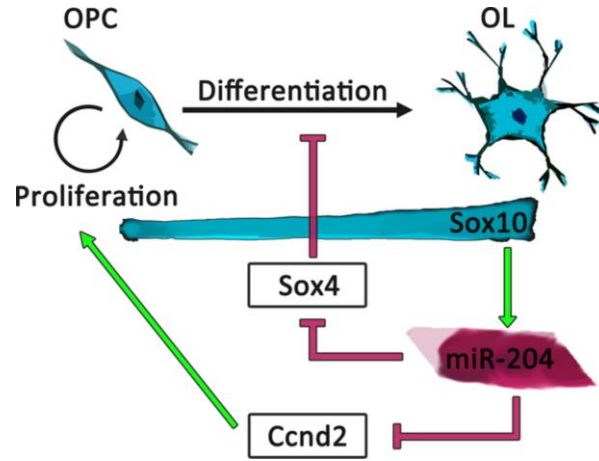
Türkiye'de bizim bulgularımızdan farklı olarak yapılan bir çalışmada, HLA'nın DRB, DQA ve DQB alt sınıfları 103 multipl skleroz (MS) ve 101 sağlıklı kontrol ile araştırılmış, HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 ile MS arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Saruhan, vd., 1997). Ayrıca 2004'de Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, HLA sınıf I ve II haplotipleri ile Miyastenia gravis (MG) ve Multipl Sklerozun (MS) klinik alt grupları arasında -B8, -DR3 ve -A1 ile güçlü bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Dönmez, vd., 2004). MS ile HLA antijenleri arasındaki ilişkiyi saptamak için çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalar gözden geçirildiğinde, topluluklar arasında farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür. Alvarenga ve ark. (2021) yaptıkları bir meta analizde, DRB1*15:01 alelinin Çin ve İspanya'da MS ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Bizim bulgularımız değerlendirildiğinde, HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alelleri ile MS arasında ilişki olmayışının, coğrafi farklılıktan ve örnek sayısının sınırlı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, MS hastalarından alınan kanlardan miRNA'ların ekspresyonu MS hastalarının 3 alt grubunda ve kontrol grubunda analiz edildi. Tam kandan elde edilen ekspresyon verilerimizi değerlendirdiğimizde; RRMS, SPMS ve PPMS tanılı hastalardan elde edilen hsa-miR-335 ve hsa-miR-204 ekspresyon düzeyleri ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında, hsa-miR-335 ekspresyonunun sağlıklı gruplara göre cinsiyetten bağımsız olarak oldukça anlamlı düzeyde artış gösterdiği gözlemlendi, buna karşın hsa-miR-204 ekspresyonunda ise anlamlı bir fark saptanamadı.

Bu çalışmada ilk kez hsa-miR-204 ekspresyonu MS hastası ve kontrol grubunda analiz edildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda miRNA'nın farklı dokularda ifade düzeyinin farklılık gösterdiği saptanmıştır ve bu nedenle MS ile miR-204 arasındaki ilişkiyi daha iyi ortaya koymak için T hücreleri ve CD4+'lere bakılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalarda miR-204 ekspresyonunun bazı nörolojik hastalıklarda da ilişkili olduğu gözlenmiştir; Mezial temporal lob epilepsisi (MTLE), epilepsilerin en yaygın görülen tiplerinden biridir ve sıklıkla belirgin hipokampal piramidal nöron kaybı ile karakterize olan hipokampal skleroz (HS) ile ilişkilidir. MiR-204 ve miR-218'in MTLE ve HS'de önemli ölçüde downregüle edildiği ve her ikisinin de normal hipokampusün tüm alt alanlarındaki nöronlarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, miR-204 ve miR-218, domuzlarda hipokampusün fetal gelişimi sırasında ekspresyonda güçlü değişiklikler göstermiş ve aksonal rehberlik ve sinaptik plastisite ile ilgili dört hedef gen, *ROBO1*, *GRM1*, *SLC1A2* tanımlanmış. *GRM1*'in ayrıca miR-204'ün doğrudan hedefi olduğu gösterilmiştir (Kaalund, vd., 2014). Wang ve ark, nöronal hücrelerde hipoksi ile indüklenen apoptozda HIF1a, miR-204, BCL-2 yolunun rolünü incelemişler ve hipoksinin BCL-2 ekspresyonunu önemli ölçüde downregüle ettiğini, nöronal hücrelerde miR-204'ün mRNA seviyesini kontroldekinden daha fazla arttırdığını gözlemlemişlerdir (Wang, vd., 2016). Daha sonra biyoinformatik analizler ve lusiferaz raportör yöntemi ile; miR-204'ün BCL-2 ekspresyonunu doğrudan hedeflediğini ve düzenlediğini göstermişlerdir. Sensörinöral işitme kaybı (SNHL)'da yapılan çalışmalarda ise miR204-5p'nin, spiral ganglion nöronların (SGN) gelişimi ile yakından ilişkili olan transmembran proteaz serin 3'ün (TMPRSS3) ekspresyonunu inhibe ederek SGN'lerin canlılığını azalttığı

gösterilmiştir. Bununla birlikte, miR-204-5p'nin yüksek ekspresyonu düzenleyici mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Li Y, vd., 2014). Jiang ve ark. (2020) yaptıkları bir çalışmada miR-204-5p'nin yüksek ekspresyonu düzenleyici faktörünün, uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) EBLN3P'nin olduğunu ve normal SGN'lerde yüksek seviyelerde ifade edilirken, bozulmuş SGN'lerde düşük seviyelerde ifade edildiğini bulmuşlardır. Mekanistik analizler; lncRNA EBLN3P'nin normal SGN'lerde miR-204-5p'yi düzenlerken rakip bir sitoplazmik endojen RNA (ceRNA) olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Jiang, vd., 2020). miR-204'ün özofagus kanseri, akciğer kanseri ve mide kanserinde tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Zhang, vd., 2015; Sun, vd., 2015). MiR-204'ün bilinen birkaç hedef geni *USP47*, ***SOX4***, *RAB22A*, *SIRT1* ve *Snai1*'dir (Zhang, vd., 2013;2015; Liu, vd., 2016).

Oligodendrositler, merkezi sinir sisteminin aksonlarını miyelin kılıflarla sarar ve fiziksel olarak korur, bu da hızlı sinyal iletimi ve doğru nöronal fonksiyon ile sonuçlanır. Olgunlaşmamış oligodendrosit öncü hücrelerinden (OPC'ler) miyelinleştirici oligodendrositlere (OL'ler) kadar karmaşık oligodendroglial gelişim, ***Sox*** protein ailesinin transkripsiyon faktörlerinin aktivitesine derinden bağlıdır (Galloway and Moore, 2016). Yin ve ark (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, T-hücresi akut lenfoblastik lösemide miR-204'ün downregülasyonunu *SOX4* ekspresyonu inhibe ettiğini tanımladı ve 3'-UTR'sine bağlanarak *SOX4* ifadesini negatif olarak modüle ettiğini açıkladılar. Yuan ve ark. (2017) miR-204'ün mide kanserinde hücre proliferasyonunu ve metastazını baskıladığını ve hedefi *SOX4* ile negatif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, mide kanseri hastalarının klinikopatolojik parametreleriyle yapılan kapsamlı bir analizde, miR-204 ve *SOX4*'ün lenf nodu metastazı ve tümörün I-IV evresi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Wittstatt ve ark. (2020) miR-204'ün miyelinizasyonda *SOX10* ve *SOX4* ile olan ilişkisini açıkladılar (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. miR-204'ün oligodendroglanın çoğalması ve farklılaşmasındaki rolü.

Sunulan araştırmada MS alt tipleri ve kontrol grubu ile hsa-miR-335 ve hsa-miR-204 miRNA'ların ekspresyonunu karşılaştırdığımızda, sadece RRMS hastalarında hsa-miR-335'te anlamlı düzeyde ekspresyon artışı gözlemlendi. MS alt gruplar arasında miR-335 ekspresyonunda anlamlı fark saptandı. MS kliniğinde veya alt gruplarında hsa-miR-335 ilişkisi ile ilgili herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızın özgün değeri yüksektir.

PPMS (n:4) ve SPMS (n:8) tanılı olgu sayımızın az olmasına karşın, RRMS (n:28) tanılı hastalarımızdan elde edilen hsa-miR-335 ekspresyon düzeylerinin RRMS tanılı olguların demografik ve klinik özellikleri ile karşılaştırıldığında hsa-miR-335 ekspresyon düzeylerinde herhangi bir değişim saptanmaması, bu ekspresyon artışı hastalığın gelişimi ile ilgili basamaklarda görev aldığını ancak hastalığın progresyonu ile ilişkisi bulunmadığını düşündürmektedir. Ayrıca her üç hasta grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda hsa-miR-335'in ekspresyon düzeyi biyobelirteç potansiyeli olduğunu düşündürmektedir. MS hastalığında olmasa da diğer nörolojik hastalıklarda örneğin SMA'da (Spinal Muscular Atrophy) fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; fare embriyonik kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesini veya farklılaşmasını kontrol etmek için tanımlanmışlar ve wild tip hücrelere kıyasla SMA hiPSC (SMA insan kaynaklı Pluripotent Kök Hücreler)'lerin farklılaşmasının erken aşamaları sırasında miR-335-5p ekspresyonunun azaldığı gözlemiştir. miR-335-5p ekspresyonu SMA ve wild tip (WT) hiPSC'ler arasında farklılık göstermemesine rağmen, hem 14 hem de 22 günlük farklılaşmada önemli bir fark olduğunu ortaya konulmuştur. Özellikle, miR-335-5p sonuçlarında, 14 günlük

farklılaşma sonrasında WT'lere kıyasla SMA örneklerinde iki kattan fazla disregülasyon görünmüş ve 22 günden sonra ekspresyonunun daha da güçlü bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu da miR-335-5p ekspresyonu ile, hiPSC'lerin motor nöronlara doğru farklılaşmanın erken aşamalarına girme yeteneği arasında olası bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Murdocca, vd., 2016). ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) hastalarında yapılan bir çalışmada, hsa-miR-335 downregülasyonunun SH-SY5Y nöron hücrelerinde mitofaji, otofaji ve apoptoz üzerine etkisi olduğunu ve ALS'de gözlenen motor nöron kaybında rol oynayabileceği düşünülmektedir (De Luna , vd., 2020).

MiR-335'in, hücre göç işlemlerini etkin bir şekilde kontrol ettiği ve çok sayıda geni doğrudan hedefleyerek, tümör hücre göçü ve istilasının ana düzenleyicisi olduğu bir çok çalışmada kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar MiR-335'in, kısmen *ROCK1*, *MAPK1*, *LRG1*, *SP1* ve *SOX4* dahil olmak üzere bu hücresel süreçlerde yer alan birkaç geni hedefleyerek, tümör hücresi göçü, istilas ve metastazının güçlü bir baskılayıcısı olduğunu göstermiştir. Lynch ve ark, yaptıkları çalışmada, formin aktin nükleatör ailesinin birden fazla üyesinin doğrudan hedeflenmesinin, miR-335'in nöroblastom hücrelerinde inhibe edici etkilerine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir ve miR-335'in, hücre göç işlemlerini etkin bir şekilde kontrol eden çok sayıda geni doğrudan hedefleyerek, tümör hücre göçü ve istilasının ana düzenleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (lynch, vd., 2013).

MiRNA'lar, çeşitli sinyal ağlarına ait birden fazla geni hedefleyerek pleiotropik etkilere sahip olabilmektedir. Alternatif olarak miRNA'lar, aynı genetik yolak içinde birden fazla geni hedefleyerek hücresel etkilerinin gücünü artırabilir (Lynch, vd., 2013) ve yapılan araştırmalarda *SOX4* geninin miR-335 hedef geni olduğu kanıtlanmıştır (Tavazoie, vd., 2008; Wen, vd., 2015; Ali Ahmed, vd., 2020). *SOX4* geni MHC gen bölgesinin (6p21.3) distalindeki 6p22.3 üzerine yer almaktadır (Farr CJ, vd., 1993; Critcher R, vd., 1998). Elde ettiğimiz sonuçlara göre; miR-335'in, *SOX4* genine komşu olan HLA genlerine de etkisi olabilme ihtimali yüksektir. Ayrıca insan beynindeki gelişimsel ekspresyon veri tabanını kullanan Zawerton ve ark, embriyonik gebeliğin ilk 2 trimesterinde tüm beyin bölgelerinde *SOX4* ekspresyonunun yüksek olduğunu ve daha sonra yaşamın üçüncü ve dördüncü dekatlarında çok düşük bir seviyeye düştüğünü bulmuşlardır (Zawerton, vd., 2019). *SOX4* ekspresyonu, ventriküler ve subventriküler bölgeler dahil olmak üzere çok

aktif nörojenez alanlarında daha yüksektir (Zawerton, vd., 2019). Ektopik SOX4 ekspresyonunun farelerde oligodendrosit farklılaşmasını da engellediği gösterilmiştir, ancak altta yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Braccioli, vd., 2018) Yapılan bir diğer çalışmada; transgenik farelerde miyelin bazik protein geninin 3.1 kb 5' yan dizilerinin kontrolü altında Sox4'ü aşırı eksprese ettikleri ve doğum sonrası ilk haftalarda miyelin gen ekspresyonunun ciddi şekilde azaldığı ve merkezi sinir sisteminin birkaç bölgesinde miyelinin çarpıcı biçimde incelendiği gözlemlenmiştir. MSS miyelinasyonundaki bu bozukluklara rağmen, oligodendrositik hücrelerin sayısı değişmeden kalmıştır. Apoptoz oranlarının normal olduğu ve proliferasyonun sadece hafifçe arttığı göz önüne alındığında, oligodendrositlerin premyelinizan ve erken miyelinli duruma kadar devam etmesi muhtemeldir (Potzner, vd., 2007). Bu bilgiler doğrultusunda; çalışmamız, hsa-mir-335-5p artışı ile MS hastalarındaki miyelin kaybı arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir, ancak bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Yukardaki bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda hsa-mir-335-5p ve hsa-mir-204-5p gen ekspresyon düzeylerini saptamak için kan örneği kullanılmıştır. MS'in patofizyolojisi göz önüne alındığında çalışılan miRNA'ların dokuya özgül (T hücreleri ve beyindeki beyaz cevher) ekspresyonları farklılık gösterebilir ve daha sonraki araştırmalarda karşılaştırılabilir. MS ile hsa-miR-335 ve hsa-mir-204-5p ilişkileri, ilk kez bizim araştırmamızda çalışılmıştır ve bu bağlamda çalışmamızın özgün değeri yüksektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda MS'den sorumlu olabilecek DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 genlerini ve hsa-miR-335-5p ve hsa-miR-204-5p'nin MS ile ilişkisini araştırmayı hedefledik. MS ve sağlıklı kontrollerde DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 alellerin varlığı ve bu genleri hedefleyen hsa-miR-335-5p ve hsa-miR-204-5p'nin ekspresyon düzeyleri incelendi. Sadece HLA-DRB1*15:01 alellini taşıyan MS ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Yine sadece HLA-DQB1*06:02 geninin alelini taşıyan MS ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). MS ve kontrollerde her iki (HLA-DRB1*15:01, HLA-DQB1*06:02) aleli taşıyan bireyler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Alel analizleri yapılan HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DQB1*06:02 genlerinin MS hastalarında özellikle Avrupa ve Afro-amerika toplumlarında tanımlayıcı aleller olarak bilinmektedir. Periferik kan lökosit DNA'larından yapılan çalışmada bu aleller ile MS arasında bir ilişki bulunmamıştır. MS'de bu genlerle yapılacak çalışmalarda örnek sayısının genişletilmesi istatistiksel sonucu kuvvetlendirecektir.

Çalışmamızda MS'de ilk kez hsa-miR-335-5p ve hsa-miR-204-5p ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır ve bu durum literatüre önemli katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. MS'de hsa-miR-204-5p ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeyleri kontrol grubunun ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde anlamlı bir ilişki bulundu ($p < 0.001$). Ayrıca MS alt grupları arasında hsa-miR-335-5p ekspresyon düzeyinde anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0.05$). hsa-miR-335-5p MS ön tanısında periferik kandan kolaylıkla tespit edilebilecek biyobelirteç olabilir.

MiRNA'lar, kodlanamayan RNA'lar sınıfından olup, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar ve son yıllarda önemi gittikçe artan, birçok hastalıkta ve doğal fizyolojik süreçlerde rolleri kanıtlanmıştır. Özellikle otoimmünitedeki miRNA'ların işlevleri son birkaç yıldır ilgi konusu olmakta ve ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler çeşitli otoimmün koşulları doğurmakta ve muhtemelen hastalık gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. MS'le

miRNA'lar arasındaki ilişkinin tanımlanması, hem erken tanıyı sağlayabilecek hem de olası yeni immunolojik yolları aydınlayabilecektir.

Çalışmamız MS gelişimi açısından önemli rolleri olabilecek hsa-mir-204-5p ve hsa-mir-335-5p'nin araştırılması, ayrıca hastalığın tanı ve seyrinde miR-335'in rolü ve biyobelirteç değeri açısından gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Abelin JG, Harjanto D, Malloy M, Suri P, Colson T, Goulding SP, Creech AL, Serrano LR, Nasir G, Nasrullah Y, McGann CD. (2019). Defining HLA-II ligand processing and binding rules with mass spectrometry enhances cancer epitope prediction. *Immunity*: 15; 51(4): 766-79.
- Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, Gebhardt M, Stevanovic S, Schild H, Tolosa E, Melms A. (2013). Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nature communications*: 19;4(1):1-9.
- Agrawal SM, Yong VW. (2007). Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *International review of neurobiology*: 1;79:99-126.
- Ahlgren C, Odén A, Lycke J. (2011). High nationwide prevalence of multiple sclerosis in Sweden. *Multiple Sclerosis Journal*: 17:901-908.
- AINA S. (2002). Alastair Compston, Alasdair Coles. *The Lancet*: 359:1221-1231.
- Akdemir N, Terzi M, Arslan N, Onar M. (2017). Prevalence of multiple sclerosis in the middle black sea region of Turkey and demographic characteristics of patients. *Archives of Neuropsychiatry*: 54:11.
- Ali Ahmed E, Abd El-Basit SA, Mohamed MA, Swellam M. (2020). Clinical role of MiRNA 29a and MiRNA 335 on breast cancer management: their relevance to MMP2 protein level. *Archives of physiology and biochemistry*: 7:1-8.
- Alissa EM, Ferns GA. (2011). Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *Journal of toxicology*: 1; 2011.
- Alp R, İlhan Alp S, Planci Y, Yapici Z, Turk Boru U. (2012). The Prevalence of Multiple Sclerosis in the North Caucasus Region of Turkey: Door-to-Door Epidemiological Field Study. *Archives of Neuropsychiatry/Noropsikiatri Arsivi* 49 no: 4.
- Alvarenga MP, do Carmo LF, Vasconcelos CC, Alvarenga MP, Alvarenga-Filho H, de Melo Bento CA, Paiva CL, Leyva-Fernández L, Fernández Ó, Papais-Alvarenga RM. (2021). Neuromyelitis optica is an HLA associated disease different from Multiple Sclerosis: a systematic review with meta-analysis. *Scientific Reports*: 8;11(1):1-4.
- Amato MP, Derfuss T, Hemmer B, Liblau R, Montalban X, Soelberg Sørensen P, Miller DH, Group EFW. (2018). Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop. *Multiple Sclerosis Journal*: 24:590-603.
- Baranzini SE, Oksenberg JR. (2017). The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. *Trends in genetics*: 1;33(12):960-70.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*: 116:281-297.

- Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U. (1972). HLA antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens*: 2:405–408.
- Birnbaum G. (2009). The patterns and pathophysiology of MS. In *Multiple sclerosis: Clinician's guide to diagnosis and treatment*. Oxford University Press, New York, NY. 15-18.
- Bodmer W. (1972). Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature*: 237:139-145.
- Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. (2003). Thymic selection does not limit the individual MHC diversity. *European journal of immunology*: 33:3353-3358.
- Braccioli L, Vervoort SJ, Puma G, Nijboer CH, Coffe PJ. (2018). SOX4 inhibits oligodendrocyte differentiation of embryonic neural stem cells in vitro by inducing Hes5 expression. *Stem cell research*: 1;33:110-9.
- Bradley WG. (2004). *Neurology in clinical practice: principles of diagnosis and management*: Taylor & Francis.
- Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM JJ. (2008). *Neurology in clinical practice*. Fifth edition: 1159-87.
- Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, Muche R, Richards G, Lehmsiek V, Ludolph AC, Otto M. (2009). IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PloS one*: 4:e7638.
- Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, Fang L, Kassubek J, Pinkhardt E, Lauda F, Kapfer T, Jesse S, Lehmsiek V. (2010). The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PloS one*: 5:e11986.
- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ. (2014). Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*: 83:1022-1024.
- Čierny D, Lehotský J, Kantorová E, Sivák Š, Javor J, Kurča E, Dobrota D, Michalik J. (2018). The HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles are associated with multiple sclerosis disability progression in Slovak population. *Neurological research*: 40:609-616.
- Clark P, Chitnis N, Shieh M, Kamoun M, Johnson F, Monos D. (2018). Novel and haplotype specific microRNAs encoded by the major histocompatibility complex. *Scientific reports*: 8:1-10.
- Compston A. (1988). The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*: 51:1249-1252.
- Compston DA. (1998). Genetic epidemiology. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 3rd edn. Compston DAS, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H (eds).

- Churchill Livingstone: London, Edinburgh, New York, Philadelphia, Sydney, Toronto. 45-142.
- Compston A, Coles A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet*: 359, 1221–1231.
- Compston A, Coles A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*: 372:1502-1517.
- Compston A, Winedl H, Kieseier B. 2008. Coles. Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517.
- Conlon P, Oksenberg JR, Zhang J, Steinman L. (1999). The immunobiology of multiple sclerosis: an autoimmune disease of the central nervous system. *Neurobiology of disease*: 6:149-166.
- Conte I, Hadfield KD, Barbato S, Carrella S, Pizzo M, Bhat RS, Carissimo A, Karali M, Porter LF, Urquhart J, Hateley S. (2015). MiR-204 is responsible for inherited retinal dystrophy associated with ocular coloboma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 23;112(25):E3236-45.
- Correale J, Gaitan M. (2015). Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein–Barr virus infection. *Acta Neurologica Scandinavica*: 132:46-55.
- Cotsapas C, Mitrovic M. (2018). Genome-wide association studies of Multiple Sclerosis. *Clinical & translational immunology*: 7(6): e1018.
- Critcher R, Stitson RN, Wade-Martins R, Easty DJ, Farr CJ. (1998). Assignment of Sox4 to mouse chromosomes 13 bands A3-A5 by fluorescence in situ hybridization; refinement of the human SOX4 location to 6p22.3 and of SOX20... *Cytogenetic and Genome Research*: 81(3/4): 294.
- Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, De Courten M, Matsoukas J, Apostolopoulos V. (2017). Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain sciences*: 7(7): 78.
- Dawson, James W. (1916). "XVIII. The histology of disseminated sclerosis." *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*: 50.3: 517-740.
- De Jager PL, Jia X, Wang J, De Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R. (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*: 41(7):776-82.
- De Luna N, Turon-Sans J, Cortes-Vicente E, Carrasco-Rozas A, Illán-Gala I, Dols-Icardo O, Clarimón J, Lleó A, Gallardo E, Illa I, Rojas-García R. (2020). Downregulation of miR-335-5P in amyotrophic lateral sclerosis can contribute to neuronal mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Scientific reports*: 9; 10(1):1-2.
- Didenko VV. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*: 31:1106-1121.

- Dönmez B, Özakbas S, Öktem MA, Gedizlioglu M, Coker I, Genc A, Idiman E. (2004). HLA genotypes in Turkish patients with myasthenia gravis: comparison with multiple sclerosis patients on the basis of clinical subtypes and demographic features. *Human immunology*: 65:752-757.
- Elhami SR., Mohammad K., Sahraian M.A., Eftekhari H. (2011). A 20-Year Incidence Trend (1989-2008) and Point Prevalence (March 20, 2009) of Multiple Sclerosis in Tehran, Iran: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*: 36, 141-147.
- Efendi H. Multipl Skleroz Tani Ve Tedavi Kilavuzu. https://www.noroloji.org.tr/TNDDData/Uploads/files/MS_tan%C4%B1%20ve%20tedavi%202018.pdf. (15.03.2021).
- Eskandari S, Heydarpour P, Minagar A, Pourmand S, Sahraian MA. (2016). Multiple sclerosis epidemiology in east Asia, south east Asia and south Asia: a systematic review. *Neuroepidemiology*: 46:209-221.
- Farh KK-H, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, Shores N, Whitton H, Ryan RJ, Shishkin AA. (2015). Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*: 518:337-343.
- Farr CJ, Easty DJ, Ragoussis J, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1993). Characterization and mapping of the human SOX4 gene. *Mammalian Genome*: 4(10):577-84
- Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F, Mellesi L. (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4⁺ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience letters*: 504:9-12.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*: 132:1175-1189.
- Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, Nakajima H, Elisseeva OA, Harada Y, Li Z, Tatsumi N, Kamino E, Shirakata T. (2008). A WT1 protein- derived, naturally processed 16- mer peptide, WT1332, is a promiscuous helper peptide for induction of WT1- specific Th1- type CD4⁺ T cells. *Microbiology and immunology*: 52(12):591-600.
- Gajofatto, A. and Benedetti, M.D. (2015). Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World journal of clinical cases*: 3(7): 545-555.
- Galloway DA, Moore CS. (2016). miRNAs as emerging regulators of oligodendrocyte development and differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*: 17;4:59.

- Galperin M, Farenc C, Mukhopadhyay M, Jayasinghe D, Decroos A, Benati D, Tan LL, Ciacchi L, Reid HH, Rossjohn J, Chakrabarti LA. (2018). CD4⁺ T cell-mediated HLA class II cross-restriction in HIV controllers. *Science immunology*: 8;3(24).
- Garg N, Smith TW. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and behavior*: 5:e00362.
- Goodin DS. (2014). The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Handbook of clinical neurology*: 122:231-266.
- Goüy de Bellocq J, Charbonnel N, Morand S. (2008). Coevolutionary relationship between helminth diversity and MHC class II polymorphism in rodents. *Journal of evolutionary biology*: 21:1144-1150.
- Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, Andersson M, Olsson T, Mather IH, Linington C. (2004). Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*: 172:661-668.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. (2005). Multiple sclerosis. *Immunological Reviews*: 204: 208–31.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England Journal of Medicine*: 357, 851.
- Harirchian, M. H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N. M. & Bitarafan, S. (2017). Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: a systematic review and metaanalysis. *Mult. Scler. Relat. Disord*: 20, 43–47.
- Han FX, Banin A, Su Y, Monts DL, Plodinec JM, Kingery WL, Triplett GE. (2002). Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften*: 89:497-504.
- Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. (2011). Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*: 1; 134(3): 653-64.
- Hedström AK, Bomfim IL, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*: 11; 82(10): 865-72.
- Hernan MA, Hohol MJ, Olek MJ, Spiegelman D, Ascherio A. (2000). Oral contraceptives and the incidence of multiple sclerosis. *Neurology*: 55(6):848-54.
- Houzen H, Niino M, Hata D, Nakano F, Kikuchi S, Fukazawa T, Sasaki H. (2008). Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in northern Japan. *Multiple Sclerosis Journal*: 14(7):887-92.

- Houzen H, Kondo K, Horiuchi K, Niino M. (2018). Consistent increase in the prevalence and female ratio of multiple sclerosis over 15 years in northern Japan. *European journal of neurology*: 25:334-339.
- Hu JM, Sun Q, Li L, Liu CX, Chen YZ, Zou H, Pang LJ, Zhao J, Yang L, Cao YW. (2014). Human leukocyte antigen-DRB1* 1501 and DQB1* 0602 alleles are cervical cancer protective factors among Uighur and Han people in Xinjiang, China. *International journal of clinical and experimental pathology*: 7:6165.
- Inglese, M. and Petracca, M. (2015). Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophr Res*: 161(1): 94-101
- Jacobi C, Hähnel S, Martinez- Torres F, Rieger S, Jüttler E, Heiland S, Jarius S, Meyding-Lamadè U, Storch- Hagenlocher B, Wildemann B. (2008). Prospective combined brain and spinal cord MRI in clinically isolated syndromes and possible early multiple sclerosis: impact on dissemination in space and time. *European journal of neurology*: 15:1359-1364.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*: 7:60.
- James, L. M., & Georgopoulos, A. P. (2019). The human leukocyte antigen (HLA) DRB1* 13: 02 allele protects against dementia in Continental Western Europe. *Journal of Neurology & Neuromedicine*: 4(5).
- Jiang W, Peng A, Chen Y, Pang B, Zhang Z. (2020). Long non-coding RNA EBLN3P promotes the recovery of the function of impaired spiral ganglion neurons by competitively binding to miR-204-5p and regulating TMPRSS3 expression. *International journal of molecular medicine*: 1;45(6):1851-63.
- Kaalund SS, Venø MT, Bak M, Møller RS, Laursen H, Madsen F, Broholm H, Quistorff B, Uldall P, Tommerup N. (2014). Aberrant expression of miR- 218 and miR- 204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis—Convergence on axonal guidance. *Epilepsia*: 55:2017-2027.
- Kappos L, Polman C, Freedman M, Edan G, Hartung H, Miller D, Montalban X, Barkhof F, Bauer L, Jakobs P. (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*: 67:1242-1249.
- Kappos L, Traboulsee A, Constantinescu C, Erälinna J-P, Forrestal F, Jongen P, Pollard J, Sandberg-Wollheim M, Sindic C, Stubinski B. (2006). Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS. *Neurology*: 67:944-953.

- Karakükçü M. (2016). "Transplantasyon İmmünolojisi Kimerizm". 5 Ulusal Pediatrik Hematoloji-Onkoloji sempozyumu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Karussis D. (2014). The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *Journal of autoimmunity*: 48:134-142.
- Khan ANH, Gregorie CJ, Tomasi TB. (2008). Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*: 57:647-654.
- Kim A, Hartman IZ, Poore B, Boronina T, Cole RN, Song N, Ciudad MT, Caspi RR, Jaraquemada D, Sadegh-Nasseri S. (2014). Divergent paths for the selection of immunodominant epitopes from distinct antigenic sources. *Nature communications*: 21;5(1):1-6.
- Koutsouraki E, Costa V, Baloyannis S. (2010). Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. *International review of psychiatry*: 1;22(1):2-13.
- Lassmann H. (2013). Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*: 333:1-4.
- Lauer K. 1997. Diet and multiple sclerosis. *Neurology* 49:S55-S61.
- Li Y, Peng A, Ge S, Wang Q, Liu J. (2014). miR-204 suppresses cochlear spiral ganglion neuron survival in vitro by targeting TMPRSS3. *Hearing research*: 1;314:60-4.
- Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymment DA, Tiislar M, Ferretti V, Tienari PJ, Sadovnick AD, Peltonen L, Ebers GC. (2005). A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nature genetics*: 37(10):1108-12.
- Liu Z, Long J, Du R, Ge C, Guo K, Xu Y. (2016). miR-204 regulates the EMT by targeting snai1 to suppress the invasion and migration of gastric cancer. *Tumour Biol*: 37 (6): 8327–35.
- Logan J, Edwards K. (2004). An overview of real-time PCR platforms. *Real-time PCR an essential guide*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom: 13-29.
- Lublin FD, Reingold SC. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*: 46:907-911.
- Lynch J, Meehan MH, Crean J, Copeland J, Stallings RL, Bray IM. (2013). Metastasis suppressor microRNA-335 targets the formin family of actin nucleators. *PloS one*: 5;8(11):e78428.
- Ma X, Zhou J, Zhong Y, Jiang L, Mu P, Li Y, Singh N, Nagarkatti M, Nagarkatti P. (2014). Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis. *International journal of medical sciences*: 11:810.
- Maito S, Manerow N, Mickey MR, Terasaki PI. (1972). Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens*: 2:1–4.

- Malosse D, Perron H, Sasco A, Seigneurin J. (1992). Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study. *Neuroepidemiology*: 11:304-312.
- Manna I, Iaccino E, Dattilo V, Barone S, Vecchio E, Mimmi S, Filippelli E, Demonte G, Polidoro S, Granata A. (2018). Exosome- associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients. *The FASEB Journal*: 32:4241-4246.
- McAlpine D, Compston A. (2005). *McAlpine's multiple sclerosis*: Elsevier Health Sciences.
- Migalska M, Sebastian A, Radwan J. (2019). Major histocompatibility complex class I diversity limits the repertoire of T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 116:5021-5026.
- Miller A, Lublin F, Coyle P. (2003). *Epidemiology and genetics. Multiple Sclerosis in Clinical Practise*. London-New York. Martin Dunitz Publishing: 31-53.
- Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *The Lancet Neurology*: 4:281-288.
- Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. (2012). Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology*: 11:157-169.
- Miyazaki Y, Niino M. (2015). Epigenetics in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*: 6:49-58.
- Mokry LE, Ross S, Ahmad OS, Forgetta V, Smith GD, Leong A, Greenwood CM, Thanassoulis G, Richards JB. (2015). Vitamin D and risk of multiple sclerosis: a Mendelian randomization study. *PLoS medicine*: 12(8):e1001866.
- Momany SM, Al-Qatarneh TA, Khader YS, Abu-Harfeil NM, Daoud AK, Mahasneh AA. (2017). The association of HLA-DQB1* 0602 but not HLA-DRB1* 15 with obstructive sleep apnea. *Clinical and Investigative Medicine*: E167-E175.
- Moore F. (2009). Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*: 73(20):1714-.
- Muehling LM, Mai DT, Kwok WW, Heymann PW, Pomés A, Woodfolk JA. (2016). Circulating memory CD4+ T cells target conserved epitopes of rhinovirus capsid proteins and respond rapidly to experimental infection in humans. *The Journal of Immunology*: 197(8):3214-24.
- Mullah B, Andrus A. (1997). Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports. *Tetrahedron Letters*: 38:5751-5754.

- Munger KL, Bentzen J, Laursen B, Stenager E, Koch-Henriksen N, Sørensen TI, Baker JL. (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Multiple Sclerosis Journal*: 19:1323-1329.
- Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. (2009). Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*: 73:1543-1550.
- Murdocca M, Ciafrè SA, Spitalieri P, Talarico RV, Sanchez M, Novelli G, Sangiuolo F. (2016). SMA human iPSC-derived motor neurons show perturbed differentiation and reduced miR-335-5p expression. *International journal of molecular sciences*: 17(8):1231.
- Nielsen BR, Ratzer R, Börnsen L, von Essen MR, Christensen JR, Sellebjerg F. (2017). Characterization of naïve, memory and effector T cells in progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*: 310:17-25.
- Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L. (2004). Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *The American Journal of Human Genetics*: 74:160-167.
- Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. (2008). The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nature Reviews Genetics*: 9(7):516-26.
- Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*: 13:25.
- Papathanasopoulos P, Gourzoulidou E, Messinis L, Georgiou V, Leotsinidis M. (2008). Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology*: 30(3):167-73.
- Piehl FM. (2018). F Preziosa P Solari A Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*: 4:43-.
- Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. (2010). Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis?. *Brain*: 133(7):1869-88.
- Potzner MR, Griffel C, Lütjen-Drecoll E, Bösl MR, Wegner M, Sock E. (2007). Prolonged Sox4 expression in oligodendrocytes interferes with normal myelination in the central nervous system. *Molecular and cellular biology*: 27(15):5316.
- Ramagopalan SV, Dymment DA, Ebers GC. (2008). Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends in neurosciences*. 31(12):645-52.
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP. (2001). Immunopathology of secondary- progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*: 50:646-657.

- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. (1933). Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *The Journal of experimental medicine*: 58.1: 39.
- Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. (2006). Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *The Lancet Neurology*: 5:343-354.
- Sadovnick AD, Baird PA. (1988). The familial nature of multiple sclerosis: age- corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology*: 38:990-990.
- Sarıdaş F. (2018). Multiple skleroz gelişimi ile ilişkili miRNA'ların araştırılması.
- Saruhan-Direskeneli G, Esin S, Baykan-Kurt B, Örnek İ, Vaughan R, Eraksoy M. (1997). HLA-DR and-DQ associations with multiple sclerosis in Turkey. *Human immunology*: 55:59-65.
- Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*: 13:700-709.
- Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed research international* 2014.
- Skleroz M. Tani Ve Tedavi Kilavuzu (2016).
- Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. (1998). Crystal structure of HLA-DR2 (DRA* 0101, DRB1* 1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *The Journal of experimental medicine*: 19;188(8):1511-20.
- Spurgin LG, Richardson DS. (2010). How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*: 277:979-988.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*: 368(6468):215-21.
- Sundqvist E, Sundström P, Linden M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T. (2012). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes & Immunity*: 13(1):14-20.
- Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, Perera RJ. (2004). Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic acids research*: 1;32(22):e188.
- Sun Y, Yu X, Bai Q. (2015). miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*: 8 (10): 12775–83.

- Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*: 451(7175):147-52.
- Terzi M, Birinci A, Cetinkaya E, Onar M. (2007). Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*: 115:325-330.
- Tillery EE, Clements JN, Howard Z. (2017). What's new in multiple sclerosis? The mental health clinician: 7(5): 213-220.
- Tintore M, Rovira A, Arrambide G, Mitjana R, Rio J, Auger C, Nos C, Edo M, Castillo J, Horga A. (2010). Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology* 75:1933-1938.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*: 338:278-285.
- Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI, Khalil IA, Krohn KJ, Liang X, Naghavi M. (2019). Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*: 18:269-285.
- Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*: 26:1816-1821.
- Wang X, Li J, Wu D, Bu X, Qiao Y. (2016). Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxia-inducible factor-1 α -microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway. *Experimental Biology and Medicine*: 241(2):177-83.
- Wen Z, Dai Y, Shuang HE. (2015). The identification of human microRNA335' s predicated target gene CCL1 1, CCL26 and SOX4. *Chongqing Medicine*: 1(24):3316-8.
- Willer C, Dymant D, Risch N, Sadovnick A, Ebers G, Group CCS. (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 100:12877-12882.
- Wittstatt J, Weider M, Wegner M, Reiprich S. (2020). MicroRNA miR-204 regulates proliferation and differentiation of oligodendroglia in culture. *Glia*: 68(10):2015-27.
- Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, Ouyang H, Li H, Wang G, Wu Q, Wei C, Bi Y. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*: 152:82-96.
- Zagon IS, McLaughlin PJ. (2017). Multiple sclerosis: perspectives in treatment and pathogenesis: Codon Publications.
- Zawerton A, Yao B, Yeager JP, Pippucci T, Haseeb A, Smith JD, Wischmann L, Kühl SJ, Dean JC, Pilz DT, Holder SE. (2019). De novo SOX4 variants cause a

neurodevelopmental disease associated with mild dysmorphism. *The American Journal of Human Genetics*: 104(2):246-59.

Zhang L, Wang X, Chen P. (2013). MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *BMC Cancer*: 13: 290.

Zhang B, Yin Y, Hu Y, Zhang J, Bian Z, Song M, Hua D, Huang Z. (2015). MicroRNA-204-5p inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating USP47 and RAB22A. *Med Oncol*: 32 (1): 331.

EKLER

Ek 1.Etik Kurul Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

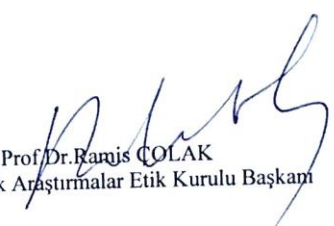
Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1662-562

08 .07.2018

Sayın Prof. Dr. Murat TERZİ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Multipl Skleroz Patogenezin Farklı Basamaklarında HLA-DQB1 Ve HLA-DRB1 Gen Transkriptlerini Hedefleyen Mikro-RNA'larının Araştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2018/258 Karar nolu Genetik çalışma+ Biyokimya çalışması / nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 25.05.2018 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Ramis COLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ek-2. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

Multipl Skleroz (MS) Patogenezin Farklı Basamaklarında HLA-DQB1 Ve HLA-DPB1 Gen Transkriptlerini Hedefleyen Mikrorna'larının İncelenmesi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar vererseniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? (Açıklayınız)

Merkezi sinir sisteminin otoimmün ve enflamasyonlu nörodejeneratif bir hastalığı olan Multipl skleroz'un patofizyolojik mekanizmaları tam anlamıyla aydınlatılmış değildir. Yapılan bazı çalışmalar MikroRNA'ların düzeyindeki epigenetik modifikasyonlar MS için risk oluşturabileceği ile ilgili bazı kanıtlar ortaya koymaktadır. Bu çalışmada

Ek-2

MikroRNA'ların MS tanısında biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini ve tedavi için yeni terapötik hedeflerin ortaya koymak amacıyla

Hastalığın seyirinin farklı basamaklarında HLA-DQB1 Ve HLA-DPB1 gen transkriptlerini hedefleyen Mikrona'larının incelenmesi hedeflenmiştir.

CALISMA İŞLEMLERİ:

Araştırma için bir kez damardan 10 ml kan örneği alınacaktır. Moleküler genetik tanı testi uygulanacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Anketi okuyup uygun şekilde doldurmanız yeterlidir.

CALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Yapılacak olan çalışmanın size ve sağlığınıza herhangi bir zararı bulunmamaktadır

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Eğer denek / hasta doğurganlık döneminde / emziren bir kadın ise.....

Eğer gebelik veya emzirme gibi bir durumunuz söz konusu ise dahi yapılacak olan işlemin herhangi bir olumsuz etkisi yoktur.

CALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

Bu çalışmaya katılmanız MikroRNA'ların MS tanısında biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılmadığı ve tedavi için yeni terapötik hedeflerin ortaya koymak için yardımcı olacaktır.

Ek-2

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğimin veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilceğimin bilincindeyim.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Araştırmaya katılmanız nedeniyle size para ödenmeyecek yada sizden para talep edilmeyecektir.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Çalışmanın yürütülmesi ve yayınlanması aşaması dâhil, hiçbir aşamada sizin isminiz ve kişisel bilgileriniz kullanılmayacaktır.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, çalışma verilerinizi artık kullanılmayacak ya da diğer kişilerle paylaşılmayacaktır. Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Ad, soyad ve telefon numaraları

Nafiseh NESBAT MOHAMMADI

Tel: xxx xxx xx xx

Ek-2

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:(Varsa açıklayınız)

Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışmadan çıkmak istemeniz halinde ayrılabilirsiniz. Bu tedavi kurumunda göreceğiniz bakım ve tedaviler etkilenmeyecek, herhangi bir aksama olmayacaktır.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih