

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERFERON-GAMA, HSA-MIR-24-3P VE HSA-MIR-181D-3P PLAZMA
EKSPRESYON SEVİYELERİ VE *IFNG* rs2069727 T/C TEK NÜKLEOTİT
POLİMORFİZMİNİN MS RİSKİ VE GLATİRAMER ASETAT TEDAVİSİ
KAPSAMINDA KLİNİK VE *IN SILICO* YAKLAŞIMLARLA İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mekselina KALMAZ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

AĞUSTOS 2024

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNTERFERON-GAMA, HSA-MIR-24-3P VE HSA-MIR-181D-3P PLAZMA
EKSPRESYON SEVİYELERİ VE *IFNG* rs2069727 T/C TEK NÜKLEOTİT
POLİMORFİZMİNİN MS RİSKİ VE GLATİRAMER ASETAT TEDAVİSİ
KAPSAMINDA KLİNİK VE *IN SILICO* YAKLAŞIMLARLA İNCELENMESİ

Mekselina KALMAZ

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Tarih: Ağustos 2024

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik otoimmün bir hastalıdır. En sık görülen klinik tipi tekrarlayan-düzelen MS'tir (relapsing-remitting MS, RRMS). İnterferon-gama (IFN-gamma), MS'te görülen enflamatuvar yolda önemli rollere sahiptir. *IFNG* genindeki varyasyonlar ve bazı mikroRNA'lar (miRNA) IFN-gama ifadesini etkilemektedir. *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonunun MS ile ilişkisi Türk toplumunda ilk kez bu çalışma ile araştırılmıştır. Ayrıca çalışmamızda, plazmadaki IFN-gama seviyeleri ile bu seviyeyi etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, MS riskine ve engellilik puanlarına etkileri yönünden incelenmiştir. IFN-gama protein seviyesi ve bu seviyeyi etkilediği düşünülen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri RRMS tanısı ve glatiramer asetat (GA) tedavi yanıtı açısından ilk kez birlikte değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, “genetik polimorfizm” ve “miRNA ve ELISA” çalışma grupları olmak üzere iki çakışan grup, 2017 McDonald Revize Kriterleri'ne göre oluşturulmuştur. Genetik polimorfizm grubu için 330 RRMS hastası ve 330 kontrol dâhil edilmiştir. Bu

grubun içerisinde ilaç tedavisine başlanmamış (treatment-naïve, naif) 25 RRMS hastası, GA tedavisi alan 25 RRMS hastası ve 25 kontrol, miRNA ve ELISA çalışması bölümüne dâhil edilmiştir. Genetik polimorfizm çalışma grubundaki MS hastalarının genotiplmeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. miRNA ve ELISA çalışma grubu katılımcılarının plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ile; plazma IFN-gama seviyesi ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Örnekler Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nden alınmıştır.

IFNG rs2069727 T/C varyasyonu gruplar arasında incelenmiş ve genotip dağılımları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Plazma rölatif ekspresyon analizinde, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinin GA ve naif hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu; yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyelerinin ise GA ve naif hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, tüm grupta yapılan analizde, düşük IFN-gama seviyesine (≤ 1.311 pg/mL) sahip bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin yüksek IFN-gama (> 1.311 pg/mL) grubunda bulunan bireylerinkinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu; düşük hsa-miR-181d-3p seviyesine (≤ 2.90) sahip bireylerin plazma IFN-gama seviyelerinin yüksek hsa-miR-181d-3p seviyesine (> 2.90) sahip bireylerinkinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, *IFNG* genini düzenleyen miRNA'lar ve transkripsiyon faktörlerin ağı *in silico* analizlerle oluşturulmuştur. Dahası, hsa-miR-24-3p ile, GA tedavisiyle ilişkilendirilen genler içerisinde C-tipi lektin alan ailesi 16 A üyesi ve katapsin S arasında bir etkileşim bulunmuştur. Bu tez, ileride yeni biyosensörlerde kullanılabilecek yeni potansiyel tanı testlerinin geliştirilmesi, bu sayede RRMS'in erken teşhisi ve prognoz takibinin daha kolay bir şekilde yapılabilmesi ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'yi RRMS tedavisi için ilaç hedefi olarak değerlendiren yeni çalışmaların gerçekleştirilmesi açısından Biyomedikal Mühendisliği alanına önemli katkılar sunan bir çalışma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl skleroz, Tek nükleotit polimorfizmi, İnterferon-gama, mikroRNA, Biyobelirteç.

ABSTRACT

Master of Science

INVESTIGATION OF INTERFERON-GAMMA, HSA-MIR-24-3P, AND HSA-MIR-181D-3P PLASMA EXPRESSION LEVELS AND *IFNG* rs2069727 T/C SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM WITH CLINICAL AND *IN SILICO* APPROACHES IN THE SCOPE OF MS RISK AND GLATIRAMER ACETATE TREATMENT

Mekselina KALMAZ

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Date: August 2024

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune chronic disease of the central nervous system (CNS). The most common clinical type is relapsing-remitting MS (RRMS). Interferon-gamma (IFN-gamma) has important roles in the inflammatory pathway observed in MS. Variations in the *IFNG* gene and some microRNAs (miRNAs) affect the expression of IFN-gamma. The *IFNG* rs2069727 T/C variation with MS was investigated for the first time in the Turkish population in this study. Moreover, in our study, the plasma IFN-gamma levels, the *IFNG* rs2069727 T/C variation thought to affect these levels, and the relative expression levels of hsa-miR-24-3p and hsa-miR-181d-3p were examined for their effects on MS risk and disability scores. The IFN-gamma protein level and the relative expression levels of hsa-miR-24-3p and hsa-miR-181d-3p, which are thought to influence this level, were evaluated together for the first time in terms of RRMS diagnosis and response to glatiramer acetate (GA) treatment.

In this study, two overlapping groups, the "genetic polymorphism study group" and the "miRNA and ELISA study group", were formed according to the 2017 McDonald Revised Criteria. The genetic polymorphism group included 330 RRMS patients and 330 controls. This group included 25 RRMS patients who had not started GA treatment (treatment-naïve), 25 RRMS patients who received GA treatment, and 25 controls in the miRNA and ELISA study section. Genotyping of MS patients in the genetic polymorphism study group was performed by real-time polymerase chain reaction. Plasma hsa-miR-24-3p and hsa-miR-181d-3p relative expression levels in the miRNA and ELISA study group participants were determined by quantitative real-time PCR, and plasma IFN-gamma levels were determined by ELISA method. Samples were taken from Ankara Bilkent City Hospital Neurology Polyclinic.

The *IFNG* rs2069727 T/C variation was analyzed among the groups, and no significant differences were observed in genotype distributions. Plasma relative expression analysis revealed that hsa-miR-24-3p and hsa-miR-181d-3p levels were significantly higher in GA and treatment-naïve patients compared to the control group; whereas age-adjusted plasma IFN-gamma levels were significantly lower in GA and treatment-naïve patients compared to controls. In the overall group analysis, individuals with low IFN-gamma levels (≤ 1.311 pg/mL) had significantly higher hsa-miR-24-3p relative expression levels compared to those in the high IFN-gamma group (> 1.311 pg/mL). Additionally, individuals with low hsa-miR-181d-3p levels (≤ 2.90) had significantly higher plasma IFN-gamma levels compared to those with high hsa-miR-181d-3p levels (> 2.90). In this study, the network of miRNAs and transcription factors regulating the *IFNG* gene was created by *in silico* analysis. Furthermore, an interaction has been identified between hsa-miR-24-3p and genes associated with GA therapy, specifically within the C-type lectin domain family 16 member A and cathepsin S. This thesis is a study that makes significant contributions to the field of Biomedical Engineering by developing new potential diagnostic tests, which may be used in novel biosensors in the future, thereby facilitating the easier early diagnosis and prognosis monitoring of RRMS, and by conducting new studies that evaluate hsa-miR-24-3p and hsa-miR-181d-3p as drug targets for the treatment of RRMS.

Keywords: Multiple sclerosis, Single nucleotide polymorphism, Interferon-gamma, microRNA, Biomarker.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, ekibine katılma fırsatı vererek ve çalışmalarımız boyunca rehberliği ile tecrübesini paylaşarak akademik gelişime büyük katkılar sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Birsen Can Demirdöğen'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca çok kıymetli bilgi ve tecrübelerini en güzel şekilde sunan değerli TOBB ETÜ Biyomedikal Mühendisliği öğretim üyelerine şükranlarımı sunarım. Bu tez çalışmasında kullanılan tüm örneklerin ve katılımcıların çalışmaya dâhil olmasına yardımcı olan başta Prof. Dr. Semra Mungan Öztürk olmak üzere Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'ne teşekkür ederim.

Tez jüri üyelerim saygıdeğer Prof. Dr. Fatih Büyükserin'e ve Prof. Dr. Özlem Yıldırım'a kıymetli rehberlikleri ve önerileri için şükranlarımı sunarım.

Hep yanımda olan sevgili büyüğüm Canan Koçan olmak üzere değerli arkadaşlarım Ata Ayhan Yılmaz, Buse Aydın'a destekleri ve dostlukları için sevgi ve şükranlarımı sunuyorum. Lisans son sınıfta ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, adeta bir abi gibi destek olan değerli Osman Oğuzhan Kılıç'a en derin sevgi ve şükranlarımı sunuyorum. Bana desteğini esirgemeyen Ece Bayrak'a sevgi ve şükranlarımı sunuyorum. Yüksek lisans eğitimim boyunca daima yanımda olup bana destek olan, sevgilerini ve dostluklarını yanımda hissettiren kıymetli arkadaşlarım Ahmet Ersin Meydan ve Maral Karahan'a gönülden sevgi ve şükranlarımı sunuyorum. Eğitim hayatım boyunca her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim aile büyüklerim annem Gül Kalmaz'a, babam Yusuf Kalmaz'a ve kardeşlerim Almila Kalmaz, Tuğsem Kalmaz'a ve sevgisiyle ve desteğiyle yanımda olan Cihan Coşkun'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1002 (121S345) araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
KISALTMALAR	xxi
SEMBOL LİSTESİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1 Multipl Skleroz	1
1.1.1 Tarihçe.....	6
1.1.2 Epidemiyoloji.....	7
1.1.3 Patofizyoloji	8
1.1.4 Etiyoloji.....	11
1.1.5 MS'in klinik alt tipleri.....	14
1.1.5.1 Klinik izole sendrom	15
1.1.5.2 Relapsing-remitting MS	15
1.1.5.3 Primer-progresif MS (PPMS)	16
1.1.5.4 Sekonder-progresif MS (SPMS)	16
1.1.6 Tanı kriterleri	17
1.1.7 MS tedavisi	18
1.1.7.1 Akut atak tedavisi.....	18
1.1.7.2 Hastalığı modifiye eden tedaviler	19
1.1.8 Moleküler biyobelirteçler.....	22
1.1.8.1 MS'teki biyobelirteç türleri	23
1.2 IFN-gama	26
1.2.1 IFN-gama'nın yapısı	26
1.2.2 IFN-gama'nın fonksiyonu.....	27
1.2.3 IFN-gama ve MS patogenezi	27

1.2.4	IFN-gama'nın GA ile ilişkisi.....	29
1.2.5	Genetik polimorfizm, <i>IFNG</i> geni ve SNP'ler	30
1.2.5.1	<i>IFNG</i> rs2069727 T/C	32
1.3	miRNA'lar.....	33
1.3.1	miRNA biyogenezi.....	35
1.3.2	miRNA'ların MS ile ilişkisi	36
1.3.3	hsa-miR-24-3p.....	38
1.3.3.1	hsa-miR-24-3p ve <i>IFNG</i>	41
1.3.4	hsa-miR-181d-3p.....	42
1.3.4.1	hsa-miR-181d-3p ve <i>IFNG</i>	44
1.4	Çalışmanın Amacı	44
2.	MATERYALLER VE METOTLAR.....	47
2.1.	Materyaller	47
2.1.1.	Çalışma grupları ve popülasyonlar.....	47
2.1.2.	Numune toplanması	49
2.1.2.1.	Genetik polimorfizm çalışması için tam kan örneklerinin toplanması	49
2.1.2.2.	Plazmada bulunan miRNA ve IFN-gama seviyelerinin tespiti çalışması için tam kan örneklerinin toplanması	49
2.1.3.	Kullanılan malzemeler	50
2.1.4.	Kullanılan cihazlar	50
2.1.5.	Kullanılan primerler	50
2.1.5.1.	Genotipleme çalışmalarında kullanılan primerler	50
2.1.5.2.	Plazma mikroRNA ekspresyon seviyesi belirlemede kullanılan primerler.....	51
2.2.	Metotlar	51
2.2.1.	DNA izolasyonu.....	51
2.2.2.	<i>IFNG</i> rs2069727 T/C tek nükleotit polimorfizminin genotipleme çalışması	53
2.2.3.	Plazmada mikroRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler	56
2.2.3.1.	Plazma izolasyonu.....	56
2.2.3.2.	Total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi	57

2.2.4. Ters transkriptaz PCR metodu ile cDNA sentezi.....	59
2.2.5. qRT-PCR ile hsa-miR24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin rölatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	60
2.2.6. ELISA ile IFN-gama plazma protein seviyesinin belirlenmesi	64
2.2.7. İstatistiksel ve <i>in silico</i> analizler	67
3. BULGULAR.....	71
3.1. RRMS Hastalarının ve Sağlıklı Kontrollerin Çalışmaya Dâhil Edilmesi	71
3.1.1. Genetik polimorfizm çalışma grubu	71
3.1.2. miRNA ve ELISA çalışma grubu	73
3.2. <i>IFNG</i> rs2069727 T/C Tek Nükleotit Polimorfizminin Genotip ve Alel Frekansları	74
3.3. Plazma Rölatif miRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri	77
3.3.1 Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesinin belirlenmesi	77
3.3.2. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi için ROC analizleri .	78
3.3.3. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi için hata matrisi analizleri.....	79
3.3.3.1. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi.....	80
3.3.3.2. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi.....	81
3.3.4. Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesinin belirlenmesi	82
3.3.5. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için ROC analizleri	82
3.3.6. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için hata matrisi analizleri	84
3.3.6.1. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi	84
3.4. Plazma miRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Gruplar Arasında EDSS ve MSSS Ölçütlerine ve rs2069727 T/C SNP'sine göre Karşılaştırma Analizleri	86
3.4.1. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi	86
3.4.2. Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi	87
3.4.3 Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi	89

3.4.4 Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi	90
3.5. Plazmada IFN-gama Seviyesinin Belirlenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri	92
3.5.1. Plazmada IFN-gama seviyesinin belirlenmesi	92
3.5.2. Plazmada IFN-gama seviyesi için ROC analizleri	93
3.5.3. Plazmada IFN-gama seviyesi için hata matrisi analizleri	95
3.5.3.1. Plazmada IFN-gama seviyesi için GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi	95
3.5.3.2. Plazmada IFN-gama seviyesi için naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi	96
3.6. Plazma IFN-gama Seviyesinin Gruplar Arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine ve rs2069727 T/C SNP'sine göre Karşılaştırma Analizleri	97
3.6.1. Plazma IFN-gama seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi	97
3.6.2. Plazma IFN-gama seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi.....	98
3.7. Yaşı göre Düzenlenmiş Plazma IFN-gama Seviyesinin ve Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Sınır Değerlerine göre Aralarındaki İlişkinin İncelenmesi	101
3.7.1. Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama sınır değerine göre incelenmesi	101
3.7.2. Plazma yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin sınır değerlerine göre incelenmesi.....	103
3.8. Plazma miRNA ve Yaşı göre Düzenlenmiş IFN-gama Seviyesinin Tek Parametre Olarak İncelenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri.....	105
3.8.1. Tek parametre için ROC analizleri.....	105
3.8.2. Tek parametre için hata matrisi analizleri	107
3.8.2.2. Tek parametre için naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi	108
3.9. Korelasyon Analizleri.....	108
3.10. Lojistik Regresyon Analizleri.....	114
4. TARTIşMA	121
4.1 Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Profili.....	123
4.1.1 Genetik polimorfizm çalışma grubunun demografik ve klinik profili	123
4.1.2 miRNA ve ELISA �alışma grubunun demografik ve klinik profili	126

4.2. <i>IFNG</i> rs2069727 T/C Varyasyonunun MS ile İlişkisi.....	127
4.3. Plazma miRNA Seviyelerinin ve IFN-gama Konsantrasyonunun MS ile İlişkileri	130
4.3.1. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle MS arasındaki ilişkiler	130
4.3.1.1. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS tanı-tedavi biyobelirteci olma potansiyeli	135
4.3.1.2. hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve RRMS tanı-tedavi biyobelirteci olma potansiyeli	140
4.3.1.3. Plazma IFN-gama konsantrasyonu ve RRMS tanı ve tedavi biyobelirteci olma potansiyeli	144
4.3.3. <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerinin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri ile ilişkileri	151
4.3.4. IFN-gamma, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinin ve bu seviyeleri etkileyen diğer faktörlerin RRMS'teki rolü	153
4.3.5. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin tek bir parametre olarak değerlendirilmesi	156
4.3.6. IFN-gama hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p GA-kontrol arası karşılaştırma sonuçları	158
4.4. <i>In silico</i> -Fonksiyonel Zenginleştirme- Analizleri: <i>IFNG</i> , hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p Etkileşim Ağı	159
4.4.1. IFN-gamma protein seviyesini etkileyen miRNA ve transkripsiyon faktörleri	159
4.4.2. <i>IFNG</i> , hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşimleri	163
4.4.3. GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler ile <i>IFNG</i> , hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşim analizi sonuçları	168
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	171
KAYNAKLAR	189
EKLER	213
ÖZGEÇMİŞ	223



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Nöron hücresi	1
Şekil 1.2: Glial hücreler	2
Şekil 1.3: Sağlıklı miyelin ile hasar almış miyelinin karşılaştırması.	3
Şekil 1.4: EDSS puanlarının derecelendirilmesi	5
Şekil 1.5: MSSS tablosu	5
Şekil 1.6: Dünyada MS prevalansı	7
Şekil 1.7: MS patofizyolojisinde moleküler süreçler	10
Şekil 1.8: MS risk faktörleri	12
Şekil 1.9: KİS tipi zaman-özürlülük grafiği.	15
Şekil 1.10: RRMS tipi zaman-özürlülük grafiği.	16
Şekil 1.11: PPMS tipi zaman-özürlülük grafiği.	16
Şekil 1.12: SPMS tipi zaman-özürlülük grafiği	17
Şekil 1.13: GA'nın MS patofizyolojisindeki etki mekanizması.	21
Şekil 1.14: GA'nın MS'te spesifik etki mekanizması.	21
Şekil 1.15: IFN-gama monomeri (a) ve dimerinin (b) 3D yapısı	27
Şekil 1.16: <i>IFNG</i> 'nin 12. kromozomdaki yeri	30
Şekil 1.17: <i>IFNG</i> 'nin genomik yapısı.	31
Şekil 1.18: <i>IFNG</i> geninin 3'UTR bölgesinin yakınındaki rs2069727 T/C SNP'si.	32
Şekil 1.19: miRNA biyogenezi.	36
Şekil 1.20: MS hastalarında bulunan bağışıklık sistemi hücrelerinde ve MSS lezyonlarında düzensiz ifade edilen bazı miRNA'lar.	38
Şekil 1.21: hsa-miR-24-1 geninin 9. kromozomdaki konumu	38
Şekil 1.22: <i>IFNG</i> 3'UTR'sinde miRNA'ların potansiyel hedef bölgeleri	41
Şekil 1.23: hsa-miR-181d geninin 19. kromozomdaki konumu.	42
Şekil 2.1: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP bölgesini çoğaltmak için kullanılan termal döngü programı görüntüsü.	54
Şekil 2.2: TaqMan problemlerinin çalışma mekanizması.	55
Şekil 2.3: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerinin çizelgede gösterimi.	56

Şekil 2.4: Plazma izolasyon ve alikotlama süreci.	57
Şekil 2.5: qRT-PCR prosedürü.....	60
Şekil 2.6: qRT-PCR çalışması için kullanılan termal döngü programı görüntüsü.....	61
Şekil 2.7: qRT-PCR sonucu primerlerin erime eğrisi sonuçları (a), bu çalışmada elde edilen amplifikasyon eğrileri (b).	62
Şekil 2.8: Termal döngü aşamalarında SYBR Green.....	63
Şekil 2.9: ELISA prosedürü	66
Şekil 2.10: Standart eğri grafiği ($y = 0.406343\lg(x) + 0.0128912$ $R^2: 0.942$).	67
Şekil 3.1: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-24-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesi.	77
Şekil 3.2: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin (fold change) gruplar arasındaki ROC eğrileri.....	78
Şekil 3.3: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-181d-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesi.....	82
Şekil 3.4: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin (fold change) gruplar arasındaki ROC eğrileri.	83
Şekil 3.5: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi.	89
Şekil 3.6: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi.....	92
Şekil 3.7: GA, naif ve kontrol gruplarındaki yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL).	93
Şekil 3.8: Düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin gruplar arasındaki ROC eğrileri.	94
Şekil 3.9: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi.	100
Şekil 3.10: Tek parametre için gruplar arasındaki ROC eğrileri.....	106
Şekil 4.1: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve IFN-gama seviyelerini etkileyen/seviyelerinden etkilenen moleküler faktörler.	156
Şekil 4.2: Protein-protein etkileşimleri gösterilen, IFN-gama protein seviyelerini etkileyen TF'ler ve miRNA'lar.....	161
Şekil 4.3: <i>IFNG</i> , hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşimleri.....	167
Şekil 4.4: GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler ile <i>IFNG</i> , hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşim analizi sonuçları.....	169

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: MS tanı kriterleri.....	18
Çizelge 1.2: hsa-miR-24-1'in nükleotit dizisi, kök-halka şekli ve hsa-miR-24-3p'nin dizisi	39
Çizelge 1.3: hsa-miR-181d nükleotit dizisi, kök-halka yapısı ve ve hsa-miR-181d-3p dizisi	43
Çizelge 2.1: TaqMan SNP genotipleme kitinin TaqMan analiz ve katalog numarası.	51
Çizelge 2.2: Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerlerin bilgileri.	51
Çizelge 2.3: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C için genotiplerin belirlenmesi için kullanılan reaksiyon karışımı.	53
Çizelge 2.4: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP bölgesini çoğaltmak için kullanılan termal döngü programı.	54
Çizelge 2.5: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP bölgesini hedefleyen problemler ve ürün TaqMan analiz numarası.....	55
Çizelge 2.6: Sabit miktarda (100 ng) RNA ile cDNA sentezi için hazırlanan.....	59
Çizelge 2.7: Ters transkripsiyon reaksiyonunun zaman sıcaklık protokolü.	60
Çizelge 2.8: qRT-PCR işleminde kullanılan ana karışım içeriği.	61
Çizelge 2.9: qRT-PCR çalışması zaman sıcaklık protokolü.	62
Çizelge 2.10: ELISA kiti içeriği ve reaktifler.	64
Çizelge 2.11: AUC değerlerine göre analizin başarı derecelendirmesi.	69
Çizelge 3.1: Genotip çalışmasında RRMS hastası ve kontrol gruplarının demografik özellikleri.....	71
Çizelge 3.2: RRMS'li hastaların klinik ve demografik bilgileri.	72
Çizelge 3.3: miRNA çalışma grubunda GA, naif ve kontrol gruplarının klinik ve demografik özellikleri.	73
Çizelge 3.4: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi.	75
Çizelge 3.5: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotip ve alellerinin yaş ve cinsiyet için dengelenmemiş dağılımı.	75
Çizelge 3.6: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde dağılımlarının RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması	76

Çizelge 3.7: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP genotiplerine göre sınıflandırılmış RRMS hastalarının klinik parametrelerinin resesif ve dominant modellere göre karşılaştırılması.	76
Çizelge 3.8: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change).....	77
Çizelge 3.9: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analiz sonuçları.	79
Çizelge 3.10: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	80
Çizelge 3.11: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	81
Çizelge 3.12: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi sonuçları.	81
Çizelge 3.13: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change).....	82
Çizelge 3.14: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analiz sonuçları.	83
Çizelge 3.15: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	85
Çizelge 3.16: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	85
Çizelge 3.17: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi sonuçları.	86
Çizelge 3.18: GA ve naif gruplarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin EDSS ≤ 3 , EDSS > 3 ve MSSS ≤ 5 , MSSS > 5 ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.....	87
Çizelge 3.19: GA, naif ve kontrol gruplarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerine göre karşılaştırma analizi.	88
Çizelge 3.20: GA ve naif gruplarında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin EDSS ≤ 3 , EDSS > 3 ve MSSS ≤ 5 , MSSS > 5 ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.....	90
Çizelge 3.21: GA, naif ve kontrol gruplarında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotiplerine göre karşılaştırma analizi.	91
Çizelge 3.22: GA, naif ve kontrol gruplarındaki yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL).	93
Çizelge 3.23: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun ROC analiz sonuçları.....	95
Çizelge 3.24: Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	96

Çizelge 3.25: Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.	96
Çizelge 3.26: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin hata matrisi sonuçları.	97
Çizelge 3.27: GA ve naif gruplarında yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonunun EDSS ≤ 3 , EDSS > 3 ve MSSS ≤ 5 , MSSS > 5 ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.	98
Çizelge 3.28: GA, naif ve kontrol gruplarında <i>IFNG</i> rs2069727 T/C genotipleri ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun karşılaştırma analizi.	99
Çizelge 3.29: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve yüksek IFN-gama > 1.311 pg/mL konsantrasyonuna göre, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi.	102
Çizelge 3.30: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve yüksek IFN-gama > 1.311 pg/mL konsantrasyonuna göre, plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi.	102
Çizelge 3.31: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük hsa-miR-24-3p ≤ 2.61 ve yüksek hsa-miR-24-3p > 2.61 sınır değerine göre, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi.	103
Çizelge 3.32: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük hsa-miR-181d-3p ≤ 2.90 ve yüksek hsa-miR-181d-3p > 2.90 sınır değerine göre, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi.	104
Çizelge 3.33: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde ROC analizleri sonuçları.	105
Çizelge 3.34: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi. .	107
Çizelge 3.35: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi. .	108
Çizelge 3.36: Korelasyon analizi genel tablosu.	109
Çizelge 3.37: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP genotiplerine göre gruplandırılmış, tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda ayrı ayrı, plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyelerinin korelasyon analizleri.	113
Çizelge 3.38: Lojistik regresyon analiz modelleri.	115
Çizelge 3.39: Lojistik regresyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar.	118
Çizelge 4.1: NCBI SNP veri tabanında rapor edilen <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP' sinin polimorfik alel frekansları (URL-26, NCBI-dbSNP).	129

Çizelge 4.2: <i>IFNG</i> rs2069727 T/C SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları.	130
Çizelge 4.3: Literatürde PBMC, serum veya plazmada MS ile ilişkili bulunan miRNA'lar.....	133
Çizelge 4.4: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama.....	150



KISALTMALAR

25-(OH) D₃	: 25-Hidroksivitamin D ₃
3'UTR	: 3' Untranslated Region
AGO	: Argonaute
APO	: Apolipoprotein
ASH	: Antijen Sunan Hücreler
ATF	: Activating Transcription Factor
ATXN1	: Ataksin 1
AUC	: Area Under the Curve
BBC3	: B-cell leukemia/lymphoma 2 Binding Component 3
BCL2	: B-cell leukemia/lymphoma 2
BDNF	: Brain-derived Neurotrophic Factor
BIM	: B Hücreleri Lenfoma 2 Benzeri Protein 11
BOS	: Beyin-Omurilik Sıvısı
BT	: Bilgisayar Tomografisi
CASP	: Kaspaz
CCNB1	: Cyclin B1
CCR5	: C-C Motifi Kemokin Reseptörü 5
CD	: Cluster of Differentiation
CDK4	: Cyclin Dependent Kinase 4
CDKN1B	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B
cDNA	: Komplementer DNA
CEBP	: CCAAT/Enhancer Binding Protein
CHK1	: Checkpoint Kinase 1
CLEC16A	: C-tipi Lektin Alan Ailesi 16 A Üyesi
CREB	: Cyclic Adenosine Monophosphate Responsive Element Binding Protein
CSTF1	: Cleavage Stimulation Factor Subunit 1
Ct	: Cycle Threshold
CTSS	: Katapsin S
CYLD	: Cyldromatosis (Turban Tumor Syndrome) Lysine 63 Deubiquitinase
CYP51A	: Cytochrome P450 Family 51 Subfamily A Member 1
DGCR8	: DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8
DMT	: Disease Modifying Therapies
DN	: Doğru Negatif
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DP	: Doğru Pozitif
DUSP10	: Dual Specificity Phosphatase 10
EAE	: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBNA1	: Epstein-Barr Virüsü Nükleer Antijen 1
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
EDSS	: Expanded Disability Status Scale
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetat

EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EKG	: Elektrokardiyografi
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP300	: Adenovirüs Erken Bölge 1A ile İlişkili Hücresel p300 Transkripsiyonel Ortak Aktivatör Proteini
EPB41	: Erythrocyte Membrane Protein band 4.1
ESR1	: Estrogen Receptor 1
EXOSC1	: Exosome Component 1
FOXP3	: Forkhead Box P3
GA	: Glatiramer Asetat
GO	: Gene Ontology
GWAS	: Genome Wide Association Studies
HCC	: Hepatoselüler Karsinom
HCMV	: Human Cytomegalovirus
HDL	: High Density Lipoprotein
HLA	: Human Leukocyte Antigen
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
IFNG	: İnterferon-gama
IFNGR	: İnterferon-gama Reseptör
Ig	: İmmüoglobulin
IGF1	: İnsulin-like Growth Factor 1
IL	: İnterlökin
IP	: İmmünproteazom
IRF1	: IFN Regulatory Factor 1
IV	: İntravenöz
iNKT	: Invariant Natural Killer T Cells
JAK-STAT	: Janus Kinaz-Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
JUN	: Jun Proto-onkogen, Aktivatör Protein 1 TF Alt Birimi
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KİS	: Klinik İzole Sendrom
KLF	: Krüppel-like Factor
LDL	: Low Density Lipoprotein
LLGL1	: Lethal Giant Larvae Homolog 1
LRRK1	: Leucine-rich Repeat Kinase 1
MAF	: Minor Alel Frekans
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MBP	: Miyelin Bazik Proteini
MDM4	: Mouse Double minute 4 Regulator of P53
MDSC	: Myeloid-derived Suppressor Cells
MGMT	: Metil Guanin Metil Transferaz
MHC	: Major Histocompatibility Comple
miRDB	: miRNA Database
miRNA	: mikroRNA
miRNET	: miRNA Network
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
MOBP	: Miyelin-associated Oligodendrocyte Basic Protein
MOG	: Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini

MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MSSS	: Multiple Sclerosis Severity Score
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MYH9	: Myosin Heavy Chain 9
NCAM1	: Neural Cell Adhesion Molecule 1
NFATC2	: Nuclear Factor of Activated T Cells 2
NFIL3	: Nükleer Faktör IL-3 ile Düzenlenen Protein
NF-KB	: Nükleer Faktör-KB
NFKB1	: Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells 1
NFKBIA	: NFKB İnhibitörü Alfa
NfL	: Nörofilaman Hafif Zinciri
NK	: Natural Killer
NO	: Nitrik Oksit
NPAS3	: Neuronal PAS Domain-Containing Protein 3
NUP43	: Nükleoporin 43
OKB	: Oligoklonal Bant
ORF	: Open Reading Frame
P3KR1	: Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit-1
PARP1	: Poli(ADP-riboz) Polimeraz 1
PAX2	: Paired Box Gene 2
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	: Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHAX	: Phosphorylated Adaptor for RNA Export,
PHB	: Prohibitin
PI3KR1	: Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit-1
PLA2G4A	: Phospholipase A2 Group IVA
PLP	: Proteolipit Proteini
POU2F3	: POU Class 2 Homeobox 3
PPM1D	: Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1D
PPMS	: Primary progressive MS
PPP3R1	: Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, alpha
pre-miRNA	: Precursor miRNA
pri-miRNA	: Primer-miRNA
PRKC	: Protein Kinaz C
PSMD3	: Proteasome 26S Subunit, non-ATPase 3
PTPRT	: Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type T
PTPRZ1	: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z1
PUMA	: p53-upregulated Modulator of Apoptosis
qRT-PCR	: Quantitative Real-Time PCR
RELA/P65	: RELA Proto-onkogen NFKB Alt Birimi
RFWD2	: Ring Finger and WD Repeat Domain 2
RISC	: RNA-induces Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik Asit
ROC	: Receiver Operating Characteristic
RRAS	: Ras Related
RRM2	: Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit 2

RRMS	: Relapsing-remitting MS
SESN1	: Sestrin 1
SGPP2	: Sphingosine-1-phosphate Phosphatase 2
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SOX2	: Sex-determining Region Y Box 2
SPMS	: Sekonder Progresif MS
STAT1	: Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STEAP3	: Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3
SUMO1	: Small Ubiquitin-like Modifier 1
TAB1	: TGFB-activated Kinase 1
Th	: T Helper
TK1	: Timin Kinaz 1
TLR4	: Toll-like Receptor 4
TMEV	: Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TP53	: Tumor Protein P53
TP53I3	: Tümör Proteini p53 İndüklenebilir Protein 3
TRBP	: Transactivation-responsive RNA-Binding Protein
TRIM11	: Tripartite Motif-containing Protein 11
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
WHO	: World Health Organization
XIAP	: Apoptoz İnhibitörü X Bağlantılı Protein
XPO5	: Eksportin 5
YN	: Yanlış Negatif
YP	: Yanlış Pozitif
YYL1	: Yin Yang 1
ZAK	: Sterile Alpha Motif and Leucine Zipper Containing Kinase
AZK	

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

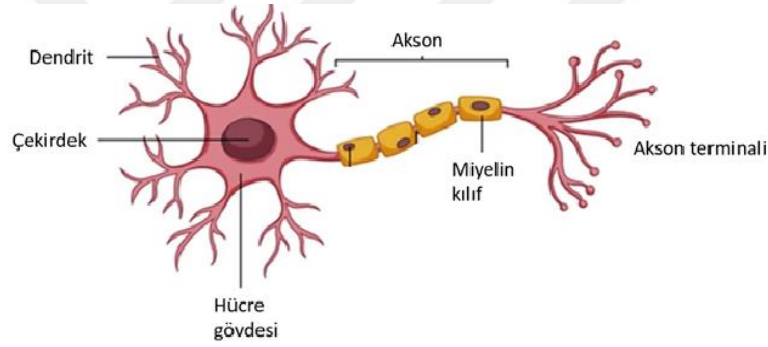
Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta delta Ct
κ	Kappa
%	Yüzde
mL	Mililitre
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
g	Gram
pg	Pikogram
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
χ^2	Ki-kare
<	Küçüktür
>	Büyüktür
$\geq$	Büyük eşittir
$\leq$	Küçük eşittir
=	Eşittir
+	Artı
$\pm$	Artı-eksi



1. GİRİŞ

1.1 Multipl Skleroz

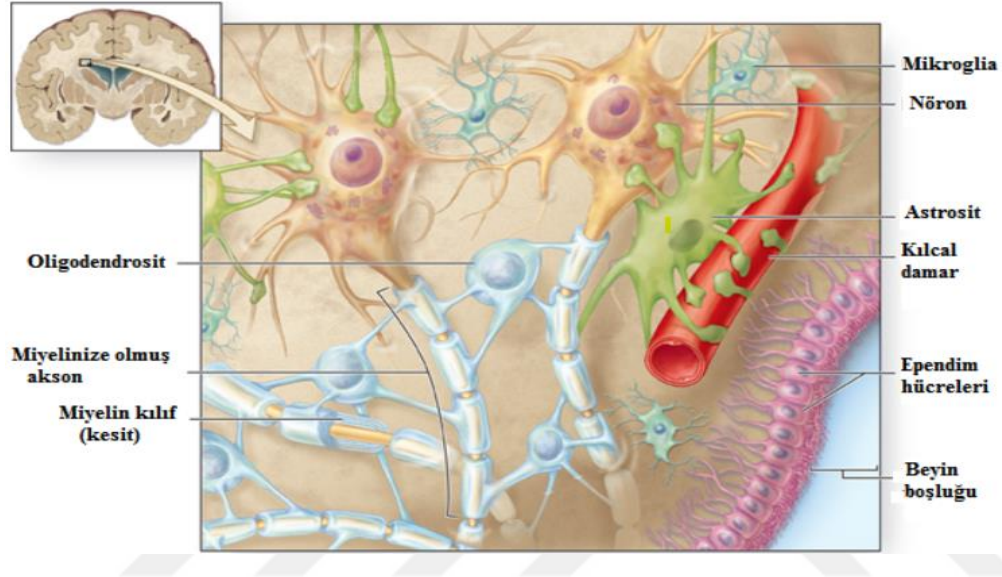
Multipl skleroz (MS) terimi, Latince kökenli birçok veya birkaç anlamına gelen "multipl" ve doku sertleşmesini ifade eden "skleroz" kelimelerinden oluşmaktadır ve otoimmün, nörodejeneratif bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır (Joy vd., 2002; Stadelmann vd., 2011; Schirmer vd., 2021). MSS'yi oluşturan temel yapı taşları, sinir hücreleri olarak bilinen nöronlardır. Nöronlar dendritler, hücre gövdeleri (soma), aksonlar ve akson uçları olmak üzere dört ana bileşenden oluşmaktadır (Stevens, 1979) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Nöron hücresi (URL-1).

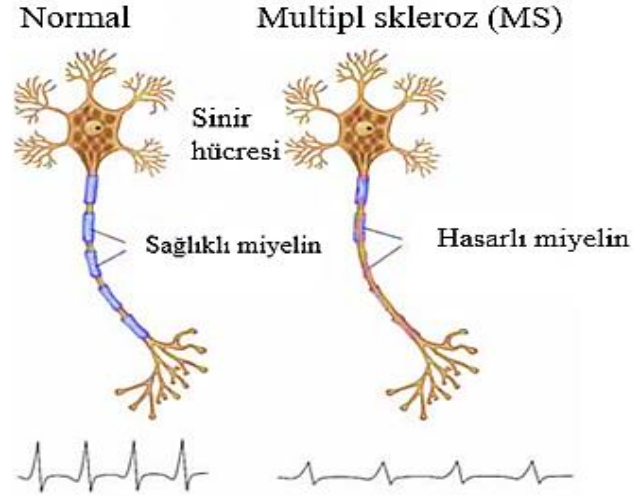
Dendritler, ağsı yapıdadır ve hücre dışından gelen elektrokimyasal uyarıları alarak hücre gövdesine iletirler. Elektrokimyasal uyarılar, akson boyunca ilerleyip akson terminalinde bulunan distal uçlar (akson uçları) vasıtasıyla post-sinaptik nöronlara, kaslara veya salgı bezlerine iletilirler. Akson üzerinde segmentler halinde bulunan miyelin kılıf, yalıtkan özelliği sayesinde elektriksel uyarıların aksonal iletimini hızlandırır (Stevens, 1979; Boggs, 2006). MS ile birlikte, otoreaktif immün hücrelerin nöronlara saldırmasıyla miyelin kılıfın hasar alması (demyelinizasyon) sonucunda yara görünümünden kaynaklanan lezyonlar ve değişen derecelerde aksonal ve nöronal hasarlar oluşabilmektedir (Öztürk vd., 2016).

MSS yapı taşları olan nöronlara destek sağlayan glia hücreleri; oligodendrosit, astrosit, mikrogliya ve ependim hücreleridir. Glia hücreleri, beyindeki homeostazın korunmasına, miyelin üretimine ve nöronların desteklenmesine katkıda bulunur. (Şekil 1.2) (Schirmer vd., 2021). Glia hücrelerinin yapı ve fonksiyonları, bağışıklık sisteminin otoimmün saldırısı, nörotoksinite, oksidatif stres, enfeksiyonlar, vasküler hasar ve mitokondriyal disfonksiyon gibi faktörler sonucunda bozulmakta ve otoimmün hastalıklara neden olabilmektedir (Schirmer vd., 2021).



Şekil 1.2: Glial hücreler (Mescher, 2018).

Oligodendrositler, lipid ve proteinlerin karmaşık bir kombinasyonundan oluşan (yaklaşık % 75 lipid, %25 protein) bir yapı olan miyelin kılıfın sentezinden sorumludur ve miyelin kılıfın yapısının korunması, restorasyonu gibi önemli rolleri vardır (Boggs, 2006). MS hastalığında, otoimmünite, enflamasyon ve oligodendrosit sayısındaki azalma sonucunda demiyelinizasyon görülmektedir. Demiyelinizasyon, kendiliğinden reaktif olan immün hücrelerin miyelin kılıfı hedef alması sonucu oluşabileceği gibi, enfeksiyonlar, travmalar, tümörler veya diğer nedenlerle de oluşabilmektedir (Öztürk vd., 2016). Sağlıklı miyelin ile demiyelinizasyon sonucu hasar almış miyelinin karşılaştırması Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Miyelin kaybı ile sinirsel iletimdeki bozukluklara eşlik eden sinir hücrelerinin enerji metabolizmasındaki aksaklıklar sonucunda iletim yavaşlayabilir veya tamamen bloke olabilir; bu durum nörolojik bozukluklara neden olabilmektedir (Stadelmann vd., 2011).



Şekil 1.3: Sağlıklı miyelin ile hasar almış miyelinin karşılaştırması (URL-2).

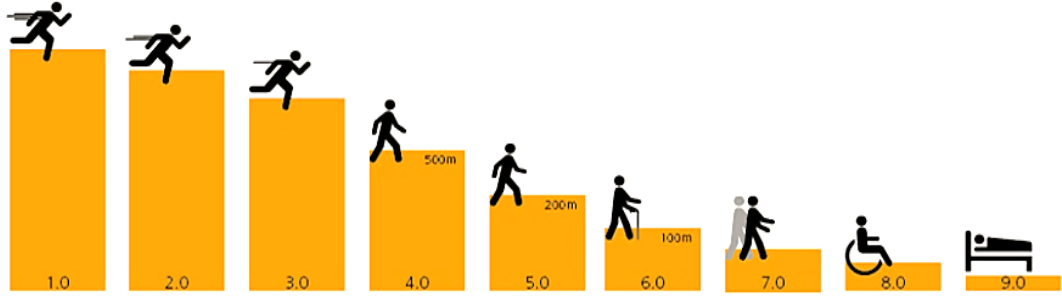
Astrositler, nöronlar ile diğer glial hücreler arasındaki iletişimi sağlar. Enflamasyon ve sinir hasarı durumunda aktive olurlar ve enflamatuvar yanıtları düzenlemek, doku onarım süreçlerine katılmak gibi fonksiyonları yerine getirirler. MS'te astrositlerde enflamasyon ve gliosis (astrositlerin sayısında artış) gözlenir. Enflamatuvar yanıt nedeniyle, astrositler arasındaki bağlantılar zarar görür ve bu durum nöronların iletişimini negatif yönde etkiler (Schirmer vd., 2021). Beyindeki enflamasyonu kontrol eden ve savunma görevi yapan hücreler olan mikroglialar, glia hücrelerini oluşturan bir diğer hücre grubudur. MS'te, mikroglia aktivasyonu ve sayısında artış gözlenmektedir. Mikroglia aktivasyonu, enflamasyon ve nöron hasarının artmasına neden olabilmektedir (Ozawa vd., 1994; Stadelmann vd., 2011).

Multifokal demiyelinizan plaklar ve değişen derecelerde aksonal ve nöronal hasarlar sonucunda (Boggs, 2006; Stadelmann vd., 2011; Schirmer vd., 2021) beyin ve omurilikten vücudun diğer bölgelerine giden sinirsel ileti verimli bir şekilde iletilemez, beyin ile vücudun geri kalanı arasındaki iletişim bozulur ve bu durum çeşitli semptomlara yol açabilir. MS semptomları geniş bir yelpazede değişebilir ve bir kişinin hareket kabiliyetini, bilişsel işlevlerini ve duygusal refahını etkileyebilir. Dahası, kişiden kişiye büyük ölçüde farklılık gösterebilir. Bazı yaygın semptomlar, yorgunluk, güçsüzlük, uyuşma, denge ve koordinasyon bozuklukları, konuşma bozukluğu, çift görme, görme azlığı, idrar kaçırma veya yapamamadır (Kister vd., 2013; Finkelsztejn vd., 2014).

MS hastalığının teşhisi semptomların görülmesine bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. MS, zamanla kalıcı engelliliklere neden olabilir. Erken tanı, engellilik riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Hekimler, hastanın semptomlarını değerlendirmek ve MS'i düşündüren herhangi bir bulguyu belirlemek için kapsamlı bir nörolojik muayeneye ek olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) testi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve uyarılmış potansiyeller gibi çeşitli testler yapmaktadır. Bu testler, MS'in tanısını destekleyebilir veya ekarte edebilir. Ancak, MS tanısı için kesin bir test mevcut değildir. Teşhis, hastanın semptomları, test sonuçları ve diğer olası hastalıkların elenmesi ile yapılmaktadır (Dobson ve Giovannoni, 2018).

MS tedavisinde kullanılan ilaçlar hastalık seyrini olumlu yönde değiştirebilen immün modülatörler (hastalığın seyrini değiştiren-disease modifying therapies, DMT), akut atak tedavileri ve semptomları gidermeye yönelik tedavilerdir. İlaç etkinliği kişiden kişiye değişmekte ve tedaviye başlanırken ne derece etkin olacağı öngörülememektedir. MS'in ilerleyişini takip etmek, hastalığın seyrini ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek için önemlidir. Bunun için yaygın kullanılan parametreler, nörolojik muayene ile belirlenen genişletilmiş özürlülük durumu ölçeği (expanded disability status scale, EDSS) ve hastalık süresi ile EDSS skalasına bağlı olan MS ciddiyet skorudur (multiple sclerosis severity score, MSSS) (Kurtzke vd., 1983; Roxburgh vd., 2005; Pachner ve Steiner, 2009; Kister vd., 2013; Kurtzke, 2015).

EDSS skalasında derecelendirme hastanın büyük bir çaba harcamadan sergilediği en iyi performansa göre gerçekleştirilir. Buna göre, normal bir muayene ardından nörolojik değerlendirme sonucunda özürlülüğün olmadığı durumda EDSS 0 (sıfır) iken, 2.0: minimal özürlülüktür. 4.0: orta derecede özürlülüğe karşılık gelmekte olup hasta yaklaşık 500 metre yardım olmaksızın yürüyebilmektedir. 5.0: hasta yardım olmaksızın yaklaşık 200 metre yürüyebilmektedir. 6.0: hasta tek taraflı bir araç (baston, koltuk değneği vb.) yardımıyla yaklaşık 100 metre yürüyebilmektedir. 6.5: hastanın çift taraflı desteğe gereksinimi vardır. 8.0: hasta tekerlekli sandalyeye bağımlıdır. 9.0: hasta yatağa bağımlıdır. Son olarak 10.0: MS'e bağlı ölüm olarak değerlendirilmektedir (Şekil 1.4) (Kurtzke vd., 1983; Kister vd., 2013; Kurtzke, 2015 ; Demir, 2022).



Şekil 1.4: EDSS puanlarının derecelendirilmesi (Cagliari, 2017).

MSSS puanı ise, hastalığın ilerlemesini değerlendirmek için kullanılan bir ölçektir. MSSS puanı, EDSS puanına ve hastalığın süresine bağlı olarak hesaplanır. Bu skorun yüksek olması, hastalığın daha hızlı ilerlediğini gösterirken, düşük bir skor daha yavaş ilerlemeyi işaret etmektedir. MSSS, hastanın EDSS puanına karşılık gelen sütun ve hastalık başlangıcından bu yana geçen yıl sayısına karşılık gelen satır bulunarak belirlenmektedir. Şekil 1.5'te verilen MSSS tablosunda, ondalıklar, farklı hastalık sürelerinde hastalık ilerleme modelini göstermek için renk kodludur (Roxburgh vd., 2005).

	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	EDSS
1	0.67	2.44	4.30	5.87	7.68	7.93	8.64	9.09	9.35	9.50	9.63	9.74	9.84	9.90	9.94	9.97	9.98	9.98	9.99	
2	0.53	2.01	3.69	5.24	6.46	7.27	7.98	8.58	8.95	9.18	9.38	9.59	9.79	9.88	9.93	9.97	9.99	9.99	9.99	
3	0.45	1.77	3.34	4.82	6.00	6.81	7.54	8.14	8.55	8.83	9.07	9.35	9.63	9.77	9.86	9.92	9.97	9.98	9.99	
4	0.35	1.45	2.87	4.27	5.41	6.24	6.98	7.65	8.12	8.42	8.70	9.08	9.47	9.68	9.80	9.88	9.95	9.98	9.99	
5	0.30	1.28	2.60	3.90	4.95	5.79	6.58	7.26	7.75	8.08	8.38	8.83	9.32	9.60	9.76	9.86	9.95	9.98	9.99	
6	0.25	1.13	2.33	3.54	4.55	5.38	6.14	6.81	7.33	7.66	7.98	8.50	9.08	9.45	9.68	9.81	9.93	9.97	9.99	
7	0.24	1.04	2.10	3.17	4.13	4.96	5.75	6.46	6.98	7.32	7.65	8.24	8.91	9.33	9.59	9.76	9.90	9.95	9.99	
8	0.21	0.94	1.92	2.93	3.81	4.57	5.36	6.10	6.61	6.95	7.32	7.97	8.71	9.21	9.55	9.74	9.89	9.96	9.99	
9	0.21	0.88	1.76	2.65	3.45	4.17	4.93	5.64	6.14	6.50	6.90	7.65	8.53	9.09	9.47	9.70	9.87	9.95	9.99	
10	0.19	0.78	1.53	2.34	3.10	3.79	4.55	5.28	5.77	6.14	6.58	7.39	8.31	8.92	9.34	9.61	9.83	9.94	9.99	
11	0.17	0.71	1.40	2.13	2.82	3.46	4.21	4.94	5.42	5.82	6.30	7.18	8.15	8.79	9.24	9.52	9.78	9.92	9.98	
12	0.16	0.64	1.28	1.98	2.64	3.25	3.94	4.63	5.13	5.54	6.03	6.92	7.93	8.63	9.13	9.43	9.71	9.88	9.97	
13	0.13	0.57	1.14	1.80	2.44	3.05	3.70	4.38	4.91	5.32	5.80	6.74	7.83	8.55	9.03	9.34	9.65	9.85	9.96	
14	0.11	0.49	1.03	1.70	2.33	2.91	3.55	4.26	4.82	5.23	5.70	6.66	7.89	8.34	8.86	9.20	9.57	9.82	9.95	
15	0.10	0.45	0.99	1.64	2.26	2.82	3.44	4.14	4.68	5.09	5.51	6.33	7.41	8.17	8.70	9.11	9.51	9.78	9.94	
16	0.09	0.38	0.85	1.42	1.99	2.56	3.17	3.86	4.41	4.81	5.18	6.00	7.14	7.97	8.54	9.04	9.49	9.75	9.94	
17	0.05	0.32	0.76	1.28	1.77	2.30	2.95	3.65	4.17	4.55	4.94	5.74	6.89	7.77	8.38	8.99	9.52	9.79	9.96	
18	0.04	0.26	0.66	1.12	1.57	2.09	2.70	3.37	3.89	4.27	4.62	5.43	6.62	7.54	8.23	8.84	9.51	9.78	9.96	
19	0.05	0.28	0.63	1.00	1.39	1.89	2.50	3.19	3.72	4.12	4.49	5.35	6.59	7.51	8.22	8.80	9.57	9.81	9.96	
20	0.05	0.26	0.59	0.94	1.29	1.71	2.29	2.99	3.51	3.93	4.30	5.15	6.43	7.45	8.23	8.98	9.58	9.80	9.95	
21	0.05	0.30	0.66	1.02	1.39	1.77	2.34	2.97	3.43	3.83	4.21	5.09	6.35	7.33	8.08	8.87	9.49	9.77	9.96	
22	0.04	0.23	0.54	0.90	1.28	1.66	2.20	2.82	3.29	3.69	4.09	5.04	6.35	7.35	8.10	8.84	9.42	9.73	9.95	
23	0.05	0.27	0.58	0.91	1.26	1.64	2.19	2.78	3.21	3.69	4.19	5.16	6.47	7.46	8.20	8.87	9.43	9.75	9.95	
24	0.05	0.24	0.52	0.86	1.25	1.63	2.15	2.71	3.09	3.52	4.01	5.03	6.36	7.38	8.15	8.81	9.39	9.74	9.96	
25	0.05	0.23	0.47	0.77	1.15	1.56	2.05	2.53	2.94	3.21	3.74	4.80	6.26	7.24	8.00	8.73	9.35	9.75	9.98	
26	0.05	0.20	0.45	0.78	1.17	1.58	2.08	2.63	2.99	3.40	3.95	5.02	6.39	7.44	8.21	8.89	9.48	9.80	9.98	
27	0.05	0.22	0.48	0.78	1.15	1.56	2.03	2.56	2.91	3.29	3.86	4.93	6.33	7.38	8.14	8.91	9.56	9.85	9.98	
28	0.04	0.17	0.40	0.74	1.16	1.52	1.88	2.39	2.76	3.04	3.46	4.54	5.99	7.07	7.90	8.75	9.45	9.80	9.98	
29	0.03	0.18	0.47	0.80	1.19	1.51	1.79	2.27	2.68	3.01	3.41	4.35	5.68	6.76	7.66	8.62	9.38	9.75	9.96	
30	0.01	0.13	0.45	0.82	1.19	1.45	1.69	2.23	2.75	3.13	3.50	4.35	5.61	6.66	7.54	8.47	9.27	9.67	9.91	

Yıllar



Şekil 1.5: MSSS tablosu (Roxburgh vd., 2005).

EDSS ve MSSS puanları yalnızca fiziksel engellilik düzeyini göstermektedir. Fiziksel engellilik düzeyi, MS teşhisinde ve prognozunun izlenmesinde bir ölçüt olarak kabul edilmektedir; ancak engellilik artışı, moleküler seviyede gerçekleşen süreçlerin bir sonucu olduğu için moleküler belirteçlere göre nispeten daha geç gözlenebilen bir parametredir. Erken teşhis edilen ve zamanında tedaviye başlanan vakalarda hastalığın seyri daha olumlu olabilmektedir (Kappos vd., 2007). Dolayısıyla, henüz hastada bir engellilik yokken, hastalığın erken evrelerinde rol aldığı keşfedilen biyobelirteçlerin, vücut sıvılarından tespit edilmesiyle erken tanı gerçekleştirilebilir. Hastada engellilik mevcutsa, bu sonuca vesile olan kaskatta tespit edilebilir moleküllerin değerlendirilmesiyle kaliteli bir prognoz takibi sağlanabilir. Ayrıca, tedavi yanıtının EDSS, MSSS puanları ve tedavi sürecinde moleküler seviyede rol alan biyobelirteçlerin takibiyle izlenmesi sayesinde, hasta en kısa zamanda en uygun ilaçla buluşturulabilir. Bu, engellilik gelişiminin geciktirilmesine ve hastaların yaşam kalitesinin korunmasına katkıda bulunur. Dolayısıyla, hastalık teşhisinde, prognozunda ve tedaviye verilen yanıtta moleküler seviyede rol alan biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Michaličková vd., 2022).

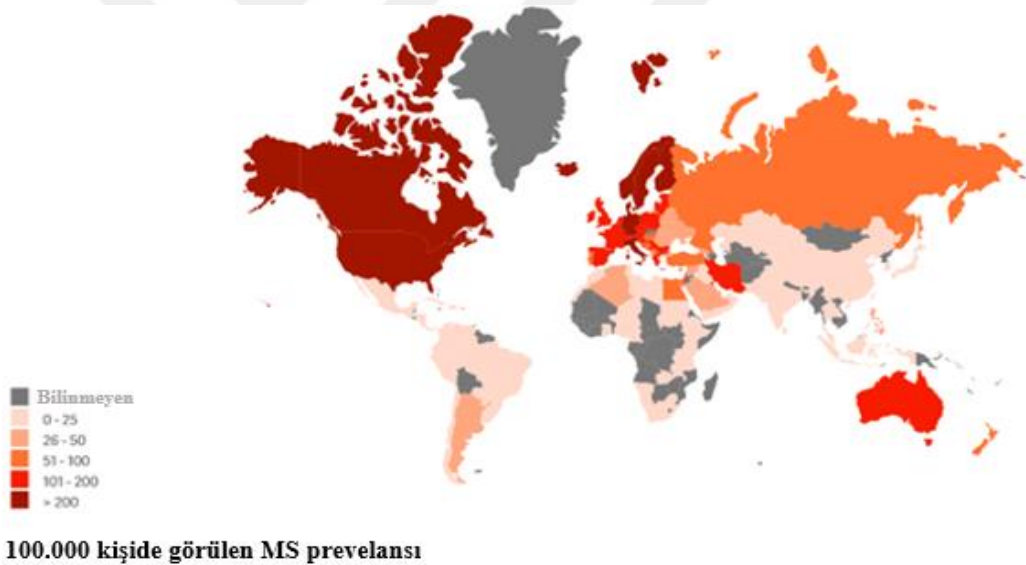
1.1.1 Tarihçe

MS'in klinik olarak ilk tanımı 1868 yılında Jean-Martin Charcot tarafından yapılmıştır. Hastalık patofizyolojisi aydınlatılmaya çalışılmış, ilk semptomatik tedaviler tanıtılmıştır (Charcot, 1868; Walusinski vd., 1933; Hickey, 1999). 1916'da patolog Dr. James Dawson, mikroskobik miyelin hasarını ve beyinde oluşan kan damarı enflamasyonunu göstererek MS'in sinir sistemindeki etkilerinin anlaşılmasını sağlamıştır (Dawson, 1916). Sonraki yıllarda ise BOS analizi, MRG yöntemleri ve akut dönemde steroid tedavisinin etkinliğinin gösterilmesi gibi gelişmeler elde edilmiştir (Hickey, 1999). İlerleyen süreçte, MS'in etiyolojisi üzerine yapılan araştırmalar, hastalığın multifaktöriyel bir özellikte olduğunu, hastalık oluşumunda genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonunun rol oynadığını göstermiştir (Browne vd., 2014). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise hastalığın erken tanısı, hastalık modifiye edici tedaviler ve moleküler biyobelirteçler üzerine odaklanılmaktadır (Grzegorski ve Losy, 2019; Mansoor vd., 2020).

1.1.2 Epidemiyoloji

MS, yaşam kalitesini ciddi derecede düşüren, genellikle genç erişkinleri etkileyen ve yol açtığı nörolojik özürlülük neticesinde ortaya çıkan fiziksel engellilikle önemli sosyal ve ekonomik etkileri olan ciddi bir hastalıktır (Weinshenker, 1996).

2008 yılında, MS Uluslararası Federasyonu ile Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) arasında sağlanan bir ortaklık ile yapılan araştırmalarda, 218 ülkeden elde edilen 'MS Atlası' verilerine göre, dünya genelinde MS'li hasta sayısının 2013'te 2.3 milyon, 2020'de 2.8 milyon ve 2023'te 2.9 milyon olduğu görülmektedir. MS prevalansının dünya genelinde büyük ölçüde değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Kuzey Amerika ile Avrupa'da 22-189/100.000 arasında olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde ise MS prevalansının 51-100/100.000 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Browne vd., 2014). 'MS Atlası Epidemiyoloji Verileri' raporuna göre dünyada MS hastalığının görülme sıklığı haritası Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6: Dünyada MS prevalansı (URL-3).

Dünya genelinde MS teşhis yaşı ortalama 32'dir (URL-4). MS hastası olan kadınların sayısı, erkeklere göre en az iki kat daha fazladır (tüm hastaların %69'u kadın, %31'i erkektir). Bu kadın ağırlıklı eğilim Batı Pasifik ve Güneydoğu Asya bölgelerinde daha da belirgindir ve burada erkeklerin üç katından fazla kadın hasta bulunmaktadır. Cinsiyet oranı bölgesel olarak değişmektedir. Örneğin Doğu Akdeniz bölgesinde, ortalama olarak bir erkek MS hastası için 2 kadın MS hastası bulunurken, bazı

ülkelerde kadınların erkeklere oranla 3 veya hatta 4 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Mısır, İran, Filistin ve Sudan gibi ülkeler bu örnekler arasında yer almaktadır (URL-5).

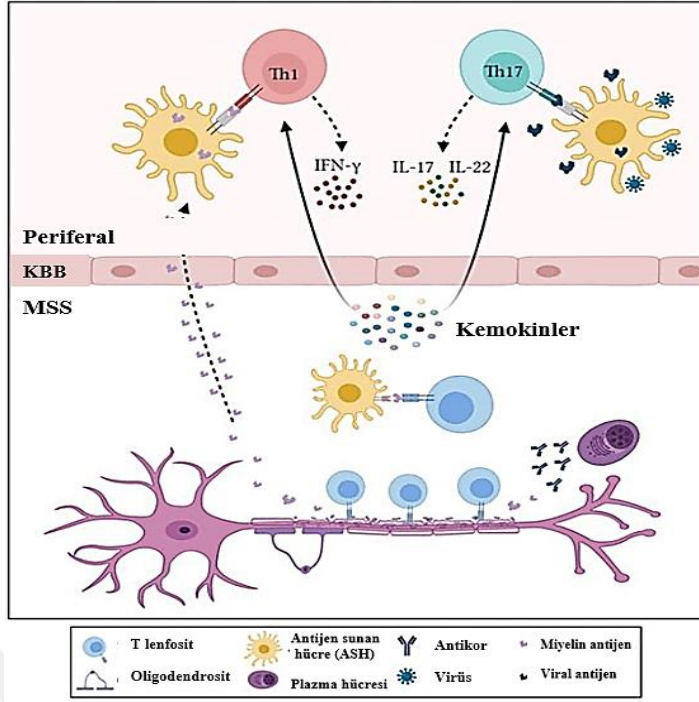
2020-22 yıllarında yapılan çalışmalar sonucunda, Türkiye’de yaklaşık 58.401 MS hastası olduğu ve bu kişilerin de %33’ünün erkek %67’sinin kadın olduğu raporlanmıştır (URL-4). Türkiye'deki farklı şehirler için bazı epidemiyolojik çalışmalar bildirilmiştir. İstanbul’da yapılan bir çalışmada prevelansın 101.3/100.000 (Türk-Börü vd., 2006); Ordu’da yapılan çalışmada prevelansın 52.00/100.000 (Türk-Börü vd., 2018); Edirne bölgesinde ise prevelansın 33.9/100.000 olduğu görülmüştür (Çelik vd., 2011). Edirne bölgesi için 2003 yılında kadın/erkek oranı 2.55’tir ve bu vakaların %69.2’si yineleyen-düzelen MS (relapsing-remitting MS, RRMS) klinik alt tipindedir. Yıllık ortalama insidansı ise 3.48/100.000’dir (Çelik vd., 2011). Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde yaşayan insanlar arasında fiziksel, çevresel ve genetik farklılıklar olduğu için, hastalık prevelansı da bu bölgeler arasında değişiklik gösterebilmektedir (Bölük vd., 2021).

1.1.3 Patofizyoloji

MS, otoimmün süreçlerin sonunda ortaya çıkan nöroenflamatuar yanıtın görüldüğü bir MSS hastalığıdır. MSS'deki miyelin ve sinir hasarının, özellikle T lenfositler tarafından tetiklenen adaptif bağışıklık yanıtı aracılığıyla oluşturulduğu düşünülmektedir. Demiyelinizasyon, miyelin bazık proteini (MBP), miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG) ve proteolipit proteini (PLP) gibi miyeline özgü antijenlerin farklılaşma kümesi 4 (cluster of differentiation 4, CD4+) T yardımcı (T helper, Th) lenfositlerce tanınması ve ardından makrofaj aktivasyonu ile gerçekleşebildiği gibi MSS’ye sızan makrofajlar ve T hücreleri tarafından salgılanan çeşitli sitokinler, proteazlar, nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerinin birleşik etkisi ile de gerçekleşebilir (Comabella ve Khoury, 2012). Öne sürülen en genel varsayım, Epstein-Barr virüsü (EBV), insan sitomegalo virüsü (human cytomegalovirus, HCMV) ve Theiler fare ensefalomyelit virüsü (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) gibi çeşitli çevresel ajanların (Mecha vd., 2013; DiSano vd., 2019; Donati, 2020; Zabala vd., 2020; Pike vd., 2022) miyelin reaktif CD4+, T ve B hücrelerinin aktivasyonuna sebep olarak sistemik lenfoid organlarda süreci

başlatmasıdır. Bu süreçte T hücre aktivasyonu, antijen sunan hücrelerde (ASH) bulunan majör doku uygunluk sınıf 2 kompleksi (major histocompatibility complex class 2: MHC 2) tarafından yabancı antijenlerin T hücrelerine sunulmasıyla birlikte gerçekleşir. Aktive olan miyelin reaktif T hücrelerinin KBB'nin belirli bölgelerinden içeriye doğru göç ettikleri bilinmektedir. Bu göç süreci, adezyon molekülleri, kemokinler ve matriks metalloproteinazlar (MMP) ile sağlanmaktadır (Comabella ve Khoury, 2012). Bu moleküller KBB yapısını bozarak lenfosit ve lökosit göçünü kolaylaştırır. Artan lökosit migrasyonu, KBB'nin daha geçirgen olmasına neden olarak başka lökositler tarafından gerçekleştirilecek infiltrasyon sürecini hızlandırır. Bu nedenle, proenflamatuar lökositlerin MSS'ye girişi, nöroenflamasyona, KBB bozulmasına ve MS plak oluşumuna yol açan olayları tetikleyebilen erken bir fenomen olarak kabul edilmektedir. Lökosit infiltrasyonunu kolaylaştıran başka etmenler de vardır. Örneğin, Th17 hücreleri tarafından üretilen interlökin 17A'nın (IL-17A) oksidatif stresi artırarak KBB'nin bozulmasında anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (Huppert vd., 2010). Ayrıca, KBB geçirgenlik artışının, hücrelerarası adezyon yapışma molekülü 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (vascular cell adhesion molecule; VCAM-1) ve e-selektin gibi adezyon moleküllerinin konsantrasyonundaki artışla başladığı; ardından, MMP gibi enzimlerce KBB yıkımının gerçekleştiği bilinmektedir (Comabella ve Khoury, 2012; Ghasemi vd., 2017).

MS patogenezinde, Th17'nin erken aşamalarda rol oynadığı düşünülürken, enflamasyonun daha ileri aşamalarda Th1'in rolünün olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.7) (Gatta vd., 2020). Patogenezi başlatan olayın, otoreaktif Th17 hücreleri başta olmak üzere miyelin-reaktif T hücrelerinin periferik dolaşımdan servikal lenf nodlarına ve BOS'a, ardından beyin ventriküllerinin iç yüzeyinde bulunan koroid pleksuslara, beyin ve omuriliği çevreleyen koruyucu zarlar olan meninkslere, son olarak da sinir hücrelerini ve destekleyici hücreleri içeren parenkime gelmesi olduğu düşünülmektedir (Bajan ve Hutvagner, 2020).



Şekil 1.7: MS patofizyolojisinde moleküler süreçler (Bajan ve Hutvagner, 2020). KBB: kan beyin bariyeri, MSS: merkezi sinir sistemi, IL:interlökin, Th: T helper (T yardımcı).

Bu geçiş patogenezin birinci dalgasıdır. KBB'nin bozulması ve miyelin-reaktif CD4+ T hücrelerinin KBB'yi aşmasından sonra bu lenfositler MSS'de enflamatuar bir yanıt başlatırlar. Akabinde, daha fazla sayıda Th1 ve Th17 hücresi MSS'ye göç eder (Comabella ve Khoury, 2012; Ghasemi vd., 2016). MSS'de, ASH kompartmanı olan MHC sınıf 2 vasıtasıyla tekrar antijen sunumu gerçekleşir. Bu süreci, otoreaktif hücrelerinin yeniden aktivasyonu (reaktivasyon) takip eder. Miyelin-reaktif CD4+ T hücreleri, miyelin antijenini tanıdıktan sonra proenflamatuar kemokin ve sitokinlerin salınımını uyarak enflamatuar süreci başlatır. Bu süreç, makrofajların, mikrogliaların ve sitotoksik CD8+ T hücrelerinin KBB'yi aşarak MSS'ye girmesine neden olur (Şekil 1.7). Hem CD4+ T hem de CD8+ T hücrelerinin tanımlanmış alt kümelerinin hastalık sürecinde önemli roller oynayabileceği birden fazla raporda gösterilmiştir (Öztürk vd., 2016; Zhang vd., 2020). CD4+ T hücrelerinin, B hücrelerinin antikor üretiminin düzenlenmesi, makrofaj fonksiyonlarının düzenlenmesi ve CD8+ T hücre yanıtının güçlendirilmesi gibi görevleri bulunmaktadır. CD4+ Th hücrelerinin, Th1 hücre tipi olarak farklılaştıklarında, makrofajları aktive eden interferon-gama (IFN-gama), makrofajların antimikrobiyal aktivitesini artıran ve iltihabı yayan tümör nekroz faktörü (TNF-α) gibi proenflamatuar

sitokinleri; Th2 hücre tipi olarak farklılaştıklarında, IL-4 ve IL-13 gibi iltihabı baskılayan antienflamatuvar sitokinleri; Th17 hücre tipi olarak farklılaştıklarında ise, IL-17, IL-21 ve IL-22 gibi iltihaplanmayı destekleyen sitokinleri serbest bıraktığı bilinmektedir (Gatta vd., 2020). MS patofizyolojisi birçok çalışmada temel olarak CD4+ T hücrelerine dayandırılmış olsa da (Aranami ve Yamamura, 2008; Stadelmann vd., 2011; Comabella ve Khoury, 2012) CD8+ T hücreleri de nöron ve oligodendrosit gibi hücreler üzerinde hasar oluşturarak ve apoptozu tetikleyerek patogenezin bazı basamaklarında rol almaktadırlar (Öztürk vd., 2016).

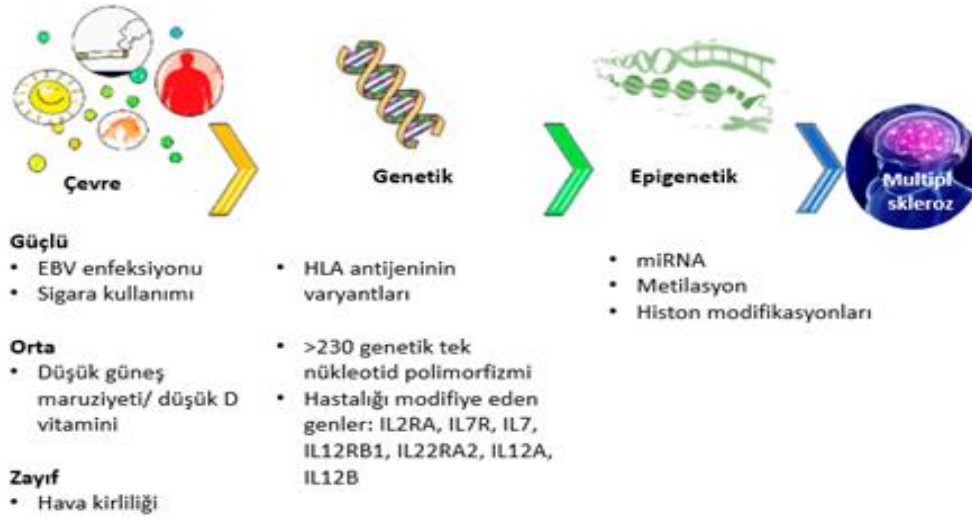
Enflamasyon, miyelin reaktif T hücrelerinin salgıladığı kemokinlerin etkisiyle belirgin hale gelir. Enflamasyonun tetiklenmesinde özellikle IL-1, IL-12, IL-17 ve IL-23'ün rolü olduğu ortaya konmuştur (Sevim, 2016). Son aşamada, miyelin yıkım ürünleri miyelin reaktif T hücreleri için yeniden hedef haline gelir. Bu duruma epitop döngüsü (epitope spreading) denir ve bu döngü demiyelinizasyon ve/veya aksonal hasar ile karakterize hastalık sürecini oluşturur (Wagner vd., 2020). Aksonal hasar kalıcı özüllükle ilişkilidir ve MS lezyonlarının erken patolojik bulgularında belirtilmiştir. Lezyonların mekânsal dağılımı, hastalığın farklı klinik tipleri ile bağlantılıdır (Trapp vd., 1998). Ataklarda yorgunluk, güçsüzlük, uyuşma, denge ve koordinasyon bozuklukları, konuşma bozukluğu gibi semptomların oluşması ise yukarıda bahsedilen patolojik süreçler sonucunda yavaşlamış ve/veya tamamen bozulmuş aksonal iletiye bağlıdır (Sevim, 2016).

1.1.4 Etiyoloji

MS'in etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte hastalığın ortaya çıkmasında çevresel faktörler, genetik faktörler ve epigenetik düzenlemeler arasındaki karmaşık etkileşimler rol oynamaktadır. Bağışıklık yanıtı sonucunda bağışıklık sistemi elemanları, miyelin kılıfı, oligodendrositleri, aksonları ve nöronları hedef alabilir ve bu yapılara zarar verebilir (Gatta vd., 2020). Genetik, epigenetik ve çevresel etmenlerin MS'in ortaya çıkmasında etkili olduğu bilinmektedir (Şekil 1.8) (Gatta vd., 2020).

Özellikle MS tanısı alan hastaların birinci derece akrabalarında hastalık riski belirgin bir şekilde artarken, tek yumurta ikizlerinde riskin %25-34 olması, MS gelişiminde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Sawcer, 2008). MS

duyarlılığını etkileyen ve MS riskini 2-4 kat artırdığı bilinen en güçlü genetik faktör insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen-HLA), *HLA DRB1*1501* haplotipi olup sağlıklı bireylerin yaklaşık %20-30'unda mevcuttur (Wansen vd., 1997; Hennig vd., 2008).



Şekil 1.8: MS risk faktörleri (Gatta vd., 2020). EBV: Epstein-Barr virüs, HLA: human leukocyte antigen (insan lökosit antijeni), IL: interlökin.

Barcellos ve arkadaşları (2003) ve Sawcer ve arkadaşları tarafından (2011) yapılan araştırmalar, MS için risk faktörü olan birkaç gen lokusunu ortaya çıkardı. Bunlar arasında *MHC HLA DR15/DQ6* alelinin en güçlü risk faktörü olduğu görülmüştür (Garg ve Smith, 2015). Bir başka çalışmada ise pek çok genin MS duyarlılığı ile ilişkili olduğu ve *HLA DQA1*0102*, *HLA DQB1*0602* ve *HLA DRB1*1501* gibi büyük doku uygunluk kompleksi genlerinin MS genetik riskinin %50'sinden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının sonuçlarına göre, IL-12 α ve IL-12 β gibi sitokinlere ilişkin genlerin yanı sıra T hücresi aktivasyonu için gerekli olan sinyalleri sağlayan CD80, CD86 gibi proteinlerle bağlantılı genlerin, MS için potansiyel risk faktörleri olabileceği düşünülmektedir (Garg ve Smith, 2015).

Vitamin D eksikliği, sigara kullanımı ve EBV ve benzeri bazı virüsler gibi çevresel faktörler MS patogenezinde rol oynayabilir. D vitamini, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol almaktadır. D vitamini etki mekanizmasının; makrofaj aktivasyonu, enflamatuvar sitokin inhibisyonu, artan antienflamatuvar sitokin üretimi ve T hücrelerinin olgunlaşma ve proliferasyonunun azalması olduğu düşünülmektedir.

(Royal vd., 2009; Sundqvist vd., 2010). D vitamininin MS patogenezinde immün-modülatör olarak görev alması, eksikliğinin MS için bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir. Bu konuya yönelik yapılan çalışmalarda, D vitaminin MS'e karşı koruyucu rolü olduğu öne sürülmüştür (Garg ve Smith, 2015).

EBV, TMEV, HCMV, *Chlamydia pneumoniae* gibi viral ve mikrobiyal ajanlar, MS için potansiyel tehdit olarak görülmektedir (Contini vd., 2008; Mecha vd., 2013; DiSano vd., 2019; Donati, 2020; Zabalza vd., 2020; Pike vd., 2022; Arjmandi vd., 2023). Literatürde, özellikle EBV'nin MS'e neden olabileceğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Lanz vd., 2022).

EBV ile ilişkili bir viral protein olan EBV nükleer antijen 1 (EBNA1)'in MS'i tetikleyebileceğini öne süren *in vitro* bir çalışmada, MS hastalarında ve sağlıklı EBV taşıyıcılarında EBV gen ürünlerine yönelik T hücre yanıtı değerlendirilmiştir. MS hastalarında EBNA1'e özgü CD4+ T hücresi yanıtlarının arttığı ve EBNA1'e özgü CD4+ T hücrelerinin, miyelin antijenleri ile çapraz reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Lünemann vd., 2008). Başka bir çalışmada, B hücresi serum antikorlarının hem EBNA1'e hem de MSS glial hücrelerinde sentezlenen glial hücre yapışma molekülüne (glial cell adhesion molecule, GlialCAM) yüksek afinite ile bağlandığı gerek HuProt mikrodizileri üzerinden analizlerle gerekse enzim bağlı immünosorban testi (enzim-linked immunosorbent assay, ELISA) ve western blot çalışmaları ile gösterilmiştir (Lanz vd., 2022). EBV aracılı MS gelişimi hipotezinin olası mekanizması, EBNA1 viral proteininin moleküler taklit yolu ile miyelin ve MSS antijenlerine karşı otoimmüniteyi indüklemesiyle açıklanabilir (Robinson & Steinman, 2022). EBV'nin MS için önemli bir risk faktörü olduğunu gösteren bir çalışmada, 20 yıllık bir süre boyunca (1993–2013) ABD ordusunda bulunan 10 milyondan fazla katılımcıdan oluşan bir kohort içinde MS geliştiren 801 kişiden alınan serumdaki EBV antikorları analiz edilmiştir. Her MS vakası için, MS'in başlangıç tarihinden önce en fazla 3 serum örneği incelenmiştir. Daha sonra bu veriler kontrollerden alınan örneklerle karşılaştırılmıştır. 801 MS vakasından yalnızca bir kişinin MS başlangıcından önce toplanan son serum numunesinde EBV testi negatif çıkmıştır. Başlangıçta, 801 katılımcıdan 35'i EBV negatif iken; biri hariç hepsinin takip sırasında EBV ile enfekte olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, EBV ile enfekte kişilerin MS'e yakalanma

olasılığının, enfekte olmayan kişilere göre 32 kat daha fazla olduğunu hesaplamıştır (Bjornevik vd., 2022).

MS'in bir başka olası çevresel nedeni olan sigara kullanımının, hastalık prognozunu olumsuz yönde etkilediği öne sürülmüştür (Healy vd., 2009). Wingerchuk ve arkadaşlarının (2012) ve Fragoso ve arkadaşlarının (2014) çalışmalarında, sigara kullanan bireylerin MS olma riskinin sigara kullanmayanlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür (yaklaşık 1.5 kat).

Epigenetik mekanizmalar, aynı çevresel etkilere maruz kalan, genetik olarak duyarlı bireylerin bir kısmının sağlıklı kalırken diğerlerinin hastalığa yakalanmasının altında yatan sebepleri açıklayabilmektedir. MS patogenezi için saptanan epigenetik mekanizmalar, deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu, histon modifikasyonu ve özellikle kodlamayan ribonükleik asit (RNA) molekülü olan mikroRNA (miRNA) seviyelerinin değişimleridir. Çeşitli miRNA'lar ile MS arasındaki ilişkileri gösteren çalışmalar 1.3.2 numaralı bölümle açıklanmaktadır.

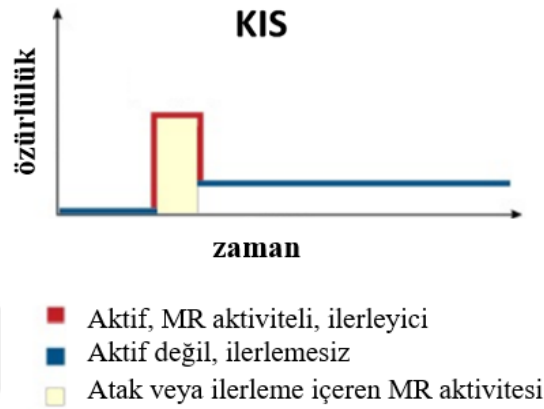
1.1.5 MS'in klinik alt tipleri

MS'te enflamasyon ve demiyelinizasyon beyin ve/veya omuriliğin herhangi bir bölgesinde ortaya çıkmaktadır ve bu süreçte lezyonların yerleşim yeri her hasta için farklıdır; dolayısıyla semptomlar da hastalar arasında çeşitlilik göstermektedir. En sık görülen klinik belirtiler optik nörit, beyin sapı ve omurilik semptomlarıdır; ancak baskın pariyetal lob sendromları gibi kortikal belirtiler dâhil olmak üzere birçok belirti mevcuttur. Heterojenitenin nedeni lezyonların beyinde ve omurilikte tutulum gösterdiği anatomik bölgeler ile ilişkilidir (Huang vd., 2017).

Hastalığın seyrinde görülen farklılıkların tanımlanması için, MS klinik alt tiplerine ayrılmıştır. Beyin ve omurilikte görülen ilk mikropsuz enflamatuvar atak klinik izole sendrom (KİS) olarak adlandırılır. Kesin MS tanısı alan hastalarda en yaygın olarak görülen (yaklaşık %85-87) MS tipi akut ataklarla seyreden RRMS'tir. Ayrıca MS'in, primer progresif (primary progressive; PPMS), sekonder progresif MS (secondary progressive; SPMS) tipleri de vardır (Efendi ve Yandım-Kuşçu, 2018).

1.1.5.1 Klinik izole sendrom

KİS, beyin ve omurilikte görülen ilk mikropsuz enflamatuar атаға verilen isimdir (Şekil 1.9, grafik çizgisindeki kırmızı rengin temsil ettiği kısım bu ilk атаğı göstermektedir). KİS’li hastaların kesin MS tanısı alması değışkenlik göstermekte olup, hastaların %30-70’inde MS gelişimi görülmektedir. KİS’e eşlik eden MRG'deki beyin lezyonları, kişinin ikinci bir nörolojik semptom атаğı yaşaması ve RRMS tanısı alma olasılığı yüksektir (Efendi ve Yandım-Kuşçu, 2018; Acar vd., 2021).

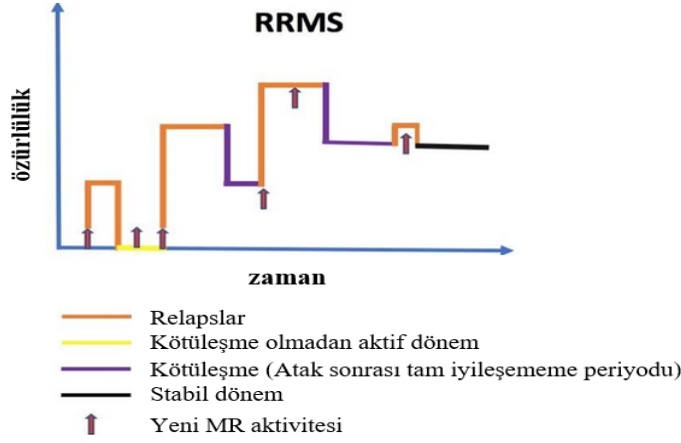


Şekil 1.9: KİS tipi zaman-özürlülük grafiğı (URL-6).

1.1.5.2 Relapsing-remitting MS

RRMS’te önceden tahmin edilemeyen ataklarla hastalık kötüleşirken, ara dönemlerde, tam ya da tama yakın düzelmeler görülmektedir (yineleyen-düzelen MS) (Şekil 1.10). Olgularda bulunan bazı nörolojik bozukluklarda tam veya kısmi iyileşme görülmektedir (Dobson ve Giovannoni, 2018). Atakların ne sıklıkla gerçekleşeceğini tahmin etmek mümkün değildir. Ancak bazı durumlarda yılda birkaç kez, bazen 2-3 yılda bir, ve hatta bazı hastalarda 15-20 yıl sonra bile ataklar meydana gelebilmektedir.

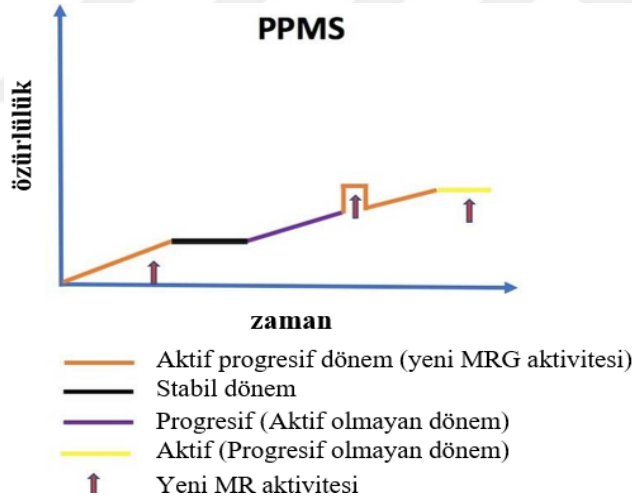
Yeni MRG aktivitesi, MS hastalarının beyin veya omurilik MRG taramalarında, daha önceki taramalarda bulunmayan yeni lezyonların veya lezyonlarda artan enflamasyonun belirtisidir. Şekil 1.10’da kırmızı oklarla gösterilen yeni MRG aktivitesi, genellikle bir atak ile kendini göstermektedir. Bazı RRMS hastaları süreç içerisinde, nörolojik fonksiyonların progresif olarak kaybolduğı ve iyileşmenin artık gerçekleşmediğı sekonder progresif faza girmektedir (Efendi ve Yandım-Kuşçu, 2018).



Şekil 1.10: RRMS tipi zaman-özürlülük grafiği (URL-7).

1.1.5.3 Primer-progresif MS (PPMS)

Atakların neredeyse hiç görülmediği, başlangıçtan itibaren sürekli ilerlemenin olduğu ve bu ilerleme hızının farklılık gösterdiği MS tipi olup giderek artan klinik kötüleşme ile karakterizedir (Şekil 1.11). Seyir hızlı ya da yavaş olabilir. Daha geç yaşlarda başlayan MS tipidir (Dobson ve Giovannoni, 2018).

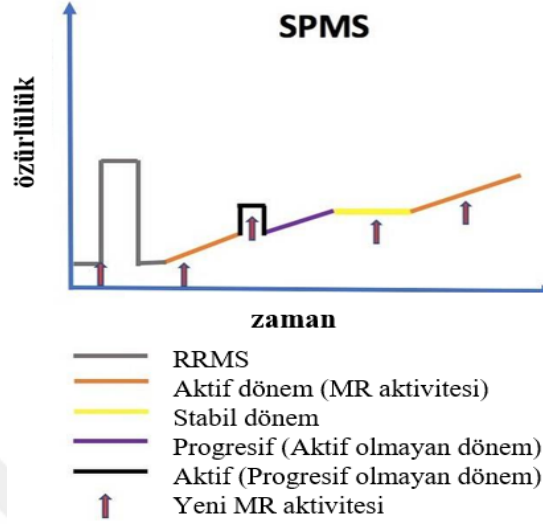


Şekil 1.11: PPMS tipi zaman-özürlülük grafiği (URL-8).

1.1.5.4 Sekonder-progresif MS (SPMS)

Sekonder progresif MS, atak ve iyileşme dönemlerinin birbirini takip ettiği bir seyir izlerken, zamanla atak sonrası iyileşmenin gerçekleşmediği bir hastalık formudur. MS hastalığının seyri üzerinde etkili olan mekanizmalar, özellikle de RRMS tipinden progresif forma geçiş mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Sakatlık zaman

içinde kademeli olarak artar (Şekil 1.12). Tipik olarak nörolojik işlevlerde ilerleyen bir düşüş ile karakterizedir ve genellikle daha önce geçirilen ataklar sırasında oluşan lezyonları içerir (Öztürk vd., 2016).



Şekil 1.12: SPMS tipi zaman-özürlülük grafiği (URL-9).

1.1.6 Tanı kriterleri

Heterojen bir klinik tabloya sahip olan MS hastalığının teşhisi konulurken, beyin ve/veya omurilikteki lezyonların ve bu lezyonlara bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablonun hem zamansal hem de mekânsal olarak yayılımının gösterilmesi ve MS ile karışabilecek diğer hastalıkların dışlanması metodu izlenir. 2017 McDonald tanı kriterleri, MS için kullanılan en güncel tanı kriterleridir. Bu kriterler, MS'in tanısını desteklemek ve kesinleştirmek için kullanılan klinik ve MRG verilerini bir araya getirir (Çizelge 1.1). Tanı kriterleri MS'in mekânda ve zamanda yayılımını gösterme temeline dayanmaktadır. Mekânda yayılım, birden fazla bölgede lezyon bulunmasını; zamanda yayılım ise zaman içinde atakların oluşumunu veya progresyonu tanımlamaktadır (Thompson vd., 2018).

MS tanısı için 2017 yılında güncellenmiş McDonald kriterleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir (Thompson vd., 2018; Efendi ve Yandım-Kuşçu, 2018):

Çizelge 1.1: MS tanı kriterleri (Thompson vd., 2018; Efendi ve Yandım-Kuşçu, 2018).

Atak	Objektif Klinik Bulgulu Lezyon Sayısı	MS Tanısı için Gerekli Ek Veri
≥2 atak	≥2	Yok ^a
≥2 atak	1+ öyküde başka bir alandaki lezyona ait atak ^b	Yok ^a
≥2 atak	1	MSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ^c ile mekânda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥2	Ek bir klinik atak veya (MRG) ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik oligoklonal bant (OKB) ^e varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	MSS’de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ^c ile mekânda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB ^e varlığı
Sinsi progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataklardan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2’si • MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥1 lezyon • Omurilikte ≥2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı

^a: Mekânda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak omurilik MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.
^b: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir. Öyküdeki atağa ait dokümanite edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuar demiyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır. ^c: MRG’de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve omurilik) 4 alanın ≥2’sinde ≥1 lezyon olması. ^d: MRG’de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG’de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG’sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması. ^e: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

1.1.7 MS tedavisi

Günümüzde MS’i tamamen ortadan kaldıracak kesin bir tedavi yoktur. Uygulanan tedavi yöntemleri, ataklar sırasında kullanılan kortikosteroidler ile, atakların şiddetini ve sıklığını azaltmayı amaçlayan immün baskılayıcı ve DMT ilaçları içermektedir (Dobson ve Giovannoni, 2018).

1.1.7.1 Akut atak tedavisi

MS’te, ateş ve enfeksiyon belirtisi olmaksızın en az 24 saat süren akut enflamatuar demiyelinizan süreçle uyumlu nörolojik bozukluklar atak olarak adlandırılmaktadır (Sevim, 2016). Glukokortikoidler, atakların şiddetini azaltarak ve sürelerini kısaltarak

ataklar için birinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. Kısa süreli klinik fayda sağlamaktadırlar ancak uzun dönem tedaviye etkileri yoktur. Tipik olarak, hastalara 3-5 gün boyunca günde 1 gram intravenöz (IV) metil prednizolon verilir. Glukokortikoid tedavisine dirençli hastalar için ikinci basamak tedavide, plazmaferez, IV immünoglobulin ve adrenokortikotropik hormonu seçenekleri vardır. Plazmaferez (plazma değişimi), glukokortikoidlere dirençli şiddetli semptomu olan vakalar için önemli bir tedavi seçeneğidir ve genellikle 14 gün boyunca gün aşırı 5-7 kez yapılmaktadır (Kausar, 2020).

1.1.7.2 Hastalığı modifiye eden tedaviler

Bu ilaçlar atak sıklığını azaltıp, MSS’de yeni lezyonların oluşumunu yavaşlatmakta ve/veya engellemektedir. Bu tedavilerin uygulanması sonucunda, hastalar uzun yıllar atak geçirmeden yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bu koruyucu tedaviler birinci basamak, ikinci basamak ve üçüncü basamak tedaviler olarak sınıflandırılmaktadır. Birinci basamak tedavi grubunda enjeksiyon yolu ile uygulanan interferon beta ve glatiramer asetat (GA) tedavilerine ek olarak oral yolla alınan teriflunomid ve dimetil fumarat bulunmaktadır (Dobson ve Giovannoni, 2018). İkinci basamak tedaviler, birinci basamak tedavileri en az bir yıl boyunca kullanmış olmasına rağmen atak geçiren, MR görüntülerinde yeni lezyonlar ortaya çıkan veya özürüllük düzeyinde artış gözlemlenen hastalara önerilmektedir. İkinci basamak tedavilere örnek olarak, fingolimod, kladribin ve ozanimod verilebilir. Üçüncü basamak tedaviler ise monoklonal antikorları içerir ve immünolojik hedeflere özgü moleküller olup, doğrudan bu hedeflere bağlanabilirler. Örnek olarak, alemtuzumab, natalizumab, okrelizumab verilebilir (Sevim, 2016). Bu tez çalışması kapsamında, GA tedavisi alan hastalar bulunduğu için, GA tedavisinin etki mekanizması aşağıda açıklanmıştır.

GA (COPAXONE®), polipeptit yapıda, MBP’deki 4 aminoasiti içeren (L-glutamik asit, L-alanin, L-tirozin ve L-lizin) sentetik immünomodülatör bir tedavi seçeneğidir. Bu tedavinin, atak sıklığını, şiddetini, yeni lezyon gelişimini ve lezyon yükünü azaltıcı etkileri gösterilmiştir (Loma ve Heyman 2011; Tsareva vd., 2011).

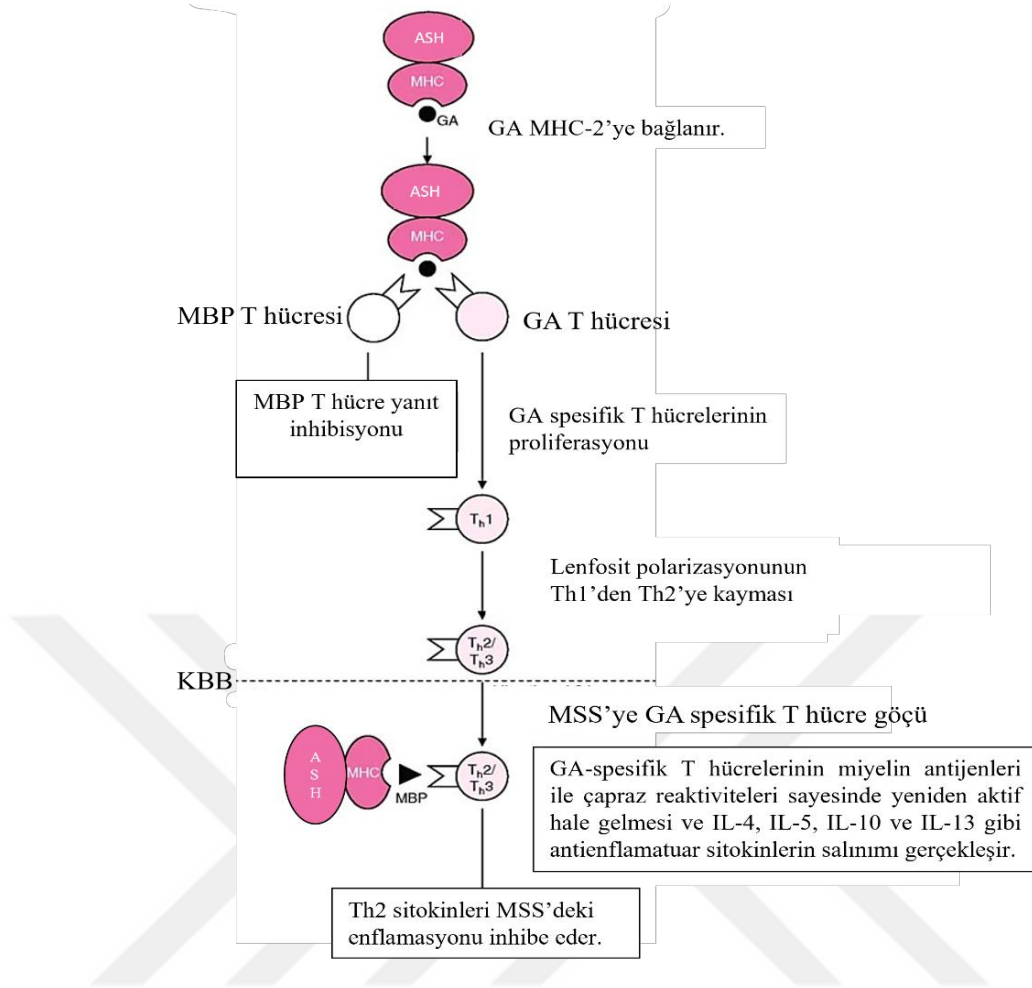
COPAXONE®, son iki yıl içinde en az iki fonksiyon bozukluğu atağı geçirmiş ve bu ataklardan tam veya kısmi iyileşme göstermiş RRMS hastalarında, klinik atakların sıklığını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Enjekte edilebilir preparatları vardır ve

günlük 20 mg subkütan (deri altı) uygulama ile kullanılmaktadır (Loma ve Heyman 2011; Tsareva vd., 2011).

İlacın etki mekanizması tam olarak karakterize edilememiştir (Melnikov vd., 2020). GA, hastalık seyrini miyelin spesifik yanıtları engelleyerek pozitif yönde etkileyen ilk immünomodülatör tedavi olarak kabul edilmektedir (Teitelbaum vd., 1971). GA'nın faydalı etkilerinin, MHC için diğer antijenlerle yarışmaya girmesi sonucu, lenfosit polarizasyonunu proenflamatuar Th1'den antienflamatuar Th2'ye kaydırmasından ileri geldiği düşünülmektedir. GA, MBP ve diğer miyelin antijenleri ile rekabete girerek MHC sınıf 2'ye daha yüksek afinite ile bağlanabilmekte ve MBP'nin MHC sınıf 2'ye bağlanmasını ASH düzeyinde inhibe edebilmektedir. Buna ek olarak MBP epitopu için T hücre reseptörünün bir antagonisti olarak hizmet edebilmektedir. GA'nın MHC sınıf 2 yüzeyi için MBP ile rekabete girmesi ile T hücre aktivasyonu sürecine müdahil olduğu düşünülmektedir (Sheremata ve Campos, 2016).

GA ile tedavi, periferde MSS'ye girebilen GA-spesifik Th2 popülasyonunun indüklenmesine yol açmaktadır. MSS'ye giren bu hücrelerin bir kısmı miyelin antijenleri ile çapraz reaktiviteleri sayesinde yeniden aktif hale gelmektedir. Yeniden aktif hale gelen lenfositlerin, yanıt olarak, lokal enflamatuar süreci azaltan (bystander suppression, izleyici baskılaması) IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 gibi antienflamatuar sitokinler salgıladıkları; remiyelinizasyon ve aksonal korumayı destekleyebilecek, beyinden türetilen nörotrofik faktör (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) gibi nörotrofik faktörleri ürettikleri gösterilmiştir (Sheremata ve Campos, 2016).

GA'nın, sadece Th2 hücre popülasyonunu değil aynı zamanda MS ile birlikte sayıca azaldığı tespit edilen ve güçlü bir immün baskılayıcı (Venken vd., 2008) olan düzenleyici T (regulatory T, Treg) hücrelerini de indüklediği *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Hong vd., 2005; Weber vd., 2007). Ek olarak CD8+ ve CD4+CD25+ Treg hücre popülasyonunun GA tedavisi ile indüklendiği ve miyelin degradasyonunun inhibe edilmesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Hong vd., 2005; Tennakoon vd., 2006; Jee vd., 2007; Baughman vd., 2011; Tyler vd., 2013; Prod'homme & Zamvil, 2019). Şekil 1.13 ve Şekil 1.14'te GA'nın bazı etki mekanizmaları sunulmuştur.



Şekil 1.13: GA'nın MS patofizyolojisindeki etki mekanizması (Sheremata ve Campos, 2016). ASH: antijen sunan hücre, KBB: kan beyin bariyeri, MBP: miyelin bazik proteini, MHC: major histocompatibility complex (majör doku uygunluk kompleksi), MSS: merkezi sinir sistemi, IL: interlökin, Th: T helper (T yardımcı).



Şekil 1.14: GA'nın MS'te spesifik etki mekanizması. ASH: antijen sunan hücre, GA: glatiramer asetat, KBB: kan beyin bariyeri, MBP: miyelin bazik proteini, MHC: major histocompatibility complex (majör doku uygunluk kompleksi).

1.1.8 Moleküler biyobelirteçler

WHO (2001) tarafından yapılan biyobelirteç tanımı, "Dokular, hücreler, biyolojik sıvılar gibi ortamlarda ölçülebilen ve hastalık veya gidişatı ile ilgili etki veya insidansların tahmin edilebilmesinde kullanılan herhangi bir madde, yapı ya da süreç" olarak ifade edilmiştir (Strimbu ve Tavel, 2010). Biyobelirteçler, biyolojik süreçlerin ölçülebilir göstergeleridir. Hastalık belirtilerini gösteren yapısal veya fonksiyonel biyobelirteçleri değerlendirmek için bilgisayarlı tomografi (BT), MRG veya pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır (García vd., 2018; Alonso-Hearn vd., 2023). Moleküler biyobelirteçler, ölçülebilir biyolojik süreçler ile klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi anlamak ve hastalık için tedavi seçeneklerini genişletmek amacıyla kullanılmaktadır. Moleküler biyobelirteçler RNA, miRNA, DNA, enzim, nükleik asit, peptitler, hormon gibi moleküler düzeyde ölçülebilen belirteçler olup vücut salgılarında, kanda, serumda, plazmada veya boşaltım ürünlerinde saptanmasına müteakip hastalığın tanısı, takibi, seyri ve tedavi geliştirme sürecinin iyileştirilmesinde önemli roller oynamaktadırlar. Kişiselleştirilmiş tıp alanında; özellikle doğru tanı, kişiye özgü tedavi seçimi, ilaç geliştirme ve yan etki riskinin azaltılması gibi durumlarda moleküler biyobelirteçlerden yararlanılmaktadır. Bir moleküler biyobelirteç, objektif olarak ölçülebilen, değerlendirilebilen, biyolojik süreçlerin, tedavi için farmakolojik reaksiyonların moleküler seviyede bir göstergesi olan, tespit edilebilir bir özelliktir (Michaličková vd., 2022; Paul vd., 2019; Vistbacka, 2022).

Belirli bir hastalığın teşhis edilmesi veya tanımlanması için diyagnostik, hastalığın seyrinin veya prognozunun değerlendirilmesi için prognostik, tedaviye veya terapiye yanıtı öngörmek için prediktif, ilacın vücutta ne kadar etkili olduğunu veya ilacın bir organizma üzerindeki etkilerini ölçmek için ise farmakodinamik biyobelirteçler kullanılmaktadır (Strimbu ve Tavel, 2010; Paul vd., 2019). Moleküler biyobelirteç ölçümleri genellikle laboratuvar ortamında, tıbbi cihazlarla veya portatif biyosensörlerle yapılır. ELISA gibi immünolojik yöntemler, belirli proteinlerin veya antikörlerin varlığını veya seviyesini tespit etmek için kullanılır. Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) gibi moleküler yöntemler, belirli genetik moleküler biyobelirteçleri tespit etmek için kullanılabilir (Bakshi vd., 2008; García vd., 2018; Alonso-Hearn vd., 2023). Biyobelirteçleri ölçmek için kullanılan bir diğer

teknik ise hızlı ve pratik olması yönüyle avantaj sağlayan biyosensörlerdir. Biyosensör bileşenleri genellikle, biyolojik hedefi veya biyolojik aktiviteyi tanıyan ve ölçülebilir bir duruma dönüştüren birinci bileşenden; bu sinyali alan, iletim elemanına gönderen ve algılama işlevini yerine getiren ikinci bileşenden (transducer) oluşur (Clark ve Lyons, 1962; Keskin-Arslan, 2020).

Moleküler biyobelirteç keşfinde, potansiyel adayların doğrulanması için hassasiyet, özgüllük testleri; biyobelirtecin farklı laboratuvarlarda ve zamanlarda tekrarlanabilir olup olmadığının değerlendirilmesi gibi detaylı çalışmalar yapılmalı ve büyük kohortlarda uzun vadeli klinik çalışmalar gerçekleştirilmelidir (Michalíková vd., 2022). Biyobelirtecin tanısal veya ayırım gücünün farklı gruplar arasında değerlendirilmesi, duyarlılık, özgüllük ve doğruluk gibi ölçülebilir temel özelliklerinin hesaplanması ile gerçekleştirilmektedir. Duyarlılık, hastalıktan fiilen etkilenenler arasında gerçek pozitif test sonuçlarının oranını tanımlamakta olup bir biyobelirtecin pozitif örnekleri doğru bir şekilde sınıflandırma yeteneğidir. Özgüllük, hasta olmayanlar arasında gerçek negatif sonuçların oranını göstermekte olup biyobelirtecin negatif örnekleri doğru bir şekilde sınıflandırma yeteneğidir (Vistbakka vd., 2017). Doğruluk ise biyobelirtecin pozitif ve negatif örnekleri doğru bir şekilde sınıflandırmasının bir ölçütüdür. Bir biyobelirtecin özgüllüğü, duyarlılığı ve doğruluğu için tek bir altın standart yoktur. Belirli bir hastalık için en iyi test, hastalığın yaygınlığı, diğer teşhis testlerinin mevcudiyeti ve yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların riskleri ve yararları dâhil olmak üzere bir dizi faktöre bağlıdır (Strimbu ve Tavel, 2010).

1.1.8.1 MS'teki biyobelirteç türleri

MS, klinik, radyolojik ve patolojik özelliklerde ve terapötik yanıtta yüksek derecede heterojenite ile karakterize edilen hastalıktır. Bu nedenle, hastalığın heterojenitesinin farklı yönlerini güvenilir bir şekilde tespit edebilen biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bu biyobelirteçler, MS hastalığının patofizyolojisini, tanısını ve prognozunu daha iyi anlamaya, tedaviye yanıt sonucunu tahmin etmeye yardımcı olabilir ve yeni tedaviler geliştirilmesine imkân sağlayabilir. Günümüzde MS'in prognozunu gösteren veya klinisyenlerin en iyi tedaviyi seçmesine yardımcı olacak onaylanmış bir biyobelirteç yoktur. MS için en güvenilir ve rutin olarak kullanılan tanı aracı MRG'dir. Spesifik

olarak, T2 ağırlıklı MRG hem beyaz madde hem de gri madde MS lezyonlarını tanımlamak için kullanılır. Bu lezyonların varlığı, nöro-aksonal hasar ve demiyelinizasyondan oluşan karışık patolojiyle birlikte enflamasyonu göstermektedir. Birçok klinisyen hastalığın ilerlemesini ve prognozunu değerlendirmek için yıllık MRG incelemelerini kullanır, ancak MRG sınırlı hassasiyete sahiptir ve pahalıdır (Igra vd., 2017). MS'in teşhisi, prognozu, tedaviye yanıtın izlenmesi ve yan etki riskinin değerlendirilmesi, belirli biyobelirteçlerin kullanımıyla kolaylaştırılabilir. Bunlara oligoklonal bant (OKB) immünoglobulin (Ig) G-indeksi, natalizumab ve IFN-beta'ya karşı nötralize edici antikolar dâhildir. Ayrıca, nörofilaman hafif zinciri düzeyleri (NfL) ve kitinaz-3-benzeri protein gibi umut verici biyobelirteç adayları vardır (Khademi vd., 2010; Vennegoor vd., 2012; Plavina vd., 2014; Arvin vd., 2023; Subramanyam vd., 2023). BOS biyobelirteçleri, özellikle MS'te düşük dereceli hastalık aktivitesi durumunda, klinik veya MRG değerlendirmelerine kıyasla daha duyarlı olma avantajına sahiptir. Klinik ölçekler ve/veya MRG ile hastalıklarının inaktif olduğu değerlendirilen bazı hastalar arasında, BOS NfL ve IgG indeksinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. NfL, MSS'nin miyelinli nöronları içinde bulunur ve nöronal hücreler hasar gördüğünde salınır. NfL'nin birçok nörodejeneratif ve travmatik bozukluktaki hastalık durumunu yansıtan bir BOS biyobelirteci olduğu keşfedilmiştir (Teunissen ve Khalil, 2012; Arvin vd., 2023). Serum örneklerinde NfL'nin doğru miktarının belirlenmesine yönelik yöntemlerde iyileştirmeler yapılmıştır; bu yöntemlerin MSS düzeyleriyle ilişkili olduğu ve aynı zamanda MRG bulguları ve klinik hastalık semptomlarıyla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalar NfL'nin MS hastalığı aktivitesini, şiddetini, prognozunu tahmin etmede bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Kuhle vd., 2016). Öte yandan, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda da BOS ve serumda artan NfL düzeyleri bildirilmiştir (Vinther vd., 2016; Ge vd., 2018; Marques vd., 2019; Cruickshank vd., 2020; Dhiman vd., 2020). Dolayısıyla, NfL'nin MS'e özgü bir biyobelirteç olmadığı ve MS tanısı için yalnızca NfL düzeylerine dayanmanın yeterli olmadığı görülmektedir.

IgG indeksi, serumdakine kıyasla BOS'taki IgG'nin albümine oranıdır (IgGcsf/IgGs)/(Albcsf/Albs). Bu oranın 0.7'den büyük olması genellikle MS tanısıyla sonuçlanmaktadır. OKB ve IgG indeksi gibi enflamasyon belirteçleri için BOS'un

analiz edilmesi tanıda yardımcıdır, ancak oligoklonal bantlar ve IgG indeksi nüksetmeyi ve ilerlemeyi öngörmek için ideal biyobelirteçler değildir. OKB'nin ölçülmesi çok hassas değildir; çünkü kaç tane bandın mevcut olduğunu belirlemek zor olabilmektedir. Ek olarak, kronik enflamasyona neden olan herhangi bir durum oligoklonal bantların yükselmesine neden olabileceğinden çok spesifik değildirler (Becker vd., 2015). Bir çalışmada, OKB pozitif hastalarının BOS'unda, hem kontrollere ($P = .01$) hem de OKB negatif hastalara ($P = .02$) kıyasla anlamlı derecede daha yüksek NfL seviyeleri tespit edilmiştir. Ayrıca OKB pozitif MS hastalarında IL-6, IL-8, IL-10 ve IFN-gama'nın da bulunduğu 12 enflamatuar molekülün seviyeleri hem kontrollere hem de OKB negatif MS hastalarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksektir ($P < .05$). MS biyobelirteçleri birlikte değerlendirildiğinde daha net ve verimli sonuçlar alındığı için, hastalık riski tek bir biyobelirteç ile değil, birden fazla biyobelirteci kapsayan, EDSS, MSSS puanlarını MRG lezyonlarını içeren bir panel ile değerlendirilmelidir (Farina vd., 2017).

miRNA'lar, yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda tek sarmallı RNA molekülleri olup, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Vücut sıvılarında stabiliteleri oldukça yüksektir ve bu nedenle güçlü biyobelirteç potansiyeli taşımaktadırlar (Weber vd., 2010). MS teşhisi ve prognozuna dair biyobelirteç keşfi çalışmalarında (Peng ve Croce, 2016); Eftekharian vd., 2019), MS'li bireyleri belirlemek veya bir tedavi sürecini yönlendirmek için miRNA profilleri incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada serum örnekleri incelenmiş olup MS'li hastalarda kontrollere kıyasla daha yüksek düzeyde hsa-miR-24-3p, hsa-miR-15-5p, hsa-miR-22 ve hsa-miR-30b-5p ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir (Mansoor vd., 2020). MS hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerin kan örneklerinin incelendiği bir çalışmada, MS hastalarında hsa-miR-145, hsa-miR-186, hsa-miR-664, hsa-miR-422a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-584, hsa-miR-223, hsa-miR-1275 ve hsa-miR-491-5p'nin kontrollere kıyasla daha yüksek ifade edildiği; hsa-miR-20b'nin kontrollere kıyasla daha düşük ifade edildiği bildirilmiştir (Keller vd., 2009; Ehya vd., 2017). Ayrıca, nöks fazı sırasında hsa-miR-18b, hsa-miR-493 ve hsa-miR-599'un yukarı regülasyonu gözlenmiştir (Otaegui vd., 2009). Başka bir çalışmada (Sievers vd., 2012) sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında tedavi edilmemiş RRMS hastalarının B hücrelerinde aşağı regüle edilen 49 miRNA ve natalizumab ile tedavi edilen RRMS hastalarının B

hücrelerinde yukarı regüle edilen 10 miRNA tanımlanmıştır. Sonuçta, MS için mevcut tedavilerin miRNA seviyelerini değiştirebileceği kavramı ortaya konulmuştur. miRNA'lar, hastalık mekanizmalarını anlamak, hastalığın seyrini tahmin etmek, tedavi yanıtını değerlendirmek ve yeni tedavi hedefleri belirlemek gibi alanlarda araştırılmaktadır. Bununla birlikte, miRNA'ların tam olarak nasıl çalıştığı ve MS'in karmaşık biyolojik süreçlerine nasıl katkıda bulunduğu hala tam olarak anlaşılmamıştır. Bu nedenle, miRNA'ların MS'te potansiyel biyobelirteç olarak kullanımı hala araştırma aşamasındadır ve daha fazla çalışma gerekmektedir (Keller vd., 2009).

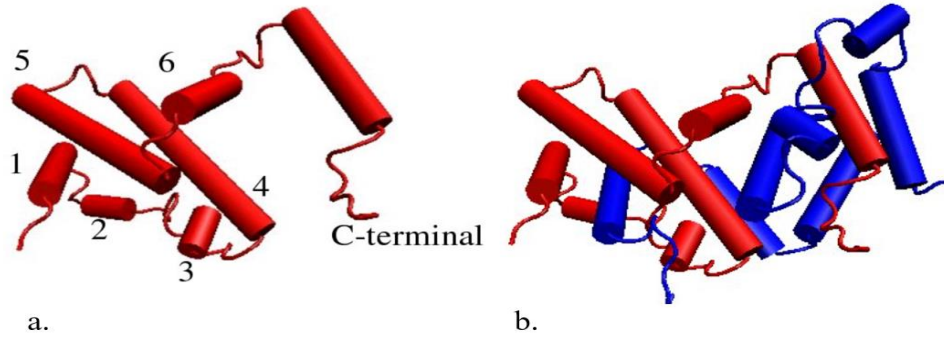
IFN-gama MS'de görülen enflamatuvar yolda önemli rollere sahiptir. MS ataklarından 2 hafta kadar öncesinde, IFN-gama ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Simpson vd., 2015). Bir klinik denemede sistemik IFN-gama uygulaması MS hastalarında hastalığın alevlenmesine yol açmıştır (Link vd., 1994). Diğer taraftan, IFN-gama'nın deneysel otoimmün ensefalomyelit (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) fare modelindeki semptomları azalttığı gözlenmiştir (Arellano vd., 2015). Bu durum IFN-gama'nın ikili rolünün daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerektiğini göstermektedir; bizim çalışmamız da bu amaca hizmet etmektedir. *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si ile hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyeleri; IFN-gama'nın ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkilemektedir (Fayyad-Kazan, 2014, Liu vd., 2020). Bu tez çalışmasında, plazmadaki IFN-gama seviyelerinin, bu seviyeleri etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonunun ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisinin olup olmadığı ve biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, sonraki bölümlerde IFN-gama, *IFNG* rs2069727 T/C, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'ye ayrıntılı bir şekilde yer verilmiştir.

1.2 IFN-gama

1.2.1 IFN-gama'nın yapısı

IFN-gama doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarda önemli görevlere sahip ve tip II interferon sınıfının bir üyesi olan glikoprotein yapısında bir sitokindir. Aşağıda IFN-

gama monomerlerinin (Şekil 1.15-a) ve dimerinin 3 boyutlu yapısal gösterimi (Şekil 1.15-b) verilmiştir (Thiel vd., 2000; URL-10).



Şekil 1.15: IFN-gama monomeri (a) ve dimerinin (b) 3D yapısı (URL-10).

1.2.2 IFN-gama'nın fonksiyonu

IFN-gama, CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile doğal katil (natural killer, NK) hücreleri tarafından salgılanır ve viral ve mikrobiyal enfeksiyonlara hücrel tepkiyi tetikler. IFN-gama, bazı genlerin ekspresyonunu değiştirerek görevlerini yerine getirir. Bunun için çoğu hücrenin yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasının ardından gen ekspresyonunu regüle eden Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) yolağını çalıştırır. Fonksiyonları arasında Th2 hücrelerin çoğalmasını engellemek, Th1 hücrelerin büyümesini uyarmak ve NK hücrelerin sitotoksitesini artırmak bulunmaktadır. IFN-gama'nın MHC sınıf 2 ekspresyonunu immün ve immün olmayan hücrelerde artırması otoimmünitenin patogeneze katkıda bulunabilir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alfa) ve IL-1 gibi diğer sitokinlerin ve T hücrelerinin MSS'ye alınmasının uyarılması da fonksiyonları arasında bulunmaktadır (Link vd., 1994). Anormal IFN-gama ekspresyonu, çeşitli otoimmün süreçlerle ilişkilendirilmiştir (Tran vd., 2000; Chen vd., 2009; Arellano vd., 2015).

1.2.3 IFN-gama ve MS patogenezi

MS patogenezi enflamatuar demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon aşamaları olmak üzere başlıca iki aşama içermektedir. MS patofizyolojisindeki yoğun immün aktivasyon, proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler arasındaki ilişkilerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. IFN-gama'nın MS'teki kesin rolü tartışmalı olmaya devam etmekte olup, IFN-gama'nın hem zararlı hem de koruyucu etkileri kanıtlarla öne sürülmüştür (Arellano vd., 2015).

IFN-gama'nın bağışıklık sistemindeki önemi, immün sistemi uyarıcı özelliğinden ve immünomodulator etkilerinden kaynaklanmaktadır. IFN-gama, makrofajların önemli bir aktivatörü ve MHC sınıf 2 ekspresyonunun indükleyicisidir. İmmünokimyasal çalışmalar MS hastalarının beyinlerinde sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek seviyede IFN-gama'nın varlığını göstermiştir. Dahası, MS hastalarında, MBP, PLP gibi miyelin antijenlerine karşılık IFN-gama salgılayan T hücrelerinin seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Link vd., 1994). RRMS hastalarının periferik kan mononükleer hücre (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) örnekleri ile yapılan bir çalışmada, IFN-gama ekspresyonunun, MS ataklarından yaklaşık 2 hafta kadar önce arttığı gözlenmiştir. Artmış IFN-gama seviyeleri artmış relaps riski ile ilişkili bulunmuştur (Simpson vd., 2015). IFN-gama, demiyelinizasyona yol açan mekanizmalar içinde yer almaktadır. Bir çalışmada (Vass vd., 1992), MSS'de aşırı IFN-gama ifade eden transgenik farelerin yaygın demiyelinizasyon geliştirdiği gözlenmiştir. Ek olarak, IFN-gama'nın nöronlar üzerindeki doğrudan etkisi gözlenmiş, sinaps oluşumunu bloke ettiği bulunmuştur (Kantarıcı vd., 2008). Tüm bu bulgular IFN-gama'nın MS patofizyolojisinde proenflamatuvar bir rol oynadığını göstermektedir. Öte yandan, bazı çalışmalarda, NK ve değişmez doğal katil T hücreleri (invariant natural killer T cells, iNKT) tarafından üretilen IFN-gama'nın, Th17 lenfositlerini inhibe ederek hastalık şiddetini azalttığı (Shokrgozar vd., 2009) gösterilmiştir. Ek olarak, IFN-gama'nın, nötrofillerde, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerde (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) ve IFN-gama kaynaklı dendritik hücrelerde (IFN-gama DC), CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu doğrudan inhibe eden nitrik oksit (NO) üretimini indüklediği gösterilmiştir (Montalvo vd., 2020). Ayrıca, Th1 tarafından salgılanan IFN-gama'nın, Th2 ve Th17 efektör hücrelerini inhibe edebildiği gösterilmiştir (Arellano vd., 2015). Dahası, CD8+ Treg'ler tarafından üretilen IFN-gama'nın, EAE fare modelindeki semptomları azalttığı görülmüştür. Bu araştırmalar, IFN-gama'nın MS patofizyolojisinde antienflamatuvar bir rol alabileceğini de göstermektedir. Dolayısıyla, IFN-gama'nın ikili rolüne dair daha araştırılması gereken çok fazla eksik alan olduğunu görülmektedir. Genetik varyantlar ve miRNA'lar IFN-gama'nın ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyebilir. Dolayısıyla bu faktörlerin MS'e yatkınlık, hastalığın seyri ve ciddiyetine etkileri yönünden daha detaylı incelenmesi gerekmektedir (McDonald vd., 2001; Lees ve Cross, 2007).

1.2.4 IFN-gama'nın GA ile ilişkisi

MS tedavisinde kullanılan DMT grubu ilaçlar arasında IFN-beta ve GA ilk nesil ilaçlar olup, enjeksiyon yolu ile uygulanmaktadırlar ve birçok ülkede tedavi için düşünülen birinci basamak ilaçlar arasındadırlar. IFN-beta ve GA'nın etki mekanizmasının, Th1 hücrelerinin aktivasyonuna ve proenflamatuar yanıtların azaltılmasına; Th2 hücrelerinin uyarılmasına ve antienflamatuar sitokinlerin salınımının indüklenmesine katkı sağladığı görülmüştür (Finkelsztejn vd., 2014). IFN-beta tedavisi IFN-gama üreten T hücrelerinin sayısını (Furlan vd., 2000) ve serumdaki IFN-gama konsantrasyonunu azaltmaktadır (Revel vd., 1995). IFN-gama'yı bloke eden uygulamaların MS tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Link vd., 1994b).

SPMS hastalarına IFN-gama antikorları verildiğinde klinik semptomlarında azalma görülmüştür (Skurkovich vd., 2001). Lenfositler tarafından düşük seviyelerde IFN-gama ekspresyonu, IFN-beta ile tedaviye olumlu bir yanıt verileceğinin işareti olarak görülmektedir (Kantarci vd., 2008). IFN-beta'nın yan etkileri nedeniyle günümüzde hastaların tercihi enjekte edilebilir tedaviler arasında, IFN-beta yerine GA'dan yana olmaktadır (Loma ve Heyman, 2011). Bu faktör de bu tez çalışmasında bu ilacın seçilmesinde etkili olmuştur.

MBP'deki 4 amino asiti içeren GA'nın etki mekanizmasının detayları tam olarak açıklanamamaktadır (Melnikov vd., 2020). Faydalı etkilerinin Th2 hücreleri uyarması ve MHC için diğer antijenlerle yarışmaya girerek Th1 hücrelerini baskılamasından ileri geldiği düşünülmektedir (Sheremata ve Campos, 2016). Yapılan çalışmalar sonucunda, GA'nın IFN-gama ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Melnikov vd., 2020; Ganji vd., 2020). Çalışmamızda, GA tedavisi alan RRMS hastaları ve naif RRMS hastaları IFN-gama ifade seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve GA tedavisinin IFN-gama ifade seviyelerine etkisi incelenmiştir.

IFN-gama ekspresyonunu etkileyebilecek çok sayıda faktör vardır. IFN-gama'yı kodlayan gendeki varyasyonlar ve IFN-gama ifade edilme seviyesini etkileyen miRNA'lar da dâhil olmak üzere bu faktörlerin açığa çıkarılması ve bir hasta için tedavi planı öncesi bilinmesi, tedavinin başarısı açısından önem arz etmektedir (Comi vd., 2001). Bu tez çalışmasında, IFN-gama ifade seviyelerini etkilediği düşünülen

IFNG rs2069727 T/C varyasyonunun ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin biyobelirteç olarak kullan labilirlikleri değerlendirilmiştir.

1.2.5 Genetik polimorfizm, *IFNG* geni ve SNP'ler

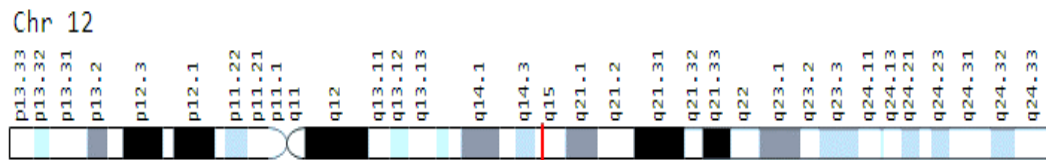
Genetik polimorfizm, bir popülasyonda farklı alellere bağlı olarak iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Normal popülasyonun % 1'inden daha fazla oranda bulunmaları gerekmektedir (Hanton vd., 2022).

Mutasyonlar hastalık nedeni, genetik polimorfizmler ise hastalığa yatkınlık nedeni olabilmektedirler. Bireyler arasındaki bu genetik farklılıklar gen üzerindeki tek bir nükleotidin farklı olmasından kaynaklanıyorsa bu duruma tek nükleotit polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) denmektedir (Hanton vd., 2022).

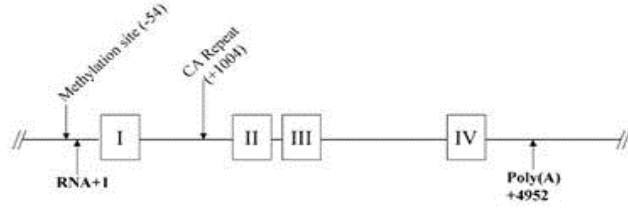
Kodlayan bölgede bulunan bazı SNP'ler, aminoasit dizisinin de i mesine sebep olmakta, protein yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilmektedir. Ek olarak, fonksiyonel SNP'lerin yaklaşık %93'ünün promotor, enhancer gibi bölgelerde bulunan dizilerde ve kodlamayan RNA'ların dizilerinde olduğu bildirilmiştir (Jazdzewski vd., 2008; Dezfuli vd., 2020).

Bireylerin hastalıklara olan yatkınlıkları ve ilaç metabolizmaları, DNA'larında bulunan SNP'lere göre farklılık gösterebilmektedir. Bu durumun keşfi ile SNP'ler, özellikle doğru tanı, kişiye özgü tedavi seçimi gibi alanlarda önemli bir parametre haline gelmiştir (Stevenson-Hoare vd., 2023).

 nsan IFN-gama proteinini kodlayan gen (*IFNG*), 12. kromozom üzerinde (12q24.1) bulunur ve 4 ekzonu vardır. Şekil 1.16'da genin 12. kromozomdaki konumu;  ekil 1.17'de ise *IFNG* geninin genomik yapısı verilmiştir.



Şekil 1.16: *IFNG*'nin 12. kromozomdaki yeri (URL-11).



Şekil 1.17: *IFNG*'nin genomik yapısı. I-IV numaralı kutular ekzonları ifade etmektedir (Young ve Hodge, 2003).

IFNG geninde ekspresyon seviyesini etkileyen SNP'ler ve mikrosatellitler bulunmaktadır. *IFNG* genindeki bu varyasyonlar IFN-gama proteininin yapısında, fonksiyonunda ve post-transkripsiyonel düzenleme aşamasında değişikliklere yol açabilir. Neticede, bu varyasyonlar, bağışıklık sisteminin adaptif ve doğal bağışıklık yanıtını düzenleyen bir sitokin olarak görev yapan IFN-gama'nın bağışıklık sistemi üzerindeki rolünü etkileyebilmekte ve çeşitli otoimmün hastalıklara karşı artan hassasiyetle ilişkilendirilmektedir (Young ve Hodge, 2003). 01.06.2023 tarihi itibarı ile NCBI SNP veri tabanındaki bilgilere göre bu gende 3031 SNP mevcuttur. +874A/T (rs2430561) SNP'si bu gendeki önemli bazı varyasyonlardan biridir ve *IFNG* geninde ilk intronda yer almaktadır. Bu bölgenin nükleer faktör-KB (NF-KB) bağlanma bölgesi olduğu ve IFN-gama protein seviyesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İran'da yapılan bir çalışmada +874A/T polimorfizmi ile MS arasında ilişki gözlenmemiştir (Izad vd., 2004; Shokrgozar vd., 2009). Yine İran'da yapılan benzer bir çalışmada ise +874A/T polimorfizminin MS için risk faktörü olduğu rapor edilmiştir (Shokrgozar vd., 2009). Rusya'da yapılan farmakogenetik bir çalışmada bu SNP'nin GA etkinliği ile zayıf bir ilişkisinin olabileceği hesaplanmıştır (Tsareva vd., 2011).

Bu gendeki diğer bir varyasyon 1. introndaki CA tekrarıdır. İtalya'da yapılan bir çalışmada 1. intron'daki CA tekrar bölgesinin MS ile ilişkili olduğu görülmüştür (Vandenbroeck vd., 1998). Öte yandan, Finlandiya'da ve İsveç'te yapılan çalışmalarda bu bölgenin MS ile ilişkisi bulunmamıştır (Wansen vd., 1997; Dai vd., 2001).

IFNG genindeki önemli bir diğer varyasyon ise genin aşağı akış yönünde bulunan rs2069727 T/C varyantıdır. Bu SNP tez çalışması kapsamında incelendiği için ayrı bir alt başlıkta verilmiştir.

1.2.5.1 *IFNG* rs2069727 T/C

MS genetiği üzerine yapılan çalışmalar bu hastalığın poligenik bir kalıtım modeli olduğunu göstermektedir. Özellikle Avrupa kökenli hastalarda *HLA* lokusu ile ilişki bulunmuş olsa da birçok hasta (%20-40) bu alelleri taşımamaktadır. Dolayısı ile diğer genetik faktörlerin hastalığa yatkınlığa katkıda bulunması gerekir. İlişkilendirme çalışmaları, alelik varyantların karmaşık özellikler üzerindeki nispeten küçük etkilerini ortaya çıkarmak için güçlü yöntemlerdir (Wansen vd., 1997; Hennig vd., 2008).

IFNG geninde bulunan rs2069727 T/C varyasyonu, çeşitli otoimmün hastalıklara karşı artmış hassasiyetle ilişkilendirilmiştir. Bu varyasyon 12. kromozom üzerinde, genin aşağı akış yönünde, 12:68154443 lokasyonunda bulunmaktadır ve polimorfik nükleotit Şekil 1.18’de mavi kare içerisinde gösterilmektedir (URL-12). Bu SNP’nin minor alel frekansı (MAF), farklı popülasyonlarda 0.11 ile 0.50 arasında değişmekte ve MAF, SNP veri tabanında C=0.259 (HapMap), C=0.275 (1000Genomes) olarak verilmektedir (URL-13).

```
68154271 TTCAGACAATAAAGCTGAAACTTAGACAATATACATAATGTATTAAAGGTCACACTACTTGTAAATGGAATAAAGTGGATTCCATCCAG
68154361 CCTTCTCCCTAGAGCTTACACCCCACTACTCCACCCCACTGGTGTGTTGCCAGCATTGGATGAGGGAGAGGAAGATTCTGAATCAAGGAG
68154451 GAAATAGGAAGGTGGAGAGGGGCTAGAAATAAATCTCTGTGTGCCAAGCTAAGCAGTTTAAACTACATTCATAGCAGAACTCTGAAT
68154541 TGAATAGTGACATAATTAATCTGTATCTTAGAAAGATAATTCAAAGAGCTGCTAACTGGAAAAGCGAAAGCCACAAATGCTAGTGGA
68154631 AAGAAATACCAATTTAATGGAACCAATGCAACTCTAAATTTCCACAGCTAAGAAGACTCCCTCCCTACTAATTCATTAATAGGTAG
68154721 TTCTTTCACTCCAGGTCTCACTTAGAAAAAGTCCAAACAGCATAGTAGTTGTGAACTTACACTTTATTCATATATATAGATATTGAT
68154811 AATTTTAAACAAATGAGTTAATTTCCATTTGGGTACAGTCACAGTTGTCAACAATATTTGGAAGCACCAGGCATGAAATCTCCTGAGATGC
68154901 TATGTTTTTCATCAGGGTCACCTGACACATTCAAGTTCTGTCTGACATGCCATTAAAGCACTGGCTCAGATTGCAGGCATATTTTCAAACC
68154991 GGCAGTAAGTGGATAGTATCACTTCACTTATAAGTGTTCATTGTATCATCAAGTGAATAAACACACACACCCATGGGATCTTGCTTAGGT
68155081 TGGCTGCCTAGTTGGCCCTCGAGATAAAGCCTTGTAATCAGATAGCCTTGCCCTAATTAGTCAGAAAAACAAAGGATTAAGTGAGACAGTCA
68155171 CAGGATATAGGAATTATAAATAATACATATATTAATAGATATTTCATTTTCATTACACAAAAGTTGCTATTATAAATACTTATTGATTGA
68155261 TGAGTCTAAAAATATATTTCCCATATAAATAATGTTAAATATTAATAAATAGATTTAGATTTAAATTCAAATATTGCAGGCAGGACAAAC
68155351 CATTACTGGGATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCATCTGACTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTGTAGCTGCTGGCGACAGTTTCAGCCATCACT
* Q S A R R G R F L M Q S R K R K G T K A A P S L E A M V
68155441 TGGATGAGTTTCATGATTGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTCAGTTACCTATCGGGAAAGAAAAGACAAAATTAATTTCAAGCATATAAG
Q I L E H I A K R Q V N L D T V
68155531 CCATCAGGATATTCTGCTAATGTGATGATGGTCAGTGAATAAAGTATTTCCTTTAAAAAATGGACCGTATTACCTTAATATACAAAT
68155621 TTAAGTTCTTCAGCAGTTGAAGCTAAAAATTACAAATACATTTCTAGTTGTGCTAATGTGGTGGAGTCCATCAGATATCTTTAAATCTA
68155711 CTCTATAGAAATCTTTGAAATTATATAGTGAAGAGACTCCTGGTTGTGGAGTCAGCATAAAAAGGTGGGTTTGAATCTCATGCAATGCAAT
68155801 AATTCAGCTGAGCTGAGCCAGCTACTTAACCTCTCTGAACCTCTATTTCTCATCTAAAGGAGGATGAGACTGTTCTATGACCTCTCTATC
68155891 ATCAATCTACCAATATATCACTTTATACTTCAGTCTTTCCCTGTATGCATCAAAATGAGTAACTATAGTCAATGATTCTCAGTGTGTGTC
68155981 ATAGCAGATTAAATCCGGAACCTGTCAAAGACCTCAGAGATCCAGGTGCATGAAGTGAAGGAGTGTGCCCTGTGCATTCACTAAAGCTCC
68156071 CCAGGTGATTCTGACATCCACCTAAGTTTGAGAACCACCTGATCTAGGTTAGGTACCCTAGAAAACACCAAAATCCAAAACAGTGAAGT
```

Şekil 1.18: *IFNG* geninin 3’UTR bölgesinin yakınındaki rs2069727 T/C SNP’si (URL-14).

Bu SNP’nin araştırıldığı Liu ve arkadaşlarının (2020) yaptığı bir çalışmada, otoimmün bir hastalık olan ankilozan spondilitli bireyler ile kontroller arasında C alel frekansları karşılaştırılmıştır. Çin popülasyonunda yapılan bu çalışmada hastalardaki C alel frekansı 0.276 iken kontrol bireylerdeki 0.164 olarak rapor edilmiştir ($P=.006$). Kantarcı ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada *IFNG* geni ve çevresindeki 20 belirteç MS riski açısından detaylı olarak incelenmiş, sonuçta, bu belirteçlerden

birçoğu MS ile ilişkili bulunmuş, ancak sadece erkek MS hastalarında bu ilişki gözlenmiştir. Bu SNP için G alelini taşıyan erkeklerde, bu aleli taşımayanlara kıyasla, daha yüksek IFN-gama ekspresyon seviyesi olduğu tespit edilmiştir (Kantarci vd., 2008).

miRNA'lar gen ekspresyonunu genellikle mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanarak değiştirirler (Feinbaum vd., 1993). Bu çalışmada *IFNG* genetik varyasyonları arasında miRNA'ların bağlanma bölgesi yakınında yer alan rs2069727 T/C SNP'si, Türkiye'de ilk kez olmak üzere MS riski açısından incelenmiştir. *IFNG* 3'UTR'sinde miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin potansiyel hedef bölgeleri bulunmaktadır ve miR-24 ve miR-181'in, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Fayyad-Kazan, 2014). Çalışmamızda, *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonunun ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinin IFN-gama seviyelerine etkileri ve MS hastalığı ile ilişkileri incelenmiştir.

1.3 miRNA'lar

miRNA'lar, yaklaşık 20-22 nükleotit uzunluğunda, tek sarmallı, gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak etkileyen, kodlamayan RNA'lar olup üç ana bölümden oluşmaktadırlar. Üç harfli ilk kısım hangi türde bulunduğunu gösterir (hsa-H.sapiens). İkinci bölümde yer alan '-miR-' ifadesi olgun miRNA'yı, '-mir-' ifadesi ise *miRNA* genini ve stem-loop yapısını temsil etmektedir. Olgun miRNA'lara '-miR-' ekinden sonra eklenen sayı üçüncü kısmı oluşturmaktadır. Ayrıca, 1 veya 2 nükleotit farklılık gösteren olgun miRNA dizileri için son ek içeren harfler verilmektedir (örneğin: miR-181c ve miR-181d). miRNA kök-halka yapısında 3' uçta bulunan bölgeden olgunlaşan miRNA isminin sonuna '3p' ifadesi eklenirken 5' uçta bulunan bölgeden olgunlaşan miRNA isminin sonuna '5p' ifadesi eklenmektedir (Soyocak, 2018).

miRNA'lar 1993 yılında Victor Ambros'un dönüm noktası niteliğindeki keşfi ile gen düzenlemesi için temel moleküller olarak kabul edilmişlerdir (Ambros vd., 1993). miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri lineage-4 (lin-4) ve lethal-7 (let-7)'dir. Ambros laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmada, yuvarlak solucanda (*Caenorhabditis elegans*) bulunan *Lin-4* geninin 22 nükleotit uzunluğunda 'lin-4' miRNA'sını

transkribe ettiği görülmüştür. *Lin-4* geninin, *lin-14* mRNA'sının tekrarlayan bir dizisine (3' untranslated region, 3'UTR) tamamlayıcı diziler içerdiği de bulunmuştur. Lin-4 olarak keşfedilmiş miRNA'nın, *Caenorhabditis elegans*'ın erken larva gelişimi ve segmentasyonunda önemli bir role sahip olan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *lin-14* geninin ekspresyonunu azalttığı ve DNA dizi analizinde protein ürününün bulunmadığı gözlenmiştir (Feinbaum vd., 1993). Lin-4'e benzer olarak, Reinhart ve arkadaşları tarafından yine *C. elegans*'ta 21 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol eden farklı bir miRNA daha keşfedilmiştir (Reinhart vd., 2000). Bu transkriptlerin fonksiyonlarının keşfi, hücresel ve gelişimsel biyolojinin ve birçok hastalığın moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Su vd., 2012). Örneğin, *C. elegans*'ta *lin-4* kaybı, ciddi gelişimsel bozukluklara neden olmuştur (Feinbaum vd., 1993). Sonuçta, miRNA'ların gelişimde anahtar oyuncular olduğu gösterilmiştir. İlk miRNA keşfinden bu yana pek çok miRNA tipi tespit edilmiş ve bazılarının türler arasında yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2012).

miRNA dizisinde yer alan 2-8 nükleotit uzunluğundaki çekirdek dizi (seed sequence), hedef mRNA'nın 3'UTR, 5'UTR veya açık okuma zinciri (open reading frame, ORF) bölgelerinde bulunan tamamlayıcı diziye spesifik olarak bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde etkilemektedir. Bu etki miRNA-mRNA arası eşleşen baz sayısına bağlı olarak, mRNA parçalanması, translasyon aşamasının baskılanması gibi çeşitli mekanizmalarla kendini göstermektedir. Bu sayede miRNA'lar ifade edilen proteinlerin seviyesini değiştirerek hücresel büyüme, proliferasyon, farklılaşma, hücre döngüsü, yaşlanma ve apoptoz gibi yollarda rol oynamaktadırlar (Treiber vd., 2019).

miRNA genleri, gen içinde dağınık ya da kümelenmiş bir şekilde veya genler arasında bulunmaktadır. Gen içinde bulunan miRNA'lar intronik veya ekzonik bölgelerde bulunabilmektedir. Belirli bir miRNA'nın ifade edilme seviyesini etkileyebilecek pek çok faktör vardır (Machowska vd., 2022). Bu faktörlerin belirli bir kombinasyonunun bazı kişilerde bir arada bulunması bu kişilerin bazı kompleks hastalıklara karşı yatkın olmasına yol açabilmektedir (Manna vd., 2018).

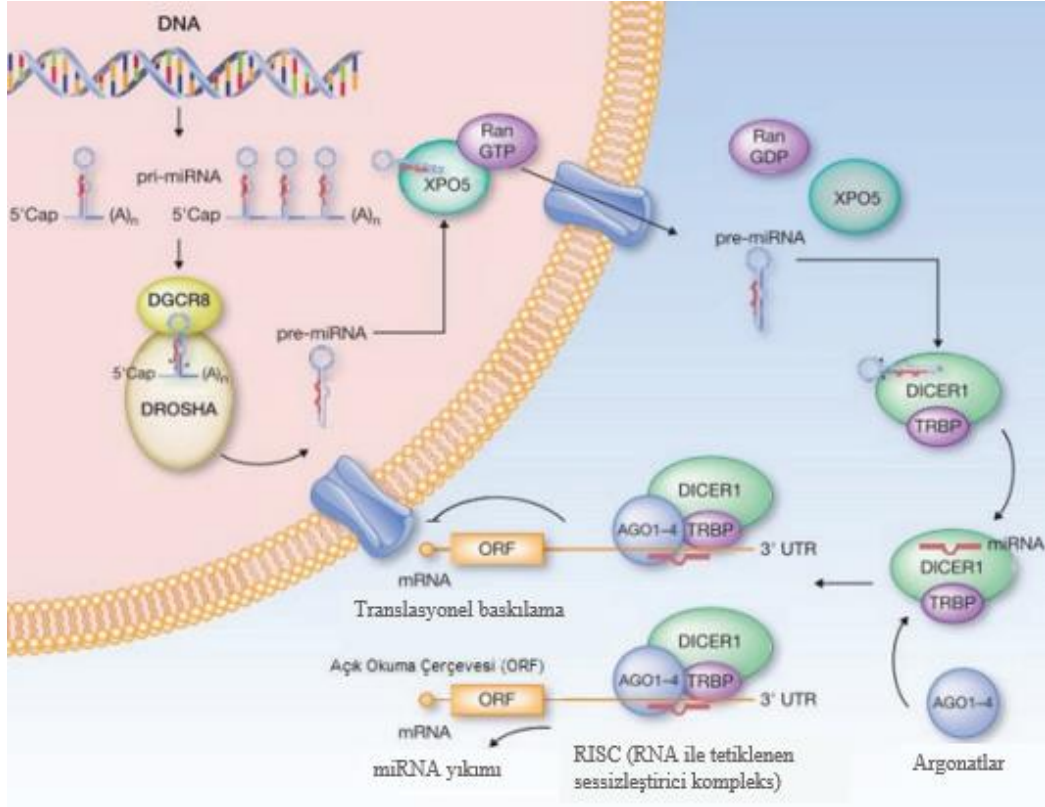
Günümüzde miRNA'ların farklı ifade profilleriyle birçok hastalık arasında ilişki bulunmuştur. Anormal seviyelerde miRNA ekspresyonu, kanser ve nörolojik

bozukluklar da dâhil olmak üzere birçok farklı hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Manna vd., 2018; Regev vd., 2018; Shademan vd., 2020). Her ne kadar hücre içinde görev yapan araçlar olsalar da eksozomlar, mikroveziküller gibi çeşitli biçimlerde ekstrasellüler alana bırakılan miRNA'lar, serum, plazma gibi sıvılarda tespit edilebilir ve kanser dâhil çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilebilir. Serum ve plazma, MS gibi çeşitli hastalıklarda üzerinde iyi çalışılmış, nispeten kolay ulaşılabilir, hasta konforunu gözetken, uygun yarı-invaziv biyolojik örneklerdir (Mansoor vd., 2020).

1.3.1 miRNA biyogenezi

miRNA biyogenezi ilki çekirdekte ikincisi sitoplazmada olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Genelde RNA polimeraz II aracılığıyla, primer-miRNA (pri-miRNA) adı verilen saç tokası yapısında bir RNA transkribe edilir. Saç tokası yapısı, Drosha ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den oluşan mikroprosesör tarafından kesilir. Sonucunda pri-miRNA kesilerek 70-100 nükleotit uzunluğundaki öncü miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) oluşturulur. Ardından pre-miRNA, Exportin-5 ile çekirdekten sitoplazmaya geçirilir. İkinci aşamada sitoplazmada bulunan pre-miRNA RNaz enzimi olan Dicer tarafından kesilir (Treiber vd., 2019).

Dicer enzimi tarafından kesilen pre-miRNA'lar, 3' uçlarında 2 nükleotit uzunluğunda çıkıntı kalacak biçimde, 18-25 nt uzunluğunda çift iplikli olgun miRNA'lara dönüşürler. Son olarak çift iplikli miRNA'ların bir ipliği bozulurken, diğer ipliği (rehber dizi), Argonat-2 (Ago-2) bağlı RNA susturma kompleksine (RNA-induced silencing complex, RISC) bağlanır. RISC, hedef mRNA'lara genellikle 3'UTR bölgesinden bağlanır. Bu miRNA-mRNA spesifik baz eşleşmesinin ardından, miRNA RISC'i indükleyerek mRNA'nın yıkımına ya da translasyonun baskılanmasına neden olur (Şekil 1.19) (Treiber vd., 2019).



Şekil 1.19: miRNA biyogenezi (Soyocak, 2018). AGO: argonat, DGCR8: DiGeorge sendromu kritik bölgesi 8, XPO5: eksportin 5, TRBP: transactivation-responsive RNA-binding protein (transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein).

1.3.2 miRNA'ların MS ile ilişkisi

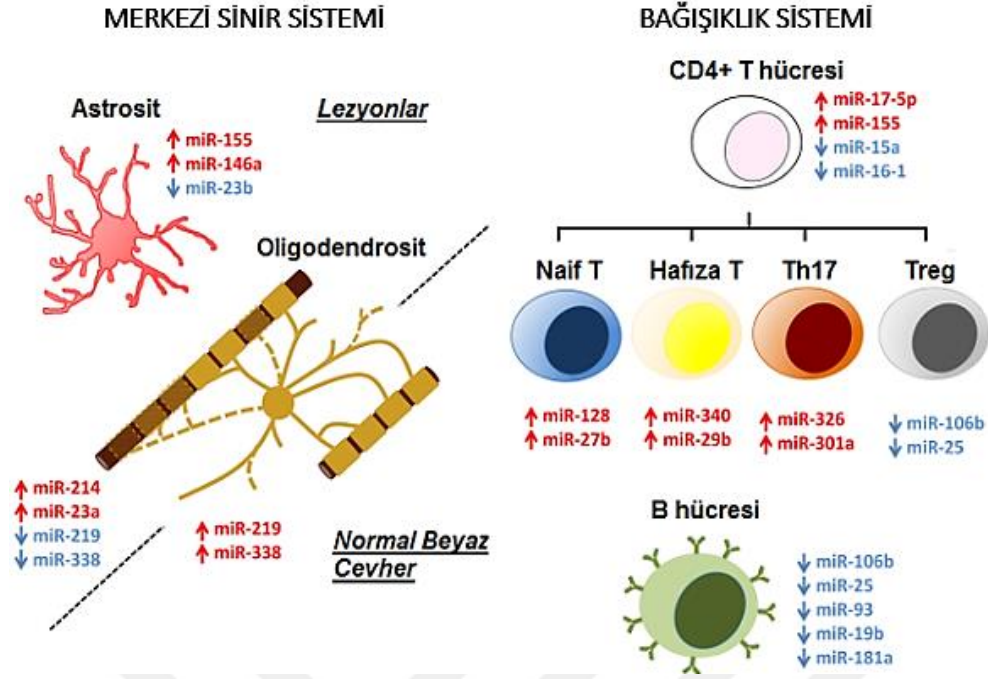
İnsan bağışıklık sisteminde miRNA'lar, bakterilere, virüslere ve diğer patojenlere karşı doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık tepkilerini düzenlemede önemli rollere sahiptirler. T ve B hücrelerinin gelişimi, farklılaşması ve biyolojik aktiviteleri spesifik miRNA'lardan etkilenmektedir. Birçok araştırmacı bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyen miRNA'ları profillemek için pek çok çalışma yapmıştır. Sonucunda hastalıkla birlikte düzensiz ifade edilen birçok miRNA bulunmuştur. MS hastalarında bağışıklık sistemi hücrelerinde ve MSS lezyonlarında düzensiz ifade edilen miRNA seviyeleri Şekil 1.20'de verilmiştir. Kırmızı ok hastalıkla birlikte yukarı regülasyonu, mavi ok ise hastalıkla birlikte aşağı regülasyonu temsil etmektedir (de Faria vd., 2013). RRMS hastalarının CD4⁺ T hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla, yüksek hsa-miR-17-5p seviyeleri bulunmuş, bu miRNA seviyeleri, lenfosit gelişiminin, aktivasyonunun farklı aşamalarını düzenleyen fosfoinositid-3-kinaz, düzenleyici alt birim-1 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit-1, *PI3KR1*) gibi hedeflenen

genlerin aşağı regölasyonuna yol açmıştır (Lindberg vd., 2010). Başka bir çalışmada yine RRMS hastalarının CD4+ T hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla, hsa-miR-15a'nın ve hsa-miR-16-1'in, aşağı regölasyonu gözlenmiştir (Lorenzi vd., 2012). Çalışmanın devamında ise, hsa-miR-15a ve hsa-miR-16-1'in B hücreli lösemi/lenfoma 2 (B-cell leukemia/lymphoma 2, *BCL2*) genini hedeflediği biyoinformatik olarak gösterilmiş ve bu miRNA ifadelerinde görölen düzensizliğin, BCL2 proteininin yüksek düzeyde ifade edilmesine sebep olduğu ileri sürölmüştür (Lorenzi vd., 2012).

Tam kandan yapılan bir çalışmada, MS hastaları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmış hsa-miR-17 ve hsa-miR-20a seviyeleri tespit edilmiştir. Özellikle hsa-miR-17 ve hsa-miR-20a'nın, T hücresi aktivasyonunda yer alan genleri bloke ettiği gösterilmiştir (Cox vd., 2010). Ayrıca tam kanda, 165 miRNA'nın önemli ölçüde yukarı veya aşağı regöle edildiği rapor edilmiş ve hsa-miR-145, son derece hassas, spesifik ve doğru bir tanısai biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Keller vd., 2009). hsa-miR-21, hsa-miR-146a ve hsa-miR-146b'nin, RRMS hastalarından alınan tüm PBMC örneklerinde kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı bildirilmiş ve tanısai biyobelirteç olma potansiyelleri ortaya atılmıştır (Martinelli-Boneschi vd., 2011).

MS'li hastaların serum ve plazma örneklerinde azalan veya artan miRNA'lardan bazıları bildirilmiştir. Waschbisch ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, 5 miRNA (hsa-miR-20b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a, hsa-miR-155 ve hsa-miR-326) seçilmiş ve ekspresyon seviyeleri incelenmiştir (Waschbisch vd., 2011).

Tedavi almamış MS hastaları ile kontroller bu miRNA seviyeleri açısından karşılaştırılmıştır. Sonucunda, hsa-miR-20b için fark görölmezken, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a, hsa-miR-155 ve hsa-miR-326 ekspresyonlarının tedavi almamış MS hastalarında kontrollere göre 2-3 kat artmış olduğu gözlenmiştir. Bu miRNA'ların ekspresyonu tedavi almamış MS hastaları ve IFN-beta tedavisi alanlar arasında değişmezken, hsa-miR-146a ve hsa-miR-142-3p ekspresyonunun GA tedavisi alanlarda düşük olduğu bulunmuştur (Waschbisch vd., 2011).



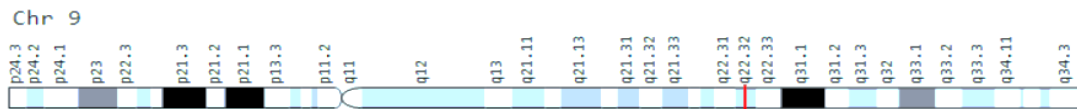
Şekil 1.20: MS hastalarında bulunan bağışıklık sistemi hücrelerinde ve MSS lezyonlarında düzensiz ifade edilen bazı miRNA'lar (de Faria vd., 2013). Th: T helper (T yardımcı), Treg: T regülatör.

miRNA-ilaç ilişkisinin serumda incelendiği bir çalışmada, serumdaki eksozom yapıları izole edilerek içlerindeki miRNA'lardan bir grubu incelenmiştir. Sonuçta IFN-beta tedavisinden sonra ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar rapor edilmiştir (Manna vd., 2018).

Bu tezde, bölüm 1.2.3'te bahsedilen ve MS patofizyolojisinde önemli rollere sahip olan IFN-gama seviyelerinin ve bu seviyeleri etkileyen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin (Fayyad-Kazan vd., 2014) MS ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu nedenle bölüm 1.3.3 ve 1.3.4'te bu miRNA'lar anlatılmıştır.

1.3.3 hsa-miR-24-3p

hsa-miR-24-3p'nin dizisi, hsa-miR-24-1'in ürünüdür. hsa-miR-24-1 geni 9. kromozom üzerinde q kolunda, 9q22.33 sitogenik lokasyonunda ve 95086021-95086088 genomik koordinatında bulunmaktadır (Şekil 1.21).



Şekil 1.21: hsa-miR-24-1 geninin 9. kromozomdaki konumu (URL-15).

oynayabileceği (Du vd., 2013) gösterilmiştir. hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyelerinin kardiyovasküler hastalıkla ilişkilendirildiği bir çalışmada, hsa-miR-24-3p'nin mitokondriyal protein sentezini ve enerji metabolizmasını stabilize edebilen bir protein olan prohibitin-2'yi (PHB-2) aşağı yönde düzenleyerek kardiyak fibroblast mitofajisini baskıladığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2022).

hsa-miR-24-3p hedef geni ATPaz tip 13A2'nin (*ATP13A2*) Parkinson hastalığına yol açabilecek çeşitli hücreyel yollarda yer aldığı bilinmektedir (Yousefi vd., 2022). hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyelerinin Parkinson hastalığındaki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, hastalar ve kontroller hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılmıştır. Parkinson hastalarında kontrollere kıyasla, hsa-miR-24-3p'nin önemli ölçüde aşağı regüle edildiği görülmüştür. Bunun sonucunda ATP13A2 ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Bu durumun, post-transkripsiyonel baskılama için yeterli seviyede hsa-miR-24-3p olmaması sonucunda normal seviyelerde miRNA-mRNA baz eşleşmesinin gerçekleşmemesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Yousefi vd., 2022). Diğer taraftan Alzheimer hastalarındaki hsa-miR-24-3p seviyeleri kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. hsa-miR-24-3p, amiloid-β plaklarının üretimi ve birikimi ile nörofibriler demetlerin oluşumunu destekleyen krüppel benzeri faktör 8 (krüppel-like factor 8, *KLF8*) geninin ifadesini negatif olarak düzenlemektedir. Alzheimer hastalığı ile ekspresyonu normal seviyenin üzerine çıkan hsa-miR-24-3p'nin kontrollere kıyasla daha fazla sayıda miRNA-mRNA baz eşleşmesine katılması sonucunda, *KLF8* mRNA'sının post-transkripsiyonel olarak baskılandığı öne sürülmüştür (Yi vd., 2014; Jing vd., 2020).

hsa-miR-24-3p ile MS ilişkisinin incelendiği çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Vistbakka ve diğerleri tarafından (2017) Finlandiya'da yapılan bir çalışmada progresif MS'li hastalarda serumdaki miRNA seviyeleri incelenmiştir. hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-128-3p ifade edilme seviyesinin PPMS hastalarında SPMS hastalarındakine kıyasla artmış olduğu görülmüştür. Ancak bu çalışmada RRMS hastaları incelenmemiştir. Vistbakka ve diğerleri tarafından yapılan ikinci çalışmada (2018) hsa-miR-24-3p de dâhil olmak üzere 4 miRNA'nın ifade edilme seviyesi 53 RRMS, 20 PPMS ve 27 kontrolden oluşan çalışma grubunun serum örneklerinde incelenmiştir. hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-191-5p'nin seviyelerinin RRMS ve PPMS hastalarında

kontrollere kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur. Bu iki hasta grubu arasında ise fark gözlenmemiştir. hsa-miR-24-3p ayrıca tüm hastalardan oluşan birleştirilmiş grupta engellilik ilerleme indeksi ile pozitif korelasyon göstermiştir (Vistbakka vd., 2018). Ancak, Vistbakka ve arkadaşlarının çalışmasında yalnızca miRNA'lar incelenmiş olup bu tez çalışmasındaki gibi plazma IFN-gama seviyesi veya *IFNG* genetik polimorfizmleri incelenmemiştir. Bir sonraki bölümde hsa-miR-24-3p ile *IFNG* geni arasındaki ilişki açıklanmıştır.

1.3.3.1 hsa-miR-24-3p ve *IFNG*

miRDB veri tabanı incelendiğinde hsa-miR-24-3p'nin *BCL-2*, kaspaz 3 (*CASP3*), *CASP6*, *CASP9*, interlökin 10 reseptör alfa ve beta (*IL10RA*, *IL10RB*), *IL17RA*, IFN-gama reseptör 2 (*IFNGR2*) gibi tahmin edilen yüzlerce hedef geni olduğu görülmüştür (URL-17). hsa-miR-24-3p'nin hedefleri arasında *IFNG* geni de yer almaktadır. miR-24-3p için en ilgili bulunan GO (Gene Ontology) terimi “negative regulation of IFN-gamma production” olarak verilmektedir (mirbase.org). miR-24-3p'nin hedef bölgesi *IFNG* mRNA'sının 3'UTR'sinde yer almaktadır (Fayyad-Kazan vd., 2014). *IFNG* 3'UTR'sinde miRNA'ların potansiyel hedef bölgeleri Şekil 1.22'de gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014).

IFNG 3'UTR (582 bp)

```

TGGTGTCTGCTGCGTCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTAT
TAATATTACATTATTATATGGGGAATATATTTTAGACTCATCAA
TCAAATAAGTATTATAATAGCAACTTTTGTGTAATGAAAATGAATA
TCTATTAATATATGTATTATTATAATTCCTATATCCTGTGACTGTCT
CACTTAATCCTTTGTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGATTAC
AAGGCTTATCTCAGGGGCCAACTAGGCAGCCAACCTAAGCAAGAT
CCCATGGGTGTGTGTTATTTCACCTGATGATACAATGAACACTTAT
AAGTGAAGTGATACTATCCAGTTACTGCCGTTTGAAAATATGCCTG
CAATCTGAGCCAGTGCTTTAATGGCATGTCAGACAGAAGCTTGAATGT
GTCAGGTGACCCTGATGAAAACATAGCATCTCAGGAGATTTCATGCC

```

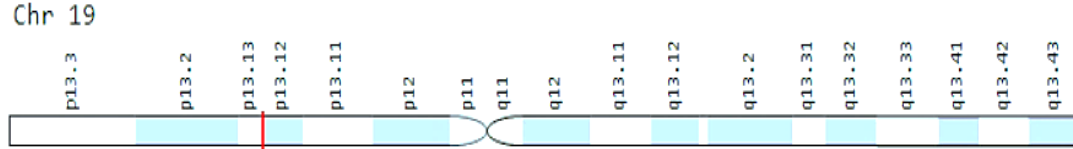
Şekil 1.22: *IFNG* 3'UTR'sinde miRNA'ların potansiyel hedef bölgeleri (Fayyad-Kazan vd., 2014).

Fayyad-Kazan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, miR-24-3p ve miR-181d-3p'in, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak *IFNG* mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan

vd., 2014). miR-24-3p'nin *IFNG*'nin kodlayan bölgesinde de hedef bağlanma yeri olduğu tespit edilmiştir (URL-18).

1.3.4 hsa-miR-181d-3p

hsa-miR-181d-3p'nin dizisi, hsa-miR-181'nin ürünüdür. hsa-miR-181d geni 19. kromozom üzerinde p kolunda, 19p13.12 sitogenik lokasyonunda ve 13874875-13875011 genomik koordinatında bulunmaktadır (Şekil 1.23).

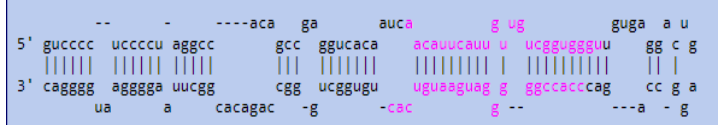


Şekil 1.23: hsa-miR-181d geninin 19. kromozomdaki konumu (URL-19).

hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-181d'nin 79 ile 99. nükleotitleri arasından oluşmaktadır. Transkribe edildikten sonra pri-miRNA haline yani kök-halka formuna dönüşmektedir. hsa-miR-181d'nin kök-halka şekli ve hsa-miR-181d-3p'nin dizisi Çizelge 1.3'te verilmektedir. Olgun miRNA olan hsa-miR-181d-3p, 21 nükleotit uzunluğundadır ve dizisi Çizelge 1.3'te verilmiştir (URL-20).

miRNA ailesi miR-181, hücrel büyüme, gelişme ve aktivasyonun temel yönlerini düzenlemede çeşitli roller oynamaktadır. Kanser, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi hastalıklar ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde görev almaktadır (Chen vd., 2018). hsa-miR-181d, kanser türlerine bağlı olarak hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı etkilere sahip olabilen miR-181 ailesine aittir. hsa-miR-181d'nin gliomalarda *BCL-2*'yi hedefleyerek bir tümör baskılayıcı görevi gördüğü gösterilmiştir. Başka bir çalışmada Wang'ın grubu (Jiang vd., 2022), hepatik kanser kök hücreleriyle ilişkili miRNA'ları tanımlamak için genom çapında bir tarama yapmıştır. Dört olgun miR-181 aile üyesinin (hsa-miR-181a, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181d) yirmi hepatoselüler karsinom (HCC) vakasının yanı sıra HCC kök hücrelerinde önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Wang'ın grubu ayrıca uygun bir fare modelinde tümörjenik *in vitro* analizler kullanarak hsa-miR-181b ve hsa-miR-181d'nin HCC ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu bildirmiştir (Wang vd., 2010).

Çizelge 1.3: hsa-miR-181d nükleotit dizisi, kök-halka yapısı ve ve hsa-miR-181d-3p dizisi (URL-20).

hsa-mir-181d kök – halka dizisi	GUCCCCUCCCCUAGGCCACAGCCGAGGUCACAAUC AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGUUGUGAGGACUG AGGCCAGACCCACCGGGGGAUGAAUGUCACUGUGG CUGGGCCAGACACGGCUUAAGGGGAAUGGGGAC
Kök – halka yapısı	
Olgun miRNA	hsa-miR-181d-3p
Olgun dizi	79 - CCACCGGGGGAUGAAUGUCAC - 99
Çekirdek dizi	CACCGGG

Song ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada ise, miR-181 ailesinin yukarı regülasyonunun, mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) aktivasyonunu düzenlediği ve miR-181'in *MAPK fosfat-5*'i hedeflemesi sonucunda bir onkomiR olarak kanser hücresi göçünü desteklediği gösterilmiştir. Diğer taraftan Zhang ve arkadaşları tarafından (Zhang vd., 2012) yapılan ve hsa-miR-181d'nin tümör baskılayıcı rolünü vurgulayan bir çalışmada, hsa-miR-181d'nin glioblastoma hücre hatlarında doğrudan metil guanin metil transferaz genini (*MGMT*) hedefleyerek *MGMT*'yi aşağı regüle ettiği ve hsa-miR-181d'nin daha yüksek ekspresyonunun, glioblastoma hastalarından oluşan bir kohortta daha iyi genel sağkalım ile korele olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2018).

miR-181d, omurgalı hücrelerinde yaygın olarak tanımlanmış ve yetişkin fare beyin dokularında yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuş miRNA'lardan biridir (Yang vd., 2022). İnsan nöro gelişiminin farklı evrelerinde farklı ekspresyon profilleri gösteren miR-181d'nin, olgun insan nöronlarında yüksek oranda eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Smith vd., 2010).

Siklik adenosin monofosfata (cAMP) yanıt veren element bağlayıcı protein 1'in (cAMP responsive element binding protein 1: CREB1), bilişsel hafıza için önemli bir protein olduğu bilinmektedir (Yang vd., 2022). Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi sinir sistemi hastalıklarında, bozulmuş CREB sinyalleme gözlemlenmiştir (Iversen ve Glowinski, 1966; Yang vd., 2022). miR-

181d'nin beyin hücresi gelişimi ve farklılaşması ile yakından ilişkili olduğunu öneren bir çalışmada, miR-181d ve CREB1 arasındaki olası ilişki *in vitro* ve *in vivo* olarak doğrulanmış, *CREB1* mRNA'sının 3'UTR'si ve miR-181d'nin tohum bölgesi hizalandığında, oldukça uyumlu bir baz eşleşmesi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, miRNA-181d'nin *CREB1* ekspresyonu için negatif bir regülatör olarak görev aldığı gösterilmiştir (Yang vd., 2022). Tüm bu bilgiler incelendiğinde, hsa-miR-181d-3p'nin hastalıklardaki rolünün karmaşık olabileceği ve spesifik hücresel bağlam, moleküler etkileşimler ve diğer genetik veya epigenetik değişikliklerin varlığı dâhil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olabileceği görülmüştür. hsa-miR-181d-3p ile ilgili MS'te yapılmış bir çalışma literatürde yoktur. Bu nedenle bu çalışma bu konuda ilktir.

Ayrıca, çalışmamızla birlikte IFN-gama protein seviyesi ve bu seviyeyi etkilediği düşünülen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri RRMS tanısı ve GA tedavi yanıtı açısından ilk kez birlikte değerlendirilmiştir. Bir sonraki bölümde IFN-gama seviyelerini etkilediği düşünülen hsa-miR-181d-3p ile *IFNG* geni arasındaki ilişki açıklanmıştır.

1.3.4.1 hsa-miR-181d-3p ve *IFNG*

miRDB veri tabanına göre hsa-miR-181d-3p'nin cAMP bağımlı transkripsiyon faktörü (*ATF*), *BCL-2L*, kaspaz 16 psödogen (*CASP16P*), *CREB1*, *IL10RA*, *IL17RA* ve tümör proteini p53 indüklenebilir protein 3 (*TP53I3*) gibi birçok tahmin edilen hedef geni olduğu görülmüştür (URL-21). miRWalk veri tabanına göre hedefleri arasında *IFNG* geni de yer almaktadır. Hsa-miR-181d-3p'nin hedef bölgesi *IFNG*'nin 3'UTR bölgesindedir (Şekil 1.22). Yukarıda da bahsedildiği gibi Fayyad-Kazan ve diğerleri tarafından (2014) yapılan çalışmada miR-24-3p ve miR-181d-3p'in, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir.

1.4 Çalışmanın Amacı

MS genellikle genç erişkinlerde görülen, hastanın yaşam süresi ve kalitesini ciddi derecede negatif yönde etkileyen çok katmanlı, otoimmün, nöroenflamatuar ve nörodejeneratif bir hastalıktır. MS tanısı koymak için birçok faktörün göz önünde bulundurulması ve MS dışındaki diğer enflamatuar hastalıkların dışlanması

gerekmektedir. Bunu mümkün kılmak için, kolay erişilebilir, yüksek özgüllük, hassasiyet ve doğrulukta moleküler biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Paul vd., 2019).

Hastalığın erken evrelerinde rol alan, ilerleyişini etkileyen hastalığa yatkınlığa neden olan ve ilaçlara verilen farklı tepkilerin altında yatan etmenler tam olarak açıklanmamıştır. Bu faktörlerin açıklanması, biyobelirteç olma potansiyelinin araştırılması ve uygunsa kullanılması, hasta ve hastalık yönetiminin daha iyi yürütülmesine olanak sağlayacaktır. Böylece moleküler biyobelirteçlerin tespiti ile riskli olan kişiler belirlenebilir; hastalık seyri izlenebilir ve kişiye özel ilaç tedavisi planlamaları yapılabilir kılınacaktır (Paul vd., 2019; Michaličková vd., 2022).

Bu çalışmanın amacı plazmadaki IFN-gama seviyelerinin, bu seviyeleri etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonunun ve hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin hastalık riski açısından değerlendirilmesi, bu parametrelerin birbirleri ile ilişkilerinin incelenmesi, bunların bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisinin olup olmadığının hesaplanması ve biyobelirteç olarak kullanılabilirliklerinin değerlendirilmesidir. Bu tez çalışması bu konuda ilktir ve TÜBİTAK 1002 (121S345) araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

- 330 RRMS hastası ile 330 sağlıklı kontrol bireyin *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu için genotiplerinin ve alel frekanslarının belirlenmesi,
- *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu için belirlenen genotiplerin hastalık riski açısından ve engellilik skorları ile ilişkisi yönünden analiz edilmesi, genotip ve alel frekanslarının hastalıkla ilişkisinin değerlendirilmesi,
- Tedavisine başlanmamış ve atak döneminde olmayan (naif) 25 RRMS hastası, GA kullanan 25 RRMS hastası ve 25 sağlıklı kontrol bireyin plazma örneklerinde IFN-gama konsantrasyonunun belirlenmesi,
- IFN-gama konsantrasyonunun *IFNG* rs2069727 T/C genotipleri ile ilişkisinin incelenmesi,
- IFN-gama konsantrasyonunun hastalık riski, ilaç ve engellilik skorları ile ilişkisinin analiz edilmesi,

- Tedavisine başlanmamış ve atak döneminde olmayan (naif) 25 RRMS hastası, GA kullanan 25 RRMS hastası ve 25 sağlıklı kontrol bireyin plazma örneklerinde hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi,
- hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyeleri ile plazma IFN-gama seviyesi arasındaki ilişkinin incelenmesi,
- hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin hastalık riski, ilaç ve engellilik skorları ile ilişkisinin analiz edilmesi,
- Plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin ve *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin, hastalıkla ve engellilik puanları ile ilişkileri yönünden hep bir arada regresyon analizi ile incelenmesi.

2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Çalışma grupları ve popülasyonlar

Bu tez çalışması 12S345 numaralı “İnterferon-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyeleri ve *IFNG* rs2069727 T/C tek nükleotit polimorfizminin MS riski ve glatiramer asetat tedavisi kapsamında klinik ve *in silico* yaklaşımlarla incelenmesi” konulu TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Etik Kurulu’na başvurulmuş ve E1-21-1805 kodlu çalışma 26.05.2021 tarihinde oy birliği ile etik açıdan uygun bulunmuştur (EK-1). Kontrollü, tek kör gözlemsel bir çalışma olarak gerçekleştirilen bu araştırmada, “genetik polimorfizm çalışma grubu” ile “miRNA ve ELISA çalışma grubu” olmak üzere birbiri ile çakışan 2 grup oluşturulmuştur. Genetik polimorfizm bölümü için 330 RRMS hastası ve 330 kontrol çalışmamıza dâhil edilmiştir. Bu grubun içerisinde ilaç tedavisine başlanmamış (treatment- naïve, naif) 25 RRMS hastası, GA tedavisi alan 25 RRMS hastası ve 25 kontrol, miRNA ve ELISA çalışması bölümüne dâhil edilmiştir. Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği’ne başvuran ve 2017 McDonald Revize Kriterleri’ne göre kesin MS teşhisi konmuş, RRMS tanısı alan gönüllü hastalar arasından aşağıdaki araştırma kriterlerine uyanlar hasta grubuna dâhil edilmiştir. Benzer biçimde çalışmaya dâhil edilme kriterlerine uygun, MS ve diğer nörodejeneratif hastalık tanısı almamış, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği’ne MS dışında başka bir şikayetle başvurmuş gönüllüler kontrol grubunu oluşturmuştur. Araştırmaya dâhil edilmeme kriterlerinden en az birine sahip olan bireyler çalışma gruplarına dâhil edilmemiştir.

Hasta gönüllülerin genetik polimorfizm çalışma grubuna dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

- 18-65 yaş grubu içinde olması
- Kesin MS tanısı konmuş olması (güncellenmiş McDonald 2017 kriterlerine göre)

- RRMS tanısı konmuş olması
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermesi

Hasta gönüllülerin miRNA ve ELISA çalışmasına dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

Naif hastaların dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

- 18-65 yaş grubu içinde olması
- Kesin MS tanısı konmuş olması (revize edilmiş McDonald 2017 kriterlerine göre)
- RRMS tanısı konmuş olması
- Daha önce MS tedavisi almamış olması
- İmmün-baskılayıcı veya immün-modülatör ilaçları MS hastalığı dışında başka bir sebepten dolayı kullandıysa, son üç ay kullanmamış olması
- Herhangi bir atak semptomu göstermemesi ve son 4 hafta süresince (en az) atak geçirmemiş olması
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermesi

GA tedavisi alan hastaların dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

- 18-65 yaş grubu içinde olması
- Kesin MS tanısı konmuş olması (revize edilmiş McDonald 2017 kriterlerine göre)
- RRMS tanısı konmuş olması
- GA kullanıyor olması
- Herhangi bir atak semptomu göstermemesi ve son 4 hafta süresince (en az) atak geçirmemiş olması
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermesi

Kontrol gönüllülerin genetik çalışmasına dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

- 18-65 yaş grubu içinde olması
- Hasta grubuna benzer demografik özelliklerinin olması
- Klinik geçmişinde MS ve diğer nörodejeneratif hastalık kaydı bulunmaması
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermesi,

Kontrol gönüllülerin miRNA ve ELISA çalışmasına dâhil olma kriterleri aşağıda verilmiştir:

- 18-65 yaş grubu içinde olması
- Hasta grubuna benzer demografik özelliklerinin olması
- Klinik geçmişinde MS ve diğer nörodejeneratif hastalık kaydı bulunmaması
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermesi
- Son 3 ay süresince (en az) immün-baskılayıcı ve immün-modülatör ilaç kullanmaması

Gönüllülerin araştırmaya dâhil edilmeme kriterleri aşağıda verilmiştir:

- Serebrovasküler hastalığının olması
- Akut enfeksiyon (COVID-19 dâhil) veya ateşli hastalıkları olması
- Bilinen malign hastalığının olması
- Romatolojik veya diğer otoimmün hastalığının olması
- Kardiyovasküler olay geçirmesi veya kardiyovasküler cerrahi geçirmesi
- Renal replasman tedavisi yapılan son dönem böbrek yetmezliğinin olması
- Araştırma kriterlerinin tamamını yerine getirmemesi
- Bu çalışmaya katılmak için onay vermemesi

2.1.2. Numune toplanması

2.1.2.1. Genetik polimorfizm çalışması için tam kan örneklerinin toplanması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nde RRMS tanısı almış hastalardan ve geçmişinde MS tanısı almamış sağlıklı kontrol bireylerden Na-EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri alınmıştır. Hastaneden teslim alınan kan örnekleri soğuk kutu içerisinde laboratuvara getirilmiş, ardından numuneler DNA izolasyonu prosedürüne kadar -86 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.2.2. Plazmada bulunan miRNA ve IFN-gama seviyelerinin tespiti çalışması için tam kan örneklerinin toplanması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nde, RRMS tanısı almış, GA tedavisi alan hastalardan, RRMS tanısı almış naif hastalardan ve geçmişinde MS tanısı almamış sağlıklı kontrol bireylerden 10 mL'lik Na-EDTA'lı tüplere alınan tam kan

örnekleri, soğuk kutular içerisinde (en fazla 2 saat içerisinde) laboratuvara getirilmiştir. Sonraki adımda, +4 °C’de gerçekleştirilen santrifüj işlemiyle plazma fazları ayrılmıştır. Plazma fazları biyogüvenlik kabininde (Thermo Fisher Scientific, ABD) izole edilmiş, RNaz ve DNaz içermeyen 2 mL’lik ependorf tüplere alikotlanarak kullanımlarına kadar -86 °C’de saklanmışlardır. Santrifüj aşamasında Hettich Universal 320R (Tuttlingen, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Santrifüj cihazında ve biyogüvenlik kabininde kullanılan yüzeyler %70’lik etanolle dezenfekte edilmiş ardından RNaz uzaklaştırma solüsyonu (RNase away) ile silinerek RNaz enzimi ve DNA kontaminasyonundan arındırılmıştır (Nance vd., 2020). Plazma alikotlarının hacimleri yalnızca bir defa kullanılacak şekilde belirlenmiş ve çözdürülen alikotlar tekrar saklanmamıştır.

2.1.3. Kullanılan malzemeler

Bu çalışma kapsamında, kullanılan materyaller, üretici şirketlerin isimleri ve üretim yerleriyle birlikte EK-2’de bir liste şeklinde sunulmuştur. Çalışma kapsamı dâhilinde, tez araştırmaları için uygun malzemelerin seçimine özen gösterilmiştir.

2.1.4. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazların üretici firma adları ve üretim yerleri, EK-3’te liste halinde sunulmuştur.

2.1.5. Kullanılan primerler

Genotipleme çalışmalarında TaqMan SNP Genotyping Assay kit; plazma miRNA ekspresyon seviyesi belirleme çalışmalarında miRCURY LNA miRNA PCR Assay kit içeriğinde bulunan primerler kullanılmıştır.

2.1.5.1. Genotipleme çalışmalarında kullanılan primerler

Eş zamanlı PCR (RT-PCR) ile genotipleme çalışmaları yapılan *IFNG* rs2069727 T/C SNP’si için TaqMan SNP Genotyping Assay kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. TaqMan analizleri, genetik analizlerde kullanılan belirli hedef dizileri saptamak için tasarlanmış özel prob ve primerlerden oluşan sistemlerdir. Bu sistemlerde hedef diziye göre özelleşmiş TaqMan analiz numaraları bulunmaktadır. *IFNG* rs2069727 T/C

SNP'si için üretilen kitin TaqMan analiz numarası ve katalog numarası Çizelge 2.1'de verilmiştir. Kit fonksiyonel olarak üretici firma tarafından test edilmiştir.

Çizelge 0.1: TaqMan SNP genotipleme kitinin TaqMan analiz ve katalog numarası.

Gen	SNP	TaqMan analiz numarası	Katalog numarası
<i>IFNG</i>	rs2069727 T/C	C__2683475_10 (fonksiyonel olarak test edilmiştir)	4351379

2.1.5.2. Plazma mikroRNA ekspresyon seviyesi belirlemede kullanılan primerler

Bu çalışma kapsamında, kantitatif eş zamanlı PCR (Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) metodu kullanılarak plazmadaki hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ifade seviyeleri tespit edilmiştir. İki hedef miRNA olan hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p; UniSp6 (sentetik spike-in kontrol); hsa-miR-16-5p (referans miRNA) için valide ve optimize edilmiş olan miRCURY LNA miRNA PCR Assay primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin katalog numaraları, katalog kimlikleri ve üretim yerleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 0.2: Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerlerin bilgileri.

miRNA	Katalog numarası	Katalog kimliği	Üretici
hsa-miR-24-3p	339306	YP00204260	Qiagen, Almanya
hsa-miR-181d-3p		YP02105350	
hsa-miR-16-5p		YP00205702	
UniSp6		YP00203954	

2.2. Metotlar

2.2.1. DNA izolasyonu

Tam kan örneklerinden gerçekleştirilen DNA izolasyonu prosedüründe tuzla çöktürme metodundan yararlanılmıştır (Lahiri ve Schnabel, 1993). 750 µL tam kan numunesi, 2 mL'lik DNaz ve RNaz içermeyen tüpe alınmış, eşit hacimde TKM tamponu (pH 7.6; 10 mM Trizma bazı, 2 mM EDTA.H₂O, 10 mM KCl, 4 mM MgCl₂) ile seyreltilmiştir. Ardından, 20 µL Triton X-100 ilave edilerek tüp kapağı kapalı bir şekilde alt üst edilmiştir. Santrifüjde 10 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve 750 µL TKM tamponu eklenerek pelet çözdürülmüştür.

Takiben, tekrar aynı koşullar altında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelette görünür bir kırmızılık kalmayana kadar bu işlem tekrarlanmıştır. 200 µL TKM tamponunda çözdürülmüş ve akyuvarları içeren bu karışıma %10'luk sodyum dodesil sülfat çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. Akabinde, 10 dakika boyunca 58 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon aşamasının ardından, 75 µL soğuk ve doymuş NaCl çözeltisi eklenmiş ve tüpler birkaç defa alt üst edilmiştir. 10 dakika boyunca +4 °C'de 14000 g'de santrifüj edilen tüpler cihazdan alınmıştır. Dipteki peletin zarar görmemesine dikkat edilerek, süpernatanttan yaklaşık 300 µL alınıp yeni bir 1.5 mL'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Yeni tüpte bulunan süpernatantın üzerine, süpernatant hacminin iki katı kadar soğuk etanol eklenmiştir. Tüpün birkaç defa alt üst edilmesiyle DNA'nın presipitasyonu sağlanmış ve tüp, -20 °C'de 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından, DNA'nın pelet olarak elde edilmesi amacıyla +4 °C'de 10 dakika boyunca 10000 g'de tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant fazı atılmıştır. Etanolün buharlaşarak uzaklaşması için bir süre beklenmiş, pelet 100 µL Tris-EDTA (TE, pH 8.0; 1 mM EDTA.H₂O; 10 mM Tris-HCl) tamponunda çözdürülerek 37 °C'de 3 saatten uzun bir süre boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında DNA örnekleri 15 dakika boyunca +4 °C'de bekletilmiştir. Sonraki aşamada, izole edilen DNA'nın çözelti içinde homojen bir şekilde dağılımının sağlanması için, tüpler vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.

DNA'nın konsantrasyonunun ve kalitesinin belirlenmesi için Thermo Scientific NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotometresi (Wisconsin, ABD) kullanılmıştır. Cihaz pedalları distile su ile silinmiştir. Ardından, 2 µL TE tamponu kullanılarak cihaza kör (blank) tanıtılmıştır. Blank kullanımı, örnekteki solventin veya diğer bileşenlerin neden olduğu arka plan absorbansının hesaba katılmasını sağlayan bir referanstır (Auton vd., 2015). Blank alma işleminden sonra, DNA kalite ve konsantrasyon tespiti 2 µL DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. A260/280 oranı 1.8 civarında ise DNA'nın gereken saflıkta olduğuna, bu oran 1.8'den düşükse protein kontaminasyonu olduğuna, 1.8'den daha yüksekse RNA kontaminasyonu olduğuna karar verilmektedir. Ayrıca, DNA konsantrasyonu, cihaz tarafından 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında ölçümler alınarak Beer-Lambert yasasına uygun bir şekilde hesaplanmaktadır.

2.2.2. *IFNG* rs2069727 T/C tek nükleotit polimorfizminin genotipleme çalışması

IFNG rs2069727 T/C SNP'sinin genotipleme çalışması eş zamanlı PCR (Real-time PCR) cihazında gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol genotiplerinin belirlenmesi için alel-spesifik TaqMan genotipleme problemleri ile valide edilmiş spesifik primerleri içeren yöntem (Schleinitz vd., 2011) kullanılmıştır. Kullanılan SNP genotipleme kitinin TaqMan analiz numarası, prob dizisi ve üretim yeri EK-4'te verilmiştir. Genotipleme çalışmasına hazırlık aşamasında DNA dilüsyonu gerçekleştirilmiş, kit üreticisinin önerdiği 1-20 ng aralığı olan DNA miktarının 8 ng olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çizelge 2.3'te verilen ana karışım içeriği hazırlanmıştır. Genotipleme ana karışımı için, içeriğinde prob ve primerlerin bulunduğu TaqMan® SNP genotipleme kiti ve içeriğinde AmpliTaq Gold™ DNA polimeraz, ROX boyası, dNTP'ler ve tamponun bulunduğu TaqMan genotipleme ana karışımı kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmine göre hazırlanan karışım (Çizelge 2.3) 1.5 µL'lik bir tüpe aktarılmış, vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5.5 µL hacimde dağıtılmıştır. Ardından, son kuyucuk hariç her kuyucuğa 4.5 µL hacimde seyreltilmiş genomik DNA örnekleri yüklenmiş, son kuyucuğa ise negatif kontrol için 4.5 µL hacimde steril apirojen su eklenmiştir.

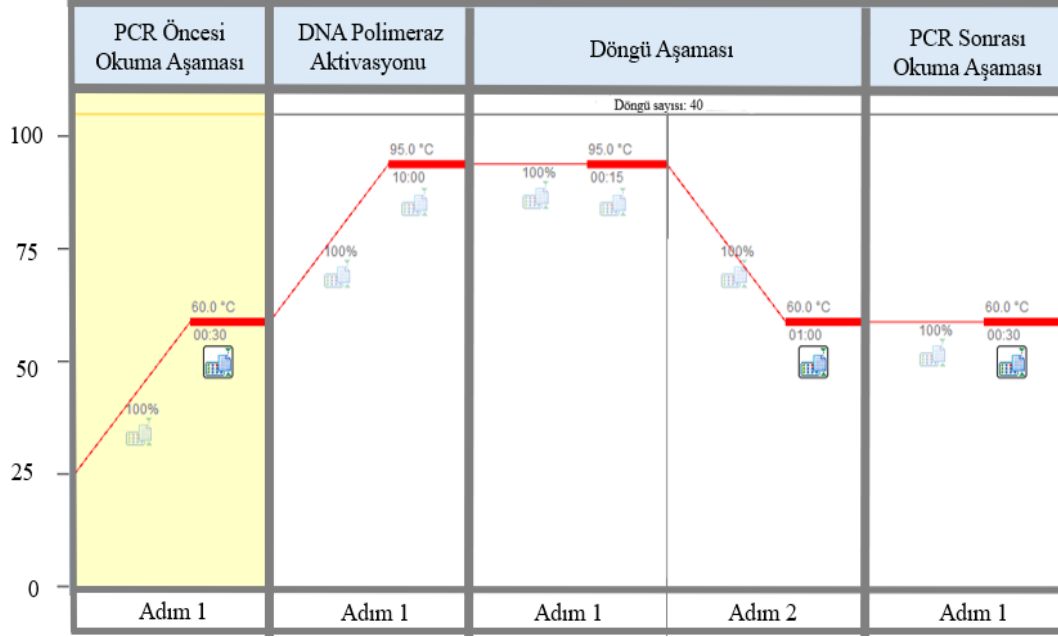
Çizelge 0.3: *IFNG* rs2069727 T/C için genotiplerin belirlenmesi için kullanılan reaksiyon karışımı.

İçerik	1 kuyucuk için eklenen hacim
2X TaqMan Genotipleme Ana Karışımı	5.0 µL
20X TaqMan SNP Genotipleme Kiti (primer ve prob karışımı)	0.5 µL
Genomik DNA	4.5 µL
Toplam	10.0 µL

96 kuyulu plakanın üstü uygun bir optik yapışkan koruyucu film (seal) ile kapatılmış, oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 550 g'de santrifüj edilmiş ardından 96 kuyucuklu plaka Applied Biosystems, StepOne Plus eş zamanlı PCR cihazına (Woodlands, Singapur) yerleştirilmiş, Çizelge 2.4'teki reaksiyon döngüsü cihazın yazılımı olan StepOne Software 2.3 ile kurulmuş ve reaksiyon başlatılmıştır (Şekil 2.1).

Çizelge 0.4: *IFNG* rs2069727 T/C SNP bölgesini çoğaltmak için kullanılan termal döngü programı.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
PCR öncesi okuma	60 °C	30 saniye	Tek basamak
DNA polimeraz aktivasyonu	95 °C	10 dakika	Tek basamak
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40
Primer bağlanması ve uzaması	60 °C	1 dakika	
PCR sonrası okuma	60 °C	30 saniye	Tek Basamak



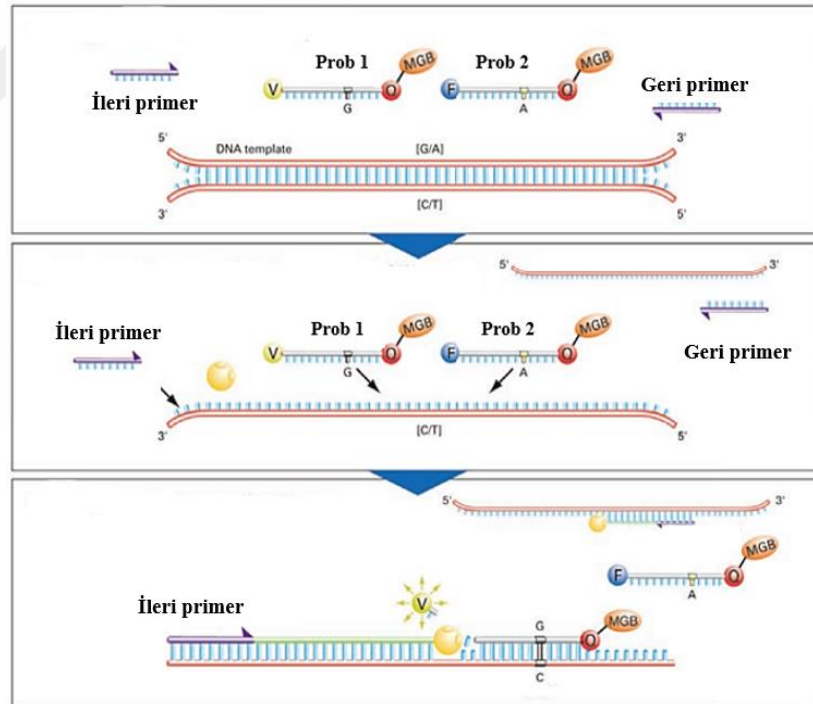
Şekil 0.1: *IFNG* rs2069727 T/C SNP bölgesini çoğaltmak için kullanılan termal döngü programı görüntüsü.

Kullanılan TaqMan® SNP Genotipleme Analiz kiti, SNP bölgesini hedefleyen ileri ve geri primerlerin yanı sıra, SNP'nin alellerine özgü iki farklı prob içermektedir (Çizelge 2.5). Bu problardan biri yabancı tip alelle, diğeri ise polimorfik alelle eşleşen baz dizilimine sahiptir. Problardan biri FAM™ etiketli, diğeri VIC™ etiketli floresan boya bulundurmaktadır. Bu farklı floresan işaretçilerin farklı dalga boylarında ışıma yapması vesilesiyle genotipleme analizi gerçekleştirilebilir. Polimorfik 'C' aleline komplementer dizilime sahip olan probun ucunda VIC boyası, yabancı tip 'T' aleline komplementer dizilime sahip olan probun ucunda ise FAM boyası bulunmaktadır. FAM ve VIC boyalarının temsil ettiği farklı aleller Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 0.5: *IFNG* rs2069727 T/C SNP bölgesini hedefleyen problar ve ürün TaqMan analiz numarası.

Polimorfizm	Polimorfizm bölgesi	VIC	FAM	TaqMan analiz numarası
rs2069727 T/C	Aşağı akış	C	T	C__2683475_10

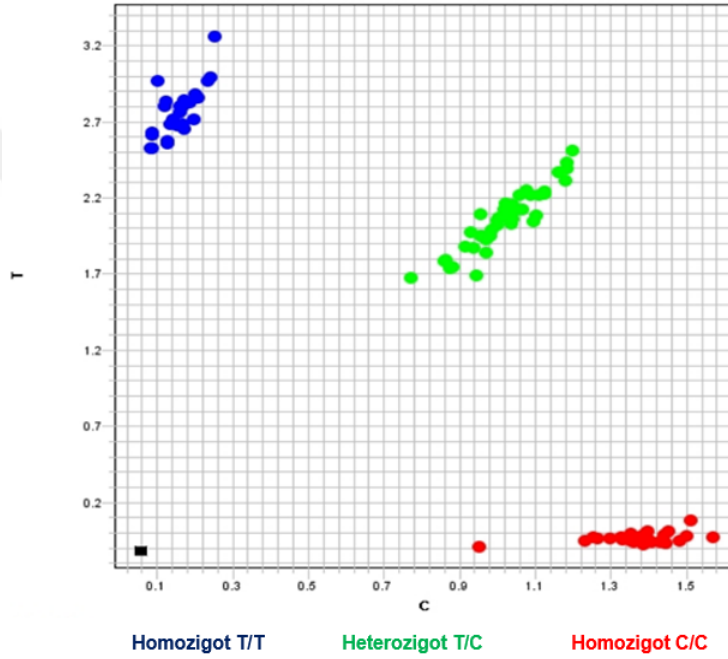
Tipik bir TaqMan™ probu, 5'-floresan bir boya (raportör) ve bir 3'-sönümleyici (quencher) içerir. Raportör, normal şartlar altında belirli dalga boyunda aldığı ışığı yansıtırken, bir quencher yakınında sönümlenmekte ve ışımaya yapamamaktadır. Bu yöntem ile gerçekleştirilen RT-PCR'da başlangıç denatürasyonunun gerçekleşmesinin ardından ileri ve geri primerler spesifik bölgenin sınırlarına; alel spesifik TaqMan probu ise SNP'yi içeren diziye bağlanmaktadır. Amplifikasyon sırasında, Taq polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle prob 5'-ucundan parçalanmaya başlar ve söndürücüsünden ayrılan FAM/VIC boya, raportör ve sönümleyiciyi fiziksel olarak bir arada tutan probun dağılması sonucunda floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya dedektörlerce ölçülerek floresan sinyali olarak kaydedilir (Schleinitz vd., 2011). Bu reaksiyon Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 0.2: TaqMan problarının çalışma mekanizması.

Reaksiyon bitiminde kaydedilen bu sinyaller temel alınarak örnekler alellik dağılım haritasında yerlerini almaktadırlar ve alellik dağılım haritasının eksenlerini yabanıl tip

alel ve polimorfik alel oluşturmaktadır. Örneklerin genotipleri, cihaz yazılımı tarafından alınan sinyaller vasıtasıyla belirlenebilmektedir. Yabancı tip (TT) genotipli örneklerde FAM boyası sinyal verirken polimorfik genotipli örneklerde (CC) VIC boyası sinyal vermektedir. Heterozigot genotipli (TC) numunelerden hem FAM hem de VIC boyası sinyali alınmıştır. Genotipler, reaksiyon sonunda floresan sinyallerin amplifikasyon miktarına göre StepOne v2.3 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 2.3'te numunelerin tek bir çizelgede gösterildiği örnek bir çalışmadan alınan alellik dağılım haritası bulunmaktadır (Şekil 2.3).



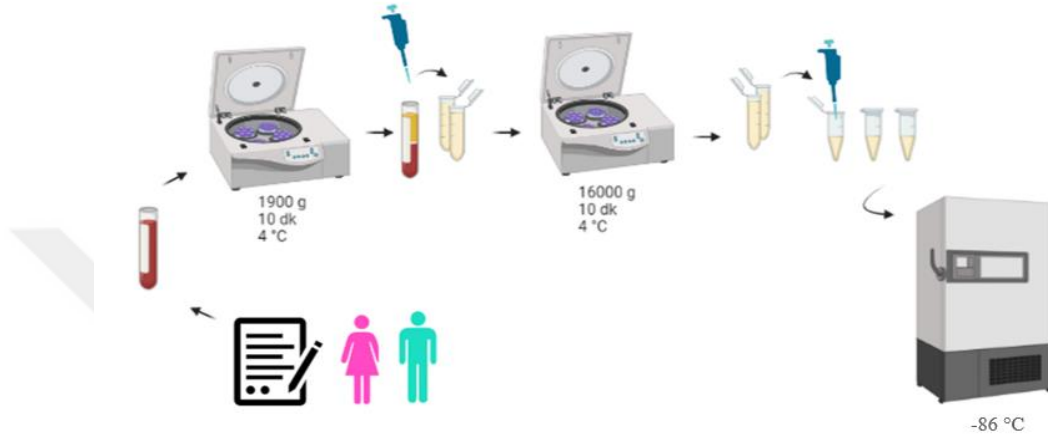
Şekil 0.3: *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin çizelgede gösterimi. Mavi renkli daireler TT genotipli; yeşil renklileri TC genotipli ve kırmızı renkli olanlar CC genotipli örneklerle karşılık gelmektedir. Siyah kare ise negatif kontrole karşılık gelmektedir.

2.2.3. Plazmada mikroRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler

2.2.3.1. Plazma izolasyonu

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nde miRNA ve ELISA çalışma grubu için GA kullanan ve naif RRMS hastalarından ve sağlıklı kontrollerden Na-EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri zaman kaybetmeden (2 saat içinde) buz kutusu içerisinde TOBB ETÜ Teknoloji Merkezi 202 numaralı laboratuvarımıza

getirilmiş ve plazma ayrımı için soğutmalı santrifüjde, birincisi 10 dakika boyunca, +4 °C’de, 1900 g’de; ikincisi ise 10 dakika boyunca, +4 °C’de ve 16000 g’de olmak üzere iki kez santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk santrifügasyon sonrasında elde edilen plazma fazı, 2 mL’lik yeni bir RNaz, DNaz içermeyen tüpe alınarak tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen temiz plazma örnekleri RNA izolasyonu ve ELISA çalışmaları için uygun miktarlarda alikotlara ayrılarak -86 °C’ye kaldırılmışlardır (Şekil 2.4).



Şekil 0.4: Plazma izolasyon ve alikotlama süreci.

2.2.3.2. Total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Plazmalardan total RNA izolasyonu RNA izolasyon kiti (Qiagen miRNeasy Serum Plasma/Advanced Kit), QIAzol solüsyonu, kloroform ve spin kolonların kullanıldığı yöntem ile yapılmıştır. Kit üreticisinin talimatlarına göre prosedür düzenlenmiştir. Kit üreticisinin önerdiği maksimum hacim olarak belirlenen 200 µL plazma örneği kullanılarak başlanan RNA izolasyonunda, spike-in RNA olarak kit içeriğinde bulunan UniSp6 kullanılmıştır. Plazma örneği oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra, 200 µL hacmindeki bir tüpe aktarılmış, RNA’ların çökmesine yardımcı olmak için kullanılan carrier RNA’dan 1.9 µL eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Ardından, 1000 µL Qiazol eklenerek karışım 5 dakika boyunca alt üst edilmiş ve homojen görüntüye ulaşılan kadar vorteks işlemi uygulanmıştır. Homojen bir görüntü elde edildiğinde, faz ayrımını sağlamak amacıyla 300 µL kloroform eklenerek 10 dakika boyunca alt üst edilmiş ve homojen bir görüntü sağlayıncaya kadar vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Sonrasında, örnek +4 °C’de 10 dakika boyunca 12000 g’de santrifüjlenmiş ve

karışımın fazlarına ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında, örnek sarsılmadan biyogüvenlik kabine (Thermo Fisher Scientific, ABD) taşınmış ve elde edilen berrak süpernatant fazı, dikkatli bir şekilde yeni bir 2 mL'lik nükleaz içermeyen tüpe aktarılmıştır. Ardından, RNA'yı içeren süpernatanta 3.5 µL spike-in (UniSp6) eklenmiş ve tüp alt üst edilerek hafifçe karıştırılmıştır. Karışıma 900 µL saf etanol eklenerek alt üst edilmiştir. Ardından, içerik miRNeasy MinElute Spin Column tüpe aktarılmış ve 15 saniye boyunca 8000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında, toplama tüpünün dibinde biriken birikinti atılmıştır. Bu adım, etanol ile karıştırılmış olan süpernatant bitene kadar devam ettirilmiştir. Kolonlu tüpe 700 µL RWT Buffer eklenmiş ve 15 saniye boyunca 8000 g'de santrifüjlenmiştir. Ardından, tüpün dibinde biriken atık sıvı atığa dökülmüştür. 500 µL RPE Buffer eklenerek 15 saniye boyunca 8000 g'de santrifüjlenmiş ve toplama tüpünün altında biriken birikinti sıvı atığa atılmıştır. Bir sonraki adımda, presipitasyon için kullanılacak olan %80'lik etanolden kolona 700 µL eklenmiş ve 2 dakika boyunca 8000 g'de santrifüjlenmiştir. Ardından, toplama kabının altında biriken atık dökülmüştür. Kolon kurutma işlemi için kolona herhangi bir ekleme yapmadan 5 dakika boyunca 14100 g'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda atık toplama tüpü atılmıştır. Takiben, kolon 1.5 mL'lik tüpe aktarılmıştır. Devamında, kolonun filtre kısmına 16 µL nükleaz içermeyen saf su eklenmiştir. Bu sayede RNA, kolonlardan geçerek tüpün dibine ulaşmıştır. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildikten sonra, örnek 1 dakika boyunca 14100 g'de santrifüjlenmiştir. Bu adım 1.5 mL'lik tüpte biriken ve çözünmüş RNA'yı da içeren sıvının RNA konsantrasyonunun arttırılması için bir kez daha tekrarlanmıştır. Tüpten alınan sıvı tekrar kolonun filtresine eklenmiş ve 5 dakikalık inkübasyon sonunda aynı şekilde santrifüj edilerek RNA, 1.5 mL'lik tüpe aktarılmıştır. Plazmadan izole edilen RNA'nın kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi için NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotometresi (Wisconsin, ABD) kullanılmıştır. Cihaz açıldıktan sonra pedal kısımlarının nükleaz içermeyen saf su ile temizlenmesinin ardından blank olarak 2 µL nükleaz içermeyen saf su kullanılmıştır. 1.5 mL'lik tüpte bulunan RNA örneklerinden 2 µL alınmış ve ölçüm için cihazın alt pedalına yüklenmiştir. Ölçüm sonucunda A260/280, A230/260 oranları ve cihaz tarafından otomatik olarak belirlenen kontaminasyonlar değerlendirilmiştir. A260/280 oranının 2.0 civarı olması RNA'ların protein kontaminasyonu açısından temiz olduğunu göstermektedir. Ayrıca, A260/230 oranının 2.0 - 2.2 olması RNA'ların

kimyasal kontaminasyon bakımından temiz olduğunu göstermektedir. Guanidin kontaminasyonu 100 mM'a kadar kabul edilmiş olup fenol kontaminasyonu bulunan numuneler kullanılmamıştır. Gereken durumlarda RNA izolasyon prosedürü yeniden uygulanmıştır. cDNA sentezi için uygun olan RNA örnekleri sonraki analize kadar -86 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

2.2.4. Ters transkriptaz PCR metodu ile cDNA sentezi

Konsantrasyonu ve kalitesi kontrol edilen ve kullanılmaya uygun görülen RNA numunelerindeki hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin ekspresyon seviyelerini belirlemek için ters transkriptaz-PCR (reverse transcriptase-PCR) tekniği kullanılmıştır. Sonraki aşamada RNA örneklerinden ters transkripsiyon reaksiyonu ile komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi için miRCURY LNA RT cDNA sentez kiti üreticisinin önerilerine uygun biçimde kullanılmıştır (Çizelge 2.6). Tüm reaksiyonlardaki RNA miktarları kit kullanım kılavuzunda önerilen aralık olan 50-100 ng baz alınarak, 100 ng'da eşitlenmiştir. Buz üzerinde hazırlanan reaksiyon karışımı Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 0.6: Sabit miktarda (100 ng) RNA ile cDNA sentezi için hazırlanan karışım.

İçerik	1 tüp için eklenen hacim
SYBR Green Reverse Transcriptase Reaksiyon Tamponu (5X)	2.4 µL
miRCURY Reverse Transcriptase Enzimi (10X)	1.2 µL
Toplam	
RNaz ve DNaz içermeyen H ₂ O	Değişken
RNA (100 ng)	Değişken
Toplam	12 µL

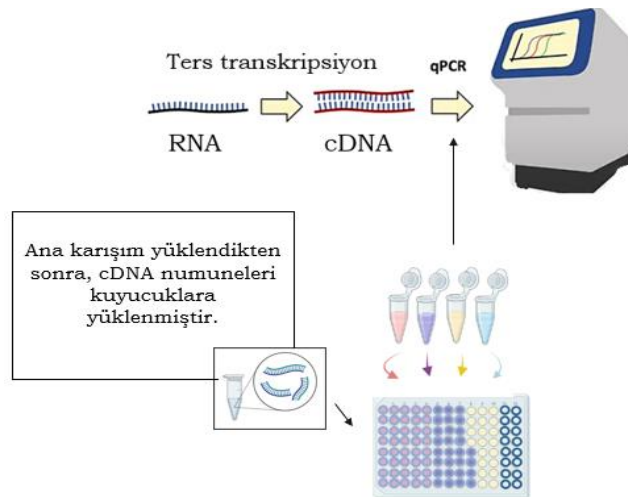
Tüplere önce RNaz, DNaz içermeyen su ve reaksiyon tamponu eklendikten sonra RT enzimi eklenmiş ve ana karışım vorteks ile hafifçe karıştırılmıştır. Ana karışım tüplere dağıtıldıktan sonra karşılık gelen tüplere RNA örnekleri toplam miktarları 100 ng olacak şekilde eklenmiştir. Buz üzerinde hazırlanan reaksiyon karışımı hafif vorteks ve spin işlemleri ardından, laboratuvarımızda bulunan PCR cihazına (Eppendorf Mastercycler ® Nexus, Almanya) koyulmuş ve 42 °C 60 dakika ters transkripsiyon, 95 °C 5 dakika sonlandırma aşamaları yapılarak cDNA'lar sentezlenmiştir (Çizelge 2.7). Ardından cDNA'lar buz üzerinde 2 µL alikotlara ayrılmışlar ve kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmışlardır.

Çizelge 0.7: Ters transkripsiyon reaksiyonunun zaman sıcaklık protokolü.

Adım	Zaman	Sıcaklık
Ters transkripsiyon aşaması	60 dakika	42 °C
Reaksiyon sonlandırma	5 dakika	95 °C
Saklama aşaması	---	4 °C

2.2.5. qRT-PCR ile hsa-miR24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin rölatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında, plazma hsa-miR24-3p'nin, hsa-miR-181d-3p'nin, spike-in kontrol olarak kullanılan UniSp6'nın ve referans miRNA olan hsa-miR-16-5p'nin rölatif ekspresyon seviyeleri hasta ve kontrol gruplarında belirlenmiş ve miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR kit içeriği kullanılmıştır. Alikotlanan cDNA içerikleri (2 µL), kit kılavuzu doğrultusunda 18 µL nükleaz içermeyen su ilavesi ile seyreltilmiştir. Daha sonra hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerini belirlemek için qRT-PCR aşaması Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için önceki adımda sentezlenen seyreltilmiş cDNA'lar, ROX boyası, spesifik primerler (Qiagen miRCURY PCR Assays-miR-24-3p, Qiagen miRCURY PCR Assays-miR-181d-3p, Qiagen miRCURY PCR Assays-miR-16-5p ve Qiagen miRCURY PCR Assays-UniSp6) ve Qiagen miRCURY LNA SYBR Green PCR ana karışım kit içeriği kullanılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 0.5: qRT-PCR prosedürü.

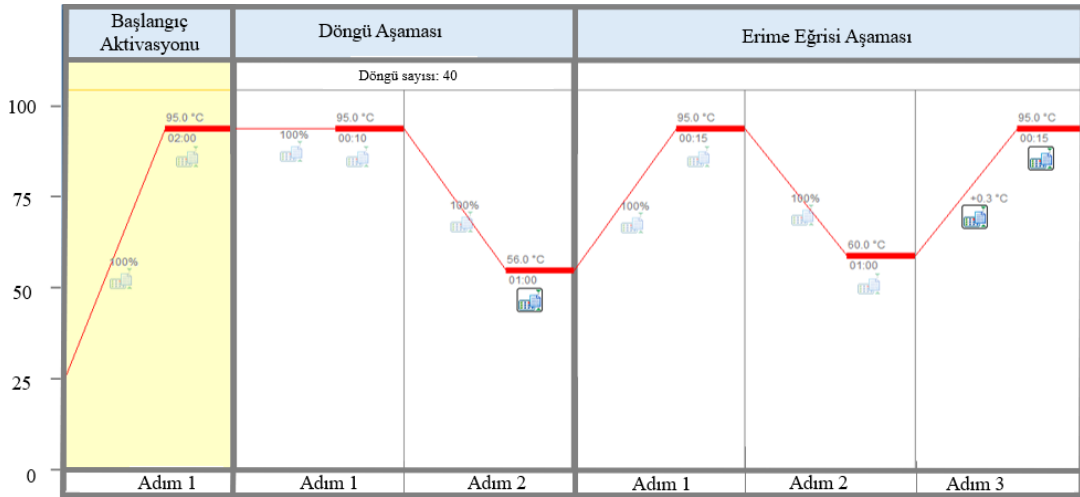
miRNA analizlerinde normalizasyon için endojen miRNA'ların seçilmesi önerilmektedir. Bu nedenle, insan plazma örneklerinde en stabil olarak ifade edildiği

bilinen hsa-miR-16-5p referans olarak seçilmiş ve kullanılmıştır (Lange vd., 2017). Reaksiyonlar, 0.1 mL hacimli 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. İlk olarak çalışılacak örnek sayısına uygun miktarda buz üzerinde her bir miRNA için kendilerine özgü primerler kullanılarak bir ana karışım hazırlanmıştır. Ardından, ana karışım kuyucuklara dağıtılmıştır. Ana karışım içeriği ve hesabı Çizelge 2.8’de verilmiştir. cDNA numuneleri önceden tasarlanmış plaka yerleşim düzenine uygun bir biçimde duplike olarak kuyucuklara dağıtılmışlardır.

Çizelge 0.8: qRT-PCR işleminde kullanılan ana karışım içeriği.

İçerik	1 tüp için eklenen hacim
2X miRCURY SYBR Green ana karışımı	5.0 µL
ROX Dye	0.5 µL
İleri ve geri primerler	1.0 µL
Nükleaz içermeyen su	0.5 µL
Seyreltilmiş cDNA	3.0 µL
Toplam	10.0 µL

StepOne Software v2.3 kullanılarak kit üreticisinin bu cihaz için önermiş olduğu termal döngü koşulları ayarlanmış ve plaka tasarımı cihaza tanıtılmıştır. qRT-PCR işleminde kullanılan termal döngü programı için 95 °C’de 2 dakika başlangıç aktivasyonu, ardından 40 döngü halinde 95 °C’de 10 saniye denatürasyon ve 56 °C’de 1 dakika primer bağlanması ve uzaması aşamaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.9) (Şekil 2.6).



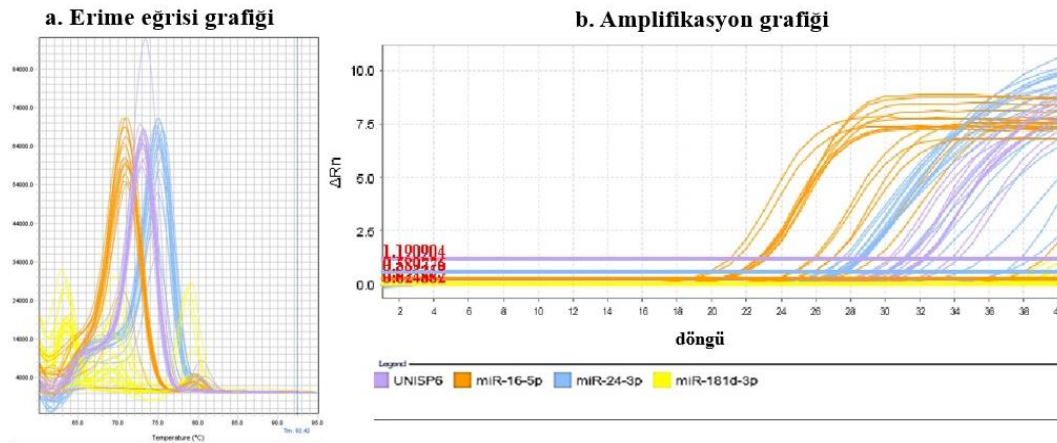
Şekil 0.6: qRT-PCR çalışması için kullanılan termal döngü programı görüntüsü.

Çizelge 0.9: qRT-PCR çalışması zaman sıcaklık protokolü.

Adım	Derece	Zaman	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	40
Primer bağlanma-uzama	56 °C	60 saniye	
Reaksiyon sonlanma			
Erime Eğrisi	60-95 °C	-	-

qRT-PCR sonucu amplifiye olan ürünlerin özgüllüğünün incelenmesi için, döngü programının sonunda 60-95 °C arasında 0.3 °C’de bir ölçüm alınarak oluşturulan erime eğrisi grafiği Şekil 2.7’de sunulmuştur.

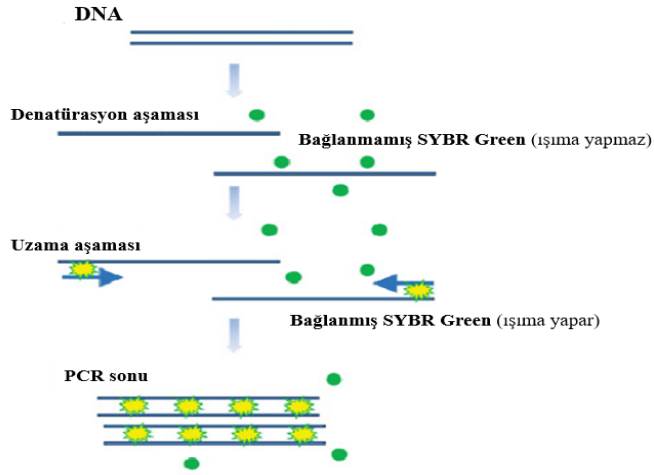
Çoğaltılmış olan ürünlerin belirli bir sıcaklıkta tek bir tepe noktasına sahip olması durumunda özgül olduğundan emin olunmuştur. Bu analiz sonucunda amplifiye olan bütün ürünlerin, hsa-miR24-3p, hsa-miR-181d-3p, UniSp6 ve hsa-miR-16-5p primerleri için özgül olduğu belirlenmiştir.



Şekil 0.7: qRT-PCR sonucu primerlerin erime eğrisi sonuçları (a), bu çalışmada elde edilen amplifikasyon eğrileri (b).

Plazma hsa-miR24-3p’nin, hsa-miR-181d-3p’nin, spike-in kontrol olarak kullanılan UniSp6’nın ve referans miRNA olan hsa-miR-16-5p’nin rölatif ekspresyon seviyelerinin tayini, ortamda oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde oluşan floresan sinyal yoğunluğunun cihaz tarafından tespit edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Floresan sinyali sağlayan araçlar, floresan işaretli TaqMan problemleri olabileceği gibi çift zincirin oluşuna yerleştiğinde floresan sinyal veren SYBR Green boyası da olabilmektedir. TaqMan problemleri hedefe spesifik diziler içeren, hedefe bağlandığında floresan sinyal verirken serbest halde floresan sinyal vermeyen bir boya

türüdür. SYBR Green, çift zincirli DNA fragmanlarının oluklarına yerleştiğinde floresan sinyal verirken serbest halde floresan sinyal vermeyen bir boya türüdür (Şekil 2.8). Tez çalışmasının bu bölümünde floresan sinyal için SYBR Green boyası kullanılmıştır.



Şekil 0.8: Termal döngü aşamalarında SYBR Green (URL-22).

Numunelerin rölatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için ürün miktarı ile orantılı bir şekilde artan sinyalin belirli bir eşik değerini geçtiği döngü cihaz tarafından tespit edilmektedir. Bu döngü sayısına döngü eşiği (Cycle threshold: C_t) denilir. qRT-PCR çalışması ile her bir hasta ve kontrolden elde edilmiş RNA örneğinden sentezlenen cDNA kullanılarak iki hedef miRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p), bir referans miRNA (hsa-miR-16-5p) ve bir sentetik spike-in kontrol RNA (UniSp6) olmak üzere 4 adet miRNA'ya ait C_t değerleri elde edilmiştir. Daha sonra tüm bireylerin ortalama C_t değerleri hesaplanmış ve ardından, yöntem formülü aşağıda bulunan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi uygulanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001):

1. $\Delta C_t = C_t (\text{hedef miRNA}) - C_t (\text{referans miRNA ve UniSp6 spike-in geometrik ortalaması})$
2. $\Delta\Delta C_t = [C_t (\text{hedef miRNA}) - C_t (\text{referans miRNA ve UniSp6 spike-in geometrik ortalaması})]_{\text{hasta}} - [C_t (\text{hedef miRNA}) - C_t (\text{referans miRNA ve UniSp6 spike-in geometrik ortalaması})]_{\text{kontrol}}$
3. Rölatif ekspresyon seviyesi = $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Bu yönteme göre hedef miRNA'lar ile hsa-miR-16-5p referans miRNA ve UniSp6 spike-in geometrik ortalama değeri arasındaki fark olan ΔC_t değerleri, gruplarındaki her kişi için hesaplanmıştır. Sonrasında GA tedavisi alan RRMS hasta ve naif RRMS hasta gruplarındaki bireylerin ΔC_t değerlerinden kontrol grubunun ortalama ΔC_t değeri çıkartılarak her bireyin $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan $\Delta\Delta C_t$ değerlerinin üstel fonksiyonları hesaplanmış ve rölatif ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir.

2.2.6. ELISA ile IFN-gama plazma protein seviyesinin belirlenmesi

RRMS hastalarının ve sağlıklı kontrol bireylerin plazma örneklerinden IFN-gama seviyelerinin tespit edilmesi için enzim bağlı immünosorban analizi (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) gerçekleştirilmiştir. ELISA yöntemi, antijen antikor eşleşmesine dayanır, ortamdaki analit yoğunluğunun enzim aktivitesine bağlı bir şekilde kantitatif olarak tayinidir. ELISA çalışması için ölçüm aralığı 1.6-100 pg/mL ve analitik hassasiyeti 0.99 pg/mL olan Human IFN-gamma High Sensitivity ELISA Kit (Thermo Fisher) kullanılmıştır. ELISA kit içeriğinde yer alan malzemeler ve açıklamaları Çizelge 2.10'da açıklamalarıyla birlikte özetlenmiştir.

Çizelge 0.10: ELISA kiti içeriği ve reaktifler.

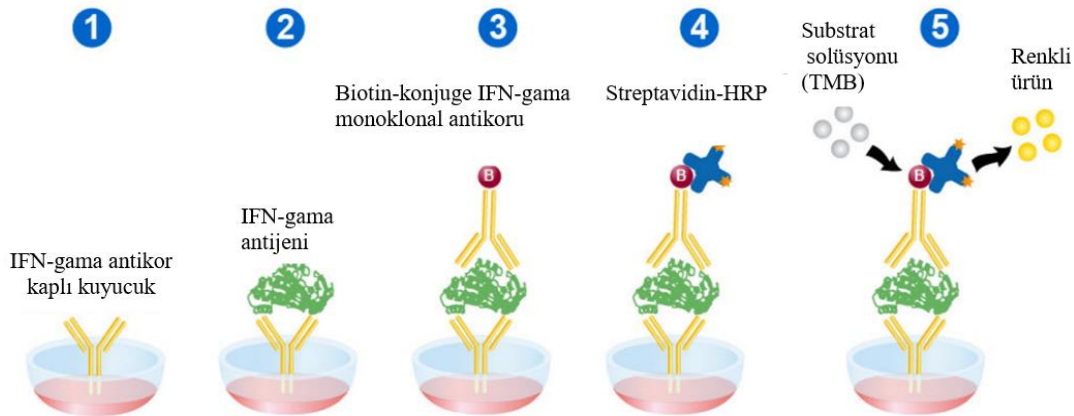
Reaktifler	Adet	Açıklama
IFN-gama antikorlu ile kaplı 96-kuyulu plaka	1	Örneklerin yükleneceği antikor kaplı kuyucukları içerir. Ekstra mikro kuyucuk şeritleri mevcutsa çıkartılıp folyo torbada 2 °C-8 °C'de saklanır.
Liyofilize IFN-gama standardı	2	Liyofilize halde gelmektedir. Ölçüm yapılması için standart eğri çiziminde kullanılır.
Biotin-konjuge anti-IFN-gama monoklonal antikorlu	1 x 100 µL	Biotin içeren antikor bulunur.
Streptavidin-horse radish peroxidase (HRP)	1 x 150 µL	Streptavidin ile konjuge HRP içerir.
Substrat solüsyonu	1 x 15 mL	TMB (Tetrametil-benzidin) içerir. HRP ile reaksiyona girerek renk değişimi oluşturur.
Amplifikasyon konsantresi (2x)	1 x 7 mL	Amplifikasyon reaktifi I ve II solüsyonlarının hazırlanması için gereklidir.
Amplifikasyon reaktifi I	1 x 75 µL	Streptavidin-HRP eklenmesi aşamasından sonra kuyulara eklenir. Amplifikasyon verimini artırır.
Amplifikasyon reaktifi II	1 x 15 µL	Amplifikasyon reaktifi I'in eklenmesi aşamasından sonra kuyulara eklenir. Amplifikasyon verimini artırır.
Yıkama tamponu konsantresi 20X (%1 Tween 20 ile PBS)	1 x 50 mL	Yüklemeler arası yıkamalarda kullanılır.
Assay tampon konsantresi 20X	1 x 5mL	%1 Tween 20 ile PBS, %10 BSA içermektedir. Reaktiflerin seyreltmesinde kullanılır.
Örnek seyreltici	1 x 12 mL	Örnek seyreltici konsantrasyonu araştırılan proteinler veya antikorlar için spesifik bir tampon solüsyondur ve arka plandaki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmektedir.
Reaksiyon durdurma sıvısı (1M Fosforik asit)	1 x 15 mL	Reaksiyonu durdurmak için kullanılır.
Yapışkan film	8	İnkübasyon aşamasında plakayı dış etkenlerden korur.

IFN-gama proteininin plazma seviyesinin belirlenmesi çalışmasında öncelikle -86 °C’de saklanmakta olan plazma örnekleri eritilmiş, homojen bir dağılım sağlanması için vorteks işlemi uygulanmış ve çalışma süresince buz üzerinde muhafaza edilmişlerdir. Tampon konsantreleri oda sıcaklığına getirilmiş, kristaller oluşmuşsa, tamamen eriyene kadar ısıtılmış ve kit üreticisinin önerdiği prosedüre göre seyreltilmişlerdir.

Kit içerisinde liyofilize halde bulunan insan IFN-gama standardı kit yönergesine göre, konsantrasyonu 200 ng/mL olacak şekilde seyreltilmiş, standartlar hazırlanmadan önce yine kit üreticisinin önerdiği şekilde, 2 ng/mL konsantrasyonunda ‘Dilüsyon 1’ ve 20 pg/mL konsantrasyonunda ‘Dilüsyon 2’ içeriği kit kılavuzunda bulunan ‘Analiz Sertifikası’nda belirtildiği gibi hazırlanmış, ardından seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Seri dilüsyonlar ile hazırlanan 4 adet standart (10 pg/ mL, 2.5 pg/ mL, 0.63 pg/ mL, 0.16 pg/ mL), 10-30 dakika seyreltilmiş bir şekilde bekletilmiştir. Plazma örneklerinin, negatif kontrolün (blank) ve standartların yüklenmesi için gerekli sayıda kuyucuk belirlenmiş, mikro plaka tasarımı yapılmıştır.

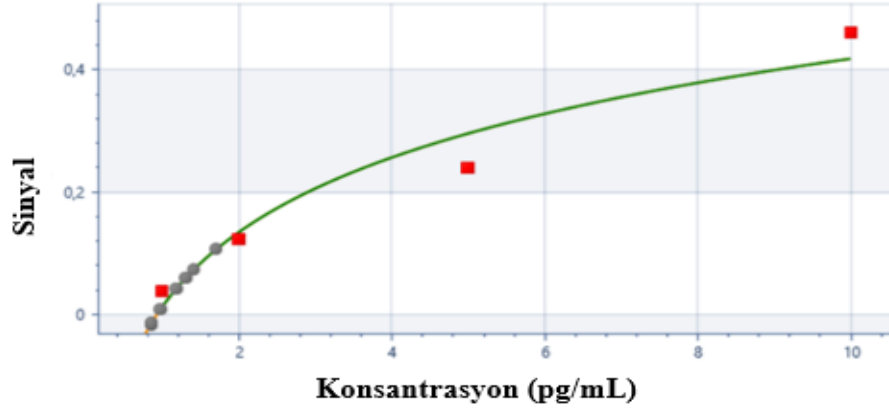
Başlangıçta hazırlanmış ve konsantrasyonları 10 pg/ mL, 2.5 pg/ mL, 0.63 pg/ mL, 0.16 pg/ mL olan standartlar 100 µL hacimde, duplike bir şekilde kuyucuklara yüklenmişlerdir. Ardından sırası ile blank kuyucuklarına 100 µL; örnek kuyucuklarına ise 50 µL örnek seyreltici eklenmiştir. Örnek seyreltici, ELISA reaksiyonunda yanlış pozitif sinyalleri en aza indirmek amacıyla kullanılmıştır. Takiben, 50 µL plazma örneği numune kuyucuklarına duplike olarak dağıtılmıştır. IFN-gama proteinine spesifik antikorlar kit üreticisi tarafından, kit içeriğinde bulunan ve reaksiyonun gerçekleştirileceği mikro plakaların kuyucuklarına immobilize edilmişlerdir. Dolayısı ile kuyucukların içi anti-human IFN-gama antikorları ile kaplıdır. ELISA çalışmasında, yüklenen plazma örneğinde veya standartta bulunan IFN-gama proteinini belirli bir epitopundan bu immobilize antikorlara bağlanmıştır. Daha sonra, IFN-gama proteinine farklı bir epitoptan bağlanacak olan birincil antikorlar olarak 50 µL biotin-konjuge anti-insan IFN-gama antikorları kuyucuklara yüklenmiştir. Ardından mikro plakalar yapışkan bir filmle örtülmüş ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalamalı inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Inkübasyonun ardından her kuyucuk 400 µL yıkama tamponu ile 6 kez yıkanmış ve yıkama adımları ile bağlanmamış biotin-konjuge anti-IFN-gama antikorları uzaklaştırılmıştır. Streptavidin ile konjuge HRP enzimi ile bağlı

100 µL ikincil antikor sisteme dâhil edilmiş ve biotin-konjuge anti-IFN-gama antikoruna bağlanmıştır. Sonrasında mikro plaka yapışkan bir filmle örtülmüş ve mikro plaka çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan 100 µL amplifikasyon I ve II solüsyonları kuyucuklara eklenmiş, 30 dakika yine aynı şartlarda çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bir sonraki aşamada, 6 kez 400 µL yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmış ve bağlanmamış streptavidin ile konjuge HRP enzimi ile bağlı ikincil antikor yıkama adımları sırasında uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında, tüm kuyucuklara 100 µL TMB substrat solüsyonu eklenmiştir. Yoğun ışığa doğrudan maruziyet engellenmiş, oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika çalkalamalı inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Her kuyucuğa 100 µL durdurma solüsyonu hızla pipetlenerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Enzimi tamamen etkisiz hale getirmek için, durdurma çözeltisinin mikro kuyucuklar boyunca hızlı ve eşit bir şekilde yayılması önemlidir. Prosedür sonunda, numunede veya standartta bulunan insan IFN-gama miktarıyla orantılı olarak renkli bir ürün oluşmuştur (Şekil 2.9) ve kantitatif ölçümler ve analizler Multiskan™ GO Microplate Spektrofotometresi (Thermo Scientific™, ABD) ile yapılmıştır. Bu cihaz, bilgisayara bağlı olup SkanIT yazılımı aracılığı ile kullanılmaktadır. Cihaza plaka dizaynı tanıtılmış ve ölçüm protokolü oluşturulmuştur.



Şekil 0.9: ELISA prosedürü (URL-23). Streptavidin-HRP: Streptavidin-horse radish peroxidase, TMB: Tetrametil-benzidin.

Ardından, oda sıcaklığında 450 nm’de spektrofotometrik ölçüm alınmış, absorbans değerlerinin ortalamaları alınıp, blank subtraction yapıldıktan sonra SkanIT programında standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 2.10). Grafiğin denklemi kullanılarak her örnekteki IFN-gama konsantrasyonu tespit edilmiştir.



Şekil 0.10: Standart eğri grafiği ($y = 0.406343\lg(x) + 0.0128912$ $R^2: 0.942$), SkanIT programında oluşturulmuştur, kırmızı noktalar standartları, gri noktalar örnekleri, grafik çizgisindeki turuncu renk ise ekstrapolasyon sonucu grafik çizgisinin uzatılan kısmını göstermektedir).

Ekstrapolasyon, bilinen veri noktalarının ayırık kümesi dışında yeni veri noktaları oluşturma işlemidir. Grafik çizgisini elde edilen konsantrasyon değerlerine yaklaştırmak için, grafiğin formülasyonu baz alınarak ‘ekstrapolasyon’ tekniği ile grafik sınırları genişletilmiştir. Chileshe ve arkadaşlarının 2019’da yaptığı bir çalışmada, gergedan plazmasında bulunan IFN-gama konsantrasyonlarını belirlemek için ELISA testi yapılmış, elde edilen konsantrasyon değerlerinin düşük olması sebebi ile değerlerin standart eğri grafiğinin altında kalması problemi ile karşılaşmış ve bu sorun bizim çalışmamızda da olduğu gibi grafiğin formülü baz alınarak ‘ekstrapolasyon’ tekniği ile çözülmüştür (Chileshe vd., 2019). Örnekler 1:2 oranında (50 µL plazma örneği, 50 µL örnek seyreltici) seyreltildiği için cihazda ölçülen konsantrasyon değeri 2 ile çarpılmış ve örneklerin konsantrasyonları da buna göre tespit edilmiştir. Ekstrapolasyon tekniği ile oluşturulan standart eğri grafiği Şekil 2.10’da verilmiştir.

2.2.7. İstatistiksel ve *in silico* analizler

Yaş, plazma IFN-gama, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyeleri gibi sürekli değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiş, P değerleri 0.05'ten küçük çıktığı için parametrelerin normal dağılmadığı kabul edilmiştir. Normal dağılmayan bu parametreler için, ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi, ikiden fazla grubu içeren karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal Wallis testi sonucunda, anlamlı bir fark çıktığı durumda post-hoc analizi için Mann-

Whitney U testi kullanılmıştır. Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. Plazma IFN-gama, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyeleri ve klinik parametreler orta düzey EDSS riskine ($EDSS > 3$) ve hızlı MS progresyon riskine ($MSSS > 5$) göre iki grup arasında Man Whitney U testi ile; üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmış; anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. Cinsiyet, genotip ve alel frekansı gibi kategorik değişkenler yüzde veya oran şeklinde ifade edilmiş ve χ^2 testi ile karşılaştırılmıştır.

Genotip ve alel karşılaştırması yapmadan önce hasta ve kontrol gruplarında SNP'ye ait alellerin Hardy-Weinberg dengesine uyup uymadığına, χ^2 testi ile bakılmıştır. Ardından, hasta ve kontrollerin genotip ve alel frekanslarındaki farklılıklar χ^2 testi ile belirlenmiş, olasılık oranı (odds ratio, OR) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, SNPStats programı kullanılarak, yaş ve cinsiyet bilgisi dâhil edilerek, bu parametreler için dengelenmiş OR, güven aralığı (confidence interval, CI) ve P değerleri, farklı genetik modeller altında hesaplanmıştır. Bu modellerin Akaike bilgi ölçütü (Akaike information criterion, AIC) ve Bayesian bilgi ölçütü (Bayesian information criterion, BIC) değerlerine bakılarak en uygun genotip modelinin hangisi olduğuna karar verilmiştir.

miRNA ekspresyonu ve ELISA sonuçlarının tanısal değerini test etmek için receiver operator characteristic (ROC) eğrisi çizilmiş ve eğrinin altındaki alan (area under the curve, AUC) hesaplanmıştır. AUC, tanı testinin, hastalar ile kontrolleri tespit etmedeki doğruluk oranını göstermektedir. Test sonuçlarına göre, 0.90-1.00 aralığındaki bir AUC değeri "mükemmel" (excellent) olarak kabul edilirken, 0.80-0.90 aralığındaki bir değer "iyi" (good), 0.70-0.80 aralığındaki bir değer "orta" (fair), 0.60-0.70 aralığındaki bir değer "zayıf" (poor) ve 0.50-0.60 aralığındaki bir değer ise "başarısız" (fail) olarak kabul edilmektedir (Çizelge 2.11). ROC analizinin sonucunda, tanı testlerinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan özgüllük (specificity) ve duyarlılık (sensitivity) değerleri belirlenmiş; AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumlarda kesme (cut-off) değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda kesme (cut-off) değerleri hesaplanmıştır: Duyarlılık + özgüllük-1 formülüne karşılık gelen, duyarlılık ve özgüllük değerlerinin maksimum olduğu nokta (youden indeksi) hesaplanarak kesme

değerleri belirlenmiştir. Youden indeks değerinin maksimum olduğu birden fazla nokta olduğu durumda duyarlılığı yüksek olan değer seçilmiştir. MS hastalığı için erken teşhisin önemi yadsınamaz bir gerçektir ve maksimum duyarlılığa sahip bir ölçütün olması amacımıza uygun bir seçim olmuştur. ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren modellerde hata matrisi yapılarak, modelin duyarlılık, özgüllük ve doğruluk (accuracy) değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 0.11: AUC değerlerine göre analizin başarı derecelendirmesi.

AUC	Değerlendirme
0.90-1.00	Mükemmel
0.80-0.90	İyi
0.70-0.80	Orta
0.60-0.70	Kötü
0.50-0.60	Başarısız

Fenotipler (miRNA ve ELISA sonuçları, EDSS skorları) ile genotipler arasındaki korelasyon ilişkisi parametrelerin normal dağılım göstermesi durumunda Pearson korelasyon yöntemi ile, normal dağılmadıkları durumda ise Spearman korelasyonu yöntemi ile, tüm çalışma grupları bir arada veya tek tek ele alınarak, incelenmiştir. Çoklu analizlerde Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Alellerin, genotiplerin, fenotiplerin tek başına veya birlikte MS ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için lojistik regresyon analizi yapılmış, kalibrasyonu Hosmer-Lemeshow testi ile kontrol edilmiştir. Genotip analizleri dışında gerçekleştirilen testlerde anlamlılık sınırı 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır. Genotip analizlerinde ise anlamlılık sınırı $0.05/n$ (n =test sayısı) olarak yeniden düzenlenmiştir. Çoklu testlerin yapıldığı diğer analizlerde, P değerleri Bonferroni düzeltmesiyle $\alpha \times n$ ($\alpha=P$ değeri; n =yapılan test sayısı) olarak SPSS programı tarafından yeniden hesaplanmıştır. Bahsedilen bu istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 26 kullanılmıştır.

hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve *IFNG* etkileşimlerini içeren *in silico* analiz, miRNA ağı (miRNA network, miRNET) programı (URL-24) kullanılarak ve Kyoto genler ve genomlar ansiklopedisi (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)

veri tabanından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef genler; otoimmünite, nörodejenerasyon, T ve B hücre proliferasyonu, doğal ve edinilmiş bağışıklık yanıtları gibi MS ile ilişkili ve EBV enfeksiyonu ile ilişkili yolaklarda görev almaları göz önünde bulundurularak filtrelenmiştir. Genlerin ilişkileri $P < .05$ gözetilerek hipermetrik test sonuçlarına göre taşınabilir ağ grafiği (portable network graphic, PNG) formatında görselleştirilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. RRMS Hastalarının ve Sağlıklı Kontrollerin Çalışmaya Dâhil Edilmesi

3.1.1. Genetik polimorfizm çalışma grubu

Bu tez çalışmasında, genetik polimorfizm grubuna 330 RRMS hastası ve 330 sağlıklı kontrol birey dâhil edilmiştir. Genetik polimorfizm grubundaki hasta ve kontrollerin demografik bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 2.1: Genotip çalışmasında RRMS hastası ve kontrol gruplarının demografik özellikleri.

	RRMS (n=330)	Kontrol (n=330)	P
Yaş (yıl) , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3) değer aralığı (min.-maks.)	34.1 $\pm$ 9.3 34.0 (26.0-41.0) 42.0 (18.0-60.0)	33.4 $\pm$ 10.2 31.0 (25.0-39.3) 47.0 (18.0-65.0)	.15 ^a
Cinsiyet Erkek/Kadın Erkek (%)	114/216 34.6	131/199 39.7	.17 ^b
Yaş için değerler ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3), üçüncü satırda değer aralığı (min.-maks.) şeklinde verilmiştir. ^a P değeri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir, ^b P değeri χ^2 testi ile belirlenmiştir.			

Çalışma grubunda bulunan 330 RRMS hastasının cinsiyete göre analiz edilen klinik ve demografik bilgileri Çizelge 3.2’de verilmiştir. RRMS’li erkek ve kadın hastalar arasında yaş, teşhis yaşı, hastalık ve tedavi süresi, total kolesterol ve 25-hidroksivitamin D düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur. Hastalar, teşhis veya tedaviye başlanması ardından, doktor kontrolünde 25-hidroksivitamin D₃ takviyesi almıştır. RRMS’li erkek hastaların EDSS ($P=.01$) ve MSSS ($P=.02$) skorları RRMS’li kadın hastaların skorlarına kıyasla daha yüksektir. Çalışma popülasyonunun çoğu (%93.6) hafif düzey EDSS ($EDSS \leq 3$) skorlarına sahiptir. Hafif (≤ 3) ve orta (>3) düzey EDSS skorlarına sahip RRMS hastalarının sıklığı cinsiyet açısından incelendiğinde kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir fark görülmüştür; erkek hastaların içinde orta düzey EDSS skoruna sahip olma oranı (%10.6) kadınlarda olduğundan (%4.2) daha yüksektir ($P=.02$). Çalışma popülasyonunun çoğu (%87.2) hastalığı yavaş ilerleyen ($MSSS \leq 5$) hastaları içermektedir.

Kadın ve erkek RRMS hasta sayıları hastalığın yavaş veya hızlı progresyonu açısından ayrı ayrı incelendiğinde sınırdan anlamlı bir cinsiyet farkı gözlenmiştir ($P=.05$).

Çizelge 2.2: RRMS'li hastaların klinik ve demografik bilgileri.

	Erkek (n=114, %34.55)	Kadın (n=216, %65.45)	Toplam (n=330)	P
Yaş (yıl), ortalama $\pm$ SS	34.8 $\pm$ 9.6	33.7 $\pm$ 9.2	34.1 $\pm$ 9.3	
medyan (Q1-Q3)	35.5 (27.0-41.3)	33.0 (26.0-41.0)	34.0 (26.0-41.0)	.32
değer aralığı (min.-maks.)	36.0 (18.0-54.0)	42.0 (18.0-60.0)	42.0 (18.0-60.0)	
Teşhis yaşı (yıl), ortalama $\pm$ SS	29.9 $\pm$ 8.8	29.5 $\pm$ 8.7	29.6 $\pm$ 8.7	
medyan (Q1-Q3)	30.0 (22.0-37.0)	27.0 (22.0-36.0)	28.0 (22.0-37.0)	.67
Hastalık süresi (yıl), ortalama $\pm$ SS	5.0 $\pm$ 5.4	4.5 $\pm$ 4.8	4.7 $\pm$ 5.0	
medyan (Q1-Q3)	3.0 (1.0-8.0)	3.0 (1.0- 6.8)	3.0 (1.0- 7.0)	.67
EDSS, ortalama $\pm$ SS	1.6 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 1.1	
medyan (Q1-Q3)	1.5 (1.0-2.3)	1.0 (0.5-2.0)	1.0 (0.5-2.0)	.01
Hafif düzey, EDSS $\leq$ 3 (n, %)	101 (89.4)	206 (95.8)	307 (93.6)	
Orta düzey, EDSS $>$ 3 (n, %)	12 (10.6)	9 (4.2)	21 (6.4)	.02
MSSS, ortalama $\pm$ SS	2.9 $\pm$ 2.0	2.4 $\pm$ 1.8	2.6 $\pm$ 1.9	
medyan (Q1-Q3)	2.4 (1.2-4.3)	2.1 (0.9-3.3)	2.4 (1.0-3.5)	.02
Yavaş progresyon, MSSS $\leq$ 5 (n, %)	93 (82.3)	193 (89.8)	286 (87.2)	
Hızlı progresyon, MSSS $>$ 5 (n, %)	20 (17.7)	22 (10.2)	42 (12.8)	.05
Tedavi süresi (yıl), ortalama $\pm$ SS	3.9 $\pm$ 4.5	3.3 $\pm$ 3.8	3.5 $\pm$ 4.1	
medyan (Q1-Q3)	2.0 (0.0-6.0)	2.0 (0.0-5.0)	2.0 (0.0-5.3)	.45
DMT (n, %)	94 (82.5)	184 (85.2)	278 (84.2)	.84
Interferon-β	23 (24.5)	34 (18.5)	57 (20.5)	.24
GA	11 (11.7)	33 (17.9)	44 (15.8)	.18
Dimetil fumarat	12 (12.8)	28 (15.2)	40 (14.4)	.58
Teriflunomid	23 (24.5)	45 (24.5)	68 (24.5)	>.99
Fingolimod	21 (22.3)	36 (19.6)	57 (20.5)	.59
Kladribin	2 (2.1)	2 (1.1)	4 (1.4)	.48
Alemtuzumab	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.4)	.85
Okrelizumab	2 (2.1)	4 (2.2)	6 (2.2)	>.99
Ritüksimab	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.4)	.36
TG (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	3.9 $\pm$ 2.4	3.0 $\pm$ 2.3	3.3 $\pm$ 2.3	
medyan (Q1-Q3)	3.0 (2.2-5.1)	2.5 (1.8-3.6)	2.7 (1.9-4.0)	<.001
Total kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	4.6 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 1.0	4.6 $\pm$ 1.0	
medyan (Q1-Q3)	4.6 (3.8-5.4)	4.5 (3.9-5.1)	4.5 (3.9-5.1)	.84
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	
medyan (Q1-Q3)	1.1 (1.0-1.2)	1.3 (1.1-1.6)	1.2 (1.0-1.5)	<.001
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	2.8 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.9	
medyan (Q1-Q3)	2.7 (2.2-3.2)	2.5 (2.0-3.1)	2.6 (2.1-3.1)	.04
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	0.8 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.5	
medyan (Q1-Q3)	0.7 (0.5-1.0)	0.5 (0.4-0.7)	0.6 (0.4-0.8)	<.001
25-hidroksivitamin D (nmol/L), ortalama $\pm$ SS	29.3 $\pm$ 22.1	29.8 $\pm$ 22.8	29.6 $\pm$ 22.6	
medyan (Q1-Q3)	21.0 (15.0-34.0)	23.0 (15.0-37.0)	23.0 (15.0-36.0)	.68
Sigara (Evet, n %)	67 (58.8)	35 (16.3)	102 (31.0)	<.001

Yaş değerleri ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3), değer aralığı (min.-maks.) şeklinde verilmiştir. İlk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3 çeyrekleri) olarak ifade edilen veriler, Mann-Whitney U testi kullanılarak; frekans ve yüzde olarak ifade edilen veriler χ^2 testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. EDSS, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS, Multipl Skleroz Şiddet Skoru; DMT, Hastalık Seyrini Değiştiren Tedavi; TG: trigliserit; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; VLDL, çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

Erkek RRMS hastalarında trigliserit ($P < .001$), düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-kolesterol) ($P = .04$), çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (very low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-kolesterol) ($P < .001$) düzeyleri kadın RRMS hastalarında olduğundan daha yüksektir. Ancak, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-kolesterol) ($P < .001$) erkek hastalarda kadınlara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktür. Ayrıca sigara kullanımı erkek hastalarda (%58.8) kadın hastalara göre (%16.3) anlamlı derecede daha fazladır ($P < .001$). Erkek ve kadın hastalar için kullanılan DMT'ler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. RRMS'li erkek hastalarda en sık kullanılan tedavi interferon-beta (%24.5) ve teriflunomid'dir (%24.5), kadın hastalarda ise en sık kullanılan tedavi teriflunomid'dir (%24.5).

3.1.2. miRNA ve ELISA çalışma grubu

Genetik polimorfizm grubu içerisinde 25 naif RRMS hastası, 25 GA tedavisi alan RRMS hastası ve 25 sağlıklı kontrol birey miRNA ve ELISA çalışma grubuna dâhil edilmiştir. miRNA ve ELISA çalışma grubunun klinik ve demografik bilgileri Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.3: miRNA çalışma grubunda GA, naif ve kontrol gruplarının klinik ve demografik özellikleri.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
Yaş (yıl), ortalama $\pm$ SS	36.4 $\pm$ 11.8	31.4 $\pm$ 9.5	26.3 $\pm$ 4.7	.01 ^a
medyan (Q1-Q3)	38.0 (25.0-46.0)	31.0 (22.5-38.5)	24.0 (23.0-29.5)	.35 ^b
değer aralığı (min.-maks.)	40.0 (21.0-61.0)	31.0 (19.0-50.0)	15.0 (22.0-37.0)	.42 ^c
Cinsiyet				.01 ^d
Erkek/Kadın	4/21	10/15	9/16	
Erkek %	16.0	40.0	36.0	.14 ^a
Tehiş yaşı (yıl), ortalama $\pm$ SS	30.4 $\pm$ 10.1	30.8 $\pm$ 9.3	-	.90
medyan (Q1-Q3)	32.0 (21.5-39.0)	31.0 (19.0-50.0)	-	
Hastalık süresi (yıl), ortalama $\pm$ SS	5.1 $\pm$ 4.5	1.7 $\pm$ 4.0	-	<.001
medyan (Q1-Q3)	4.0 (1.0-7.0)	0.0 (0.0-1.0)	-	
EDSS, ortalama $\pm$ SS	1.1 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 0.7	-	.17
medyan (Q1-Q3)	1.0 (0.5-1.5)	1.0 (0.0-1.0)	-	
Hafif düzey, EDSS $\leq$ 3 (n, %)	23 (92.0)	25 (100.0)	-	.15
Orta düzey, EDSS $>$ 3 (n, %)	2 (8.0)	0 (0.0)	-	
MSSS, ortalama $\pm$ SS	1.9 $\pm$ 1.9	0.8 $\pm$ 1.5	-	.001
medyan (Q1-Q3)	1.0 (0.5-1.5)	0.0 (0.0-1.1)	-	
Yavaş progresyon, MSSS $\leq$ 5 (n, %)	23 (92.0)	24 (96.0)	-	.55
Hızlı progresyon, MSSS $>$ 5 (n, %)	2 (8.0)	1 (4.0)	-	
Tedavi süresi (yıl), ortalama $\pm$ SS	5.2 $\pm$ 5.4	-	-	-
medyan (Q1-Q3)	3.0 (1.0-7.0)	-	-	
T1 lezyon sayısı, ortalama $\pm$ SS	26.0 $\pm$ 14.8	14.0 $\pm$ 8.5	-	.004
medyan (Q1-Q3)	26.0 (11.3-35.5)	12.0 (8.0-16.5)	-	
T2 lezyon sayısı, ortalama $\pm$ SS	23.0 $\pm$ 12.6	13.0 $\pm$ 8.6	-	.004
medyan (Q1-Q3)	22.5 (11.3-31.5)	11.0 (8.0-14.5)	-	
Kontrast tutan lezyon sayısı, ortalama $\pm$ SS	0.4 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 1.5	-	.002
medyan (Q1-Q3)	0.0 (0.0-0.5)	1.0 (0.0-2.0)	-	
Kontrast tutan lezyon (var) (n, %)	6 (24.0)	17 (68.0)	-	.002

Yaş değerleri ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3), değer aralığı (min.-maks.) şeklinde verilmiştir. Yaş analizlerinde, üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar sonucu elde edilen P değerleri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 ile analiz edilmiştir. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - naif, ^d GA - kontrol arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.

GA tedavisi alan RRMS hastalarının yaş ortalamasının sağlıklı kontrol bireylerin yaş ortalamasına göre yüksek olduğu ($P=.01$), ancak GA ile naif grubu arasında ve naif ile kontrol grubu arasında yaş yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. GA, naif ve kontrol grubu arasında, cinsiyet, teşhis yaşı ve EDSS açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. GA grubunda bulunan RRMS hastalarının hastalık süreleri ($P<.001$) ve MSSS puanlarının ortalaması ($P=.001$), naif grubunda bulunan RRMS hastalarında olduğundan daha yüksek; kontrast tutan lezyon sayısı ise daha düşüktür ($P=.002$). Hasta grupları arasında MRG parametreleri karşılaştırıldığında, T1 lezyon sayılarının ($P=.004$) ve T2 lezyon sayılarının ($P=.004$) GA tedavisi alan RRMS hastalarında naif hastalara kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. Naif ile GA grubunda bulunan RRMS hastalarının kontrast tutan lezyon varlığı frekansı karşılaştırıldığında, naif RRMS hastalarında kontrast tutan lezyon görülme oranının (%68.0) GA tedavisi alan RRMS hastalarinkine kıyasla (%24.0) anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür ($P=.002$). GA grubunun çoğu (%92); naif grubunun tamamı (%100) hafif düzey EDSS ($EDSS \leq 3$) skorlarına sahiptir. Hafif (≤ 3) ve orta (>3) düzey EDSS skorlarına sahip RRMS hastalarının sıklığı tedavi açısından incelendiğinde GA ve naif grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. GA ve naif grubunun çoğu (sırasıyla, %92; %96) yavaş ilerleyen ($MSSS \leq 5$) hastaları içermektedir. Yavaş ($MSSS \leq 5$) ve hızlı ($MSSS > 5$) progresyona sahip RRMS hastalarının sıklığı tedavi açısından incelendiğinde GA ve naif grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.2. *IFNG* rs2069727 T/C Tek Nükleotit Polimorfizminin Genotip ve Alel Frekansları

IFNG rs2069727 T/C SNP'sinin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu görülmüştür. Gözlenen genotip frekansları ile beklenen genotip frekansları arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık görülmemiştir (Çizelge 3.4). *IFNG* rs2069727 T/C SNP genotip ve alel frekanslarının analiz sonucuna göre, polimorfik CC genotipinin RRMS grubunda %21.21, kontrol grubunda %24.24 oranında olduğu görülmüştür. Resesif ve dominant modellerde gruplar arasında OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Resesif modelde, CC genotipi görülme frekansı TC ve TT genotiplerinin görülme frekansı ile karşılaştırıldığında ($P=.35$) ve dominant

modelde, CC ve TC genotipinin görülme frekansı TT genotipinin görülme frekansı ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($P=.10$). Polimorfik C alel frekansının RRMS hasta grubunda 0.456 ve kontrol grubunda 0.500 olduğu görülmüş ve gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir ($P=.11$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 2.4: *IFNG* rs2069727 T/C SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi.

Grup	Genotip	Gözlenen Genotip Frekansları (n)	Beklenen Genotip Frekansları (n)	P
Kontrol	TT	80	82.50	.91
	TC	170	165.00	
	CC	80	82.50	
	Toplam	330		
RRMS	TT	99	97.64	.98
	TC	161	163.73	
	CC	70	68.64	
	Toplam	330		

P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir. χ^2 analizi yapılırken beklenen genotip değerleri en yakın tam sayıya yuvarlanmıştır.

Çizelge 2.5: *IFNG* rs2069727 T/C genotip ve alellerinin yaş ve cinsiyet için dengelenmemiş dağılımı.

<i>IFNG</i> rs2069727 T/C	RRMS (n=330)	Kontrol (n=330)	OR (%95 CI)	P
Genotip, n (%)				
TT	99 (30.00)	80 (24.24)	0.84 ^a (0.58-1.21)	.35 ^a
TC	161 (48.79)	170 (51.52)	0.75 ^b (0.53-1.05)	
CC	70 (21.21)	80 (24.24)		.10 ^b
Alel frekansı				
T	0.544	0.500	0.84 ^c (0.68-1.04)	.11 ^c
C	0.456	0.500		

Resesif model için: ^a CC - TC ve TT, Dominant model için: ^b CC ve TC - TT, ^c C - T. Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve *P* değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası alel frekansı karşılaştırması için OR, CI ve *P* değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.025$ olarak belirlenmiştir.

IFNG rs2069727 T/C SNP analizi, SNPstats web aracı ile farklı genetik modeller altında gerçekleştirilmiştir. SNPStats programında OR, CI ve *P* değerlerinin hesaplanması için öncelikle genotip ve alel frekansları yaş ve cinsiyete göre düzenlenmekte ve bu değerler farklı genetik modellerde lojistik regresyon analizi ile belirlenmektedir. Bu analizde de dominant ve resesif modelde gruplar arasında istatistiki değerlendirme sonucunda anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (dominant modelde: $P=.11$; resesif modelde: $P=.44$). Kodominant, overdominant ve log-additive

modellerinde gruplar arasında istatistiki değerdendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (kodominant modelde: $P=.27$; overdominant modelde: $P=.44$; log-additive modelde: $P=.14$) (Çizelge 3.6). Ayrıca dominant modelin, en düşük AIC ve BIC değerdlerine (AIC: 917.5, BIC: 935.5) sahip olması sebebiyle en uygun model olduğu kabul edmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 2.6: *IFNG* rs2069727 T/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde dağılımlarının RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması (OR ve P değerdleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiştir).

Genotip Modelleri	Genotip, n (%)	RRMS (n=330)	Kontrol (n=330)	OR (%95 CI)	P	AIC	BIC
Kodominant	TT	99 (30.00)	80 (24.24)	1.00*	.27	919.4	941.9
	TC	161 (48.79)	170 (51.52)	0.77 ^a (0.53-1.11) ^a			
	CC	70 (21.21)	80 (24.24)	0.73 ^b (0.47-1.13) ^b			
Dominant	TT	99 (30.00)	80 (24.24)	1.00*	.11	917.5	935.5
	TC-CC	231 (70.00)	250 (75.76)	0.75 ^c (0.53-1.07) ^c			
Resesif	TT-TC	260 (78.79)	250 (75.76)	1.00*	.44	919.5	937.4
	CC	70 (21.21)	80 (24.24)	0.86 ^d (0.60-1.25) ^d			
Overdominant	TT-CC	169 (51.21)	160 (48.48)	1.00*	.44	919.5	937.4
	TC	161 (48.79)	170 (51.52)	0.89 ^e (0.65-1.20) ^e			
Log-additive	---	---	---	0.85 ^f (0.68-1.06) ^f	.14	917.9	935.9

Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerdleri SNPstats programı kullanılarak lojistik regresyon analizi ile yaş ve cinsiyete göre dengelenerek belirlenmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.01$ olarak belirlenmiştir. *Referans değerd, ^aTC - TT, ^bCC - TT, ^cTC ve CC - TT, ^dCC - TT ve TC, ^eTC - TT ve CC, ^fC - T. AIC: Akaike information criterion, BIC: Bayesian information criterion.

IFNG rs2069727 T/C SNP genotiplerine göre sınıflandırılmış RRMS hastalarının teşhis yaşı, hastalık süresi, EDSS, MSSS ve tedavi süresi gibi klinik parametreleri resesif ve dominant modellere göre karşılaştırılmış (Çizelge 3.7) ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür.

Çizelge 2.7: *IFNG* rs2069727 T/C SNP genotiplerine göre sınıflandırılmış RRMS hastalarının klinik parametrelerinin resesif ve dominant modellere göre karşılaştırılması.

Klinik Bilgiler	rs2069727 T/C			
	TT (n=99)	TC (n=161)	CC (n=70)	P
Teşhis yaşı (yıl) , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	28.5 $\pm$ 8.6 27.0 (22.0-35.0)	30.2 $\pm$ 8.6 29.0 (23.5-37.0)	29.8 $\pm$ 9.4 27.5(21-37.3)	.95 ^a .19 ^b
Hastalık süresi (yıl) , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	5.1 $\pm$ 5.2 4.0 (1.0-8.0)	4.8 $\pm$ 5.1 3.0 (1.0-7.0)	4.1 $\pm$ 4.6 3.0 (0.0-6.0)	.28 ^a .38 ^b
EDSS , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.3 $\pm$ 1.0 1.0 (1.0-2.0)	1.3 $\pm$ 1.1 1.0 (0.5-2.0)	1.4 $\pm$ 1.1 1.5 (0.5-2.0)	.61 ^a .80 ^b
MSSS , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.4 $\pm$ 1.8 2.0 (1.1-3.5)	2.5 $\pm$ 1.8 2.3 (1.0-3.2)	2.9 $\pm$ 2.0 2.4 (1.0-4.3)	.16 ^a .51 ^b
Tedavi süresi (yıl) , ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	3.8 $\pm$ 3.9 3.0 (0.0-6.0)	3.6 $\pm$ 4.3 2.0 (0.0-6.0)	3.0 $\pm$ 3.8 2.0 (0.0-4.0)	.19 ^a .26 ^b

İlk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3 çeyrekleri) olarak ifade edilen veriler, Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Resesif model için: ^a CC - TC ve TT, Dominant model için: ^b CC ve TC - TT. EDSS, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS, Multipl Skleroz Şiddet Skoru.

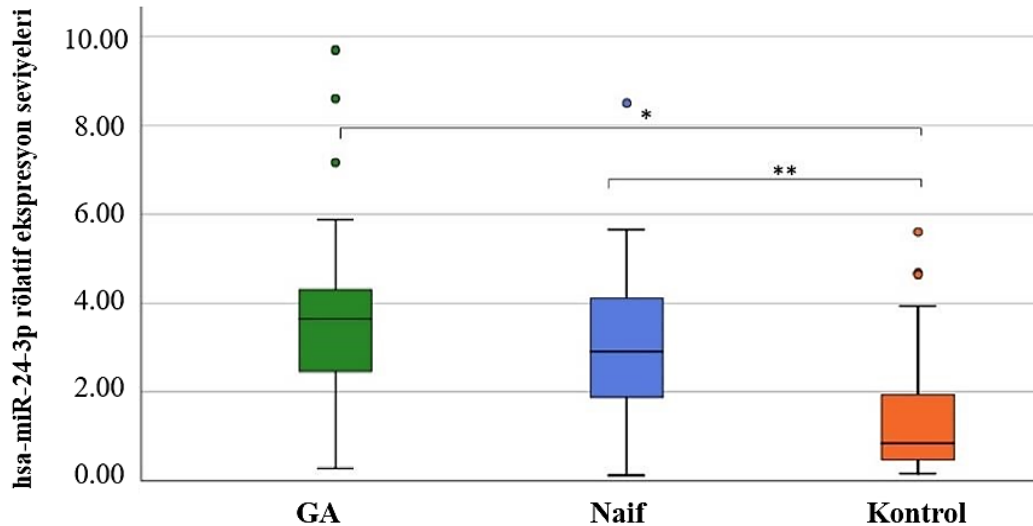
3.3. Plazma Rölatif miRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri

3.3.1 Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesinin belirlenmesi

Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu yöntem bölüm 2.2.5'te ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Plazma rölatif ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi sonucunda, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda (3.92 ± 2.19) ve naif grubundaki hastalarda (3.10 ± 1.87), kontrol grubundaki bireyler ile karşılaştırıldığında (1.57 ± 1.57) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (üç grup arasında: $P < .001$, naif - kontrol: $P = .01$, GA - kontrol: $P < .001$) (Çizelge 3.8) (Şekil 3.1).

Çizelge 2.8: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change).

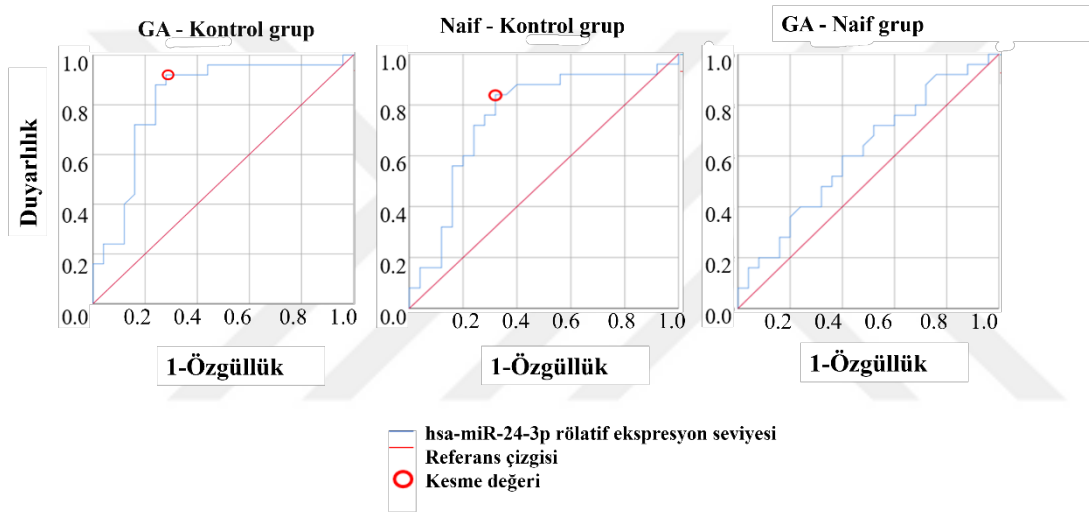
	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
hsa-miR-24-3p	3.92 ± 2.19 3.64 (2.26-4.75)	3.10 ± 1.87 2.91 (1.76-4.12)	1.57 ± 1.57 0.84 (0.45-2.26)	$<.001^a$.01 ^b $<.001^c$.70 ^d
Rölatif ekspresyon seviyeleri ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir.				



Şekil 2.1: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-24-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesi. GA: glatiramer asetat. *Hsa (homo sapiens) ön eki insan miRNA'larını belirtmek için kullanılmaktadır. *: $P < .001$, **: $P = .01$.

3.3.2. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi için ROC analizleri

Rölatif ekspresyon seviyesi yönünden gruplar arasında farklılık görülmesi üzerine, bu parametrelerin tanıs al performansının tespit edilmesi ve klinik tanı belirteci potansiyelinin incelenmesi için ROC analizi yapılmıştır. ROC eğrilerinde, X ekseninde “1-özgüllük” değeri yer alırken, Y ekseninde “duyarlılık” değeri yer almaktadır. Her kesim noktasındaki “1-özgüllük” ve “duyarlılık” değerine karşılık gelen noktalar birleştirilerek ROC eğrisi oluşturulmaktadır. ROC eğrisi (0.0) ile (1.1) arasında artan bir fonksiyon grafiğidir. AUC en küçük 0.5 ve en b   k 1 değerini alabilmektedir (Kılıç, 2013). ROC analizi sonucunda, tanı testlerinin gücünü değerlendirmede kullanılan özgüllük, duyarlılık ve AUC değerleri belirlenmiştir.



şekil 2.2: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin (fold change) gruplar arasındaki ROC eğrileri.

Belirlenen AUC değerleri bölüm 2.2.7’de verilmiş olan başarı derecelendirme skalasına göre değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda kesme değerleri hesaplanmıştır. Hem duyarlılık hem de özgüllük değerlerinin maksimum olduğu noktayı bulmak için “duyarlılık + özgüllük-1” değerine karşılık gelen youden indeks değeri hesaplanmış; youden indeks değerinin maksimum olduğu değere karşılık gelen değer, kesme değeri olarak belirlenmiştir. Sırası ile GA ile kontrol; naif ile kontrol; GA ile naif grupları arasında yapılan plazma ekspresyon seviyesi karşılaştırması sonucu oluşturulan ROC eğrileri şekil 3.2’de gösterilmektedir. ROC analizi ardından elde edilen sonuçlar,  izelge 3.9’da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analiz sonuçları.

Gruplar	ROC analizi sonucu					
	AUC	CI (%95)	P	Kesme değeri	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	0.822 (İyi)	0.70-0.95	<.001	1.77	%92	%72
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	0.751 (Orta)	0.61-0.90	.01	1.57	%84	%68
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA - Naif)	0.612 (Zayıf)	0.46-0.77	.70	---	---	---
AUC: Area Under the Curve						

Youden indeks değerinin maksimum olduğu 2 farklı nokta bulunmuş, bunlardan daha yüksek duyarlılığın sağlandığı nokta olan 1.77 noktası kesme değeri olarak seçilmiştir. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi 1.77'ye eşit veya 1.77'den yüksek olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %92, özgüllüğünün ise %72 olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde ise elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.751, $P=.01$, %95 CI=0.61-0.90). Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin kesme değeri 1.57 olarak belirlenmiştir. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi 1.57'ye eşit veya 1.57'den yüksek olanlar naif RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %84, özgüllüğünün ise %68 olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile naif grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “zayıf” (poor) olduğu görülmüştür (AUC=0.612, $P=.70$, %95 CI=0.46-0.77) (Çizelge 3.9). Bu nedenle kesme değeri hesaplanmamıştır.

3.3.3. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi için hata matrisi analizleri

Hata matrisi, bir sınıflandırma modelinin performansını değerlendirmek amacıyla kullanılan bir metrikler tablosudur. ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç

veren modellerde hata matris tablosu oluşturulmuştur. Hata matrisi ile modelin duyarlılık (sensitivity), özgüllük (specificity) ve doğruluk (accuracy) değerleri belirlenmiştir. Hata matrisinde, hastalar ve kontroller kesme değerine göre belirlenmiştir, kesme değerinin üstünde ve eşit olanlar naif ve GA tedavisi alan RRMS hastası, altında olanlar kontrol olarak kabul edilmiştir. DP (Doğru pozitif), gerçekte hasta olup, tanı testine göre de hasta olma durumudur. YP (Yanlış pozitif), gerçekte kontrol olup, tanı testine göre hasta olma durumudur. YN (Yanlış negatif), gerçekte hasta olup, tanı testine göre kontrol olma durumudur. DN (Doğru negatif), gerçekte kontrol olup, tanı testine göre de kontrol olma durumudur. Tanı testlerinin değerlendirmesi için ölçütlerin hesaplanma formülleri aşağıda verilmiştir:

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN$.

3.3.3.1. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi 1.77'ye eşit veya 1.77'den yüksek olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 18, gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre de GA tedavisi alan RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 23, gerçekte kontrol olup tanı testine göre GA tedavisi alan RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 7 ve gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 2 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.10). Hata matrisine göre plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA tedavisi alan RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %92, özgüllüğü %72 ve doğruluğu %82 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 2.10: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		GA	Kontrol	
Plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesine göre belirlenenler	GA	23 (DP)	7 (YP)	30
	Kontrol	2 (YN)	18 (DN)	20
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.92 = \%92$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.72 = \%72$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.82 = \%82$.

3.3.3.2. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi 1.57'ye eşit veya 1.57'den yüksek olanlar naif RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 17, gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre de naif RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 21, gerçekte kontrol olup tanı testine göre naif RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 8 ve gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 4 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.11). Hata matrisine göre plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %84, özgüllüğü %68 ve doğruluğu %76 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 2.11: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		Naif	Kontrol	
Plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesine göre belirlenenler	Naif	21 (DP)	8 (YP)	29
	Kontrol	4 (YN)	17 (DN)	21
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.84 = \%84$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.68 = \%68$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.76 = \%76$.

Çizelge 2.12: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi sonuçları.

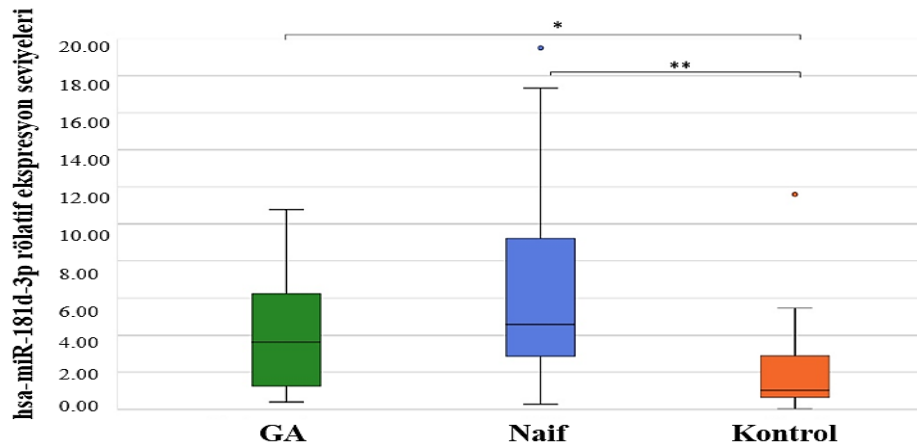
Modeller	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)	Doğruluk (Accuracy)
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	%92	%72	%82
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	%84	%68	%76

3.3.4. Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesinin belirlenmesi

Deneyssel çalışmaların ardından plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmış, yöntem bölüm 2.2.5'te ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Plazma rölatif ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi sonucunda hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda (4.07 ± 3.13) ve naif grubundaki hastalarda (6.18 ± 5.36), kontrol grubundaki bireyler ile karşılaştırıldığında (2.00 ± 2.52) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (    grup arasında: $P=.002$, naif - kontrol: $P=.002$, GA - kontrol: $P=.045$) ( izelge 3.13) (şekil 3.3).

Çizelge 2.13: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change).

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
hsa-miR-181d-3p	4.07 ± 3.13 3.64 (1.16-6.58)	6.18 ± 5.36 4.59 (1.86-9.64)	2.00 ± 2.52 1.05 (0.61-2.90)	.002 ^a .002 ^b .045 ^c >.99 ^d
Rölatif ekspresyon seviyeleri ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. ��� grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir.				

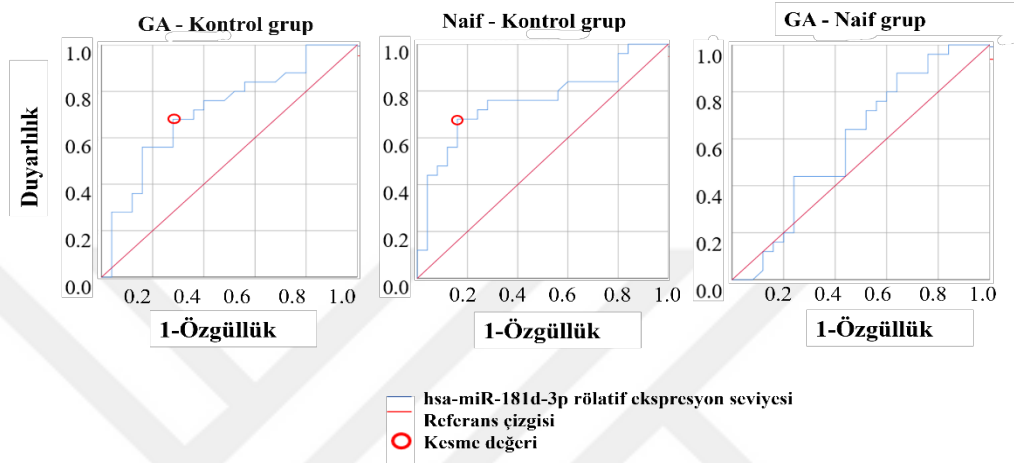


şekil 2.3: GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-181d-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesi. GA: glatiramer asetat. *Hsa (homo sapiens)  n eki insan miRNA'larını belirtmek için kullanılmaktadır. *: $P=.045$, **: $P=.002$.

3.3.5. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için ROC analizleri

Rölatif ekspresyon seviyesi yönünden gruplar arasında farklılık görülmesi üzerine, bu parametrelerin tanısalsal performansının tespit edilmesi ve klinik tanı belirteci potansiyelinin incelenmesi için ROC analizi yapılmıştır (Kılıç, 2013). ROC

analizinde, tanı testlerinin gücünü değerlendirmede kullanılan özgüllük, duyarlılık ve AUC değerleri belirlenmiştir. Belirlenen AUC değerleri bölüm 2.2.7’de verilmiş olan başarı derecelendirme skalasına göre değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda kesme değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arası ROC eğrileri Şekil 3.4’te gösterilmektedir. ROC analizi ardından elde edilen sonuçlar ise Çizelge 3.14’te özetlenmiştir.



Şekil 2.4: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin (fold change) gruplar arasındaki ROC eğrileri.

Çizelge 2.14: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analiz sonuçları.

Gruplar	ROC analizi sonucu					
	AUC	CI (%95)	P	Kesme değeri	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	0.717 (Orta)	(0.57-0.86)	.05	2.32	%68	%72
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	0.759 (Orta)	(0.62-0.90)	.002	3.06	%68	%84
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA -Naif)	0.593 (Başarısız)	(0.43-0.75)	>.99	---	---	---

AUC: Area Under the Curve

Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.717, $P=.045$, %95 CI=0.57-0.86). Youden indeksi değerinin maksimum olduğu nokta olan 2.32 noktası kesme değeri olarak seçilmiştir. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi 2.32’ye

eşit veya 2.32'den yüksek olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %68, özgüllüğünün ise %72 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.4) (Çizelge 3.14). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde ise elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.759, $P=0.002$, %95 CI=0.62-0.90). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin kesme değeri 3.06 olarak belirlenmiştir. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi 3.06'ya eşit veya 3.06'dan yüksek olanlar naif RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %68, özgüllüğünün ise %84 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.4) (Çizelge 3.14). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile naif grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “başarısız” (fail) olduğu görülmüştür (AUC=0.593, $P>0.99$, %95 CI=0.43-0.75) (Şekil 3.4) (Çizelge 3.14). Bu nedenle kesme değeri hesaplanmamıştır.

3.3.6. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için hata matrisi analizleri

3.3.6.1. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi için GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi 2.32'ye eşit veya 2.32'den yüksek olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 18, gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre de GA tedavisi alan RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 17, gerçekte kontrol olup tanı testine göre GA tedavisi alan RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 7 ve gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 8 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.15).

Hata matrisine göre plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA tedavisi alan RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %68, özgüllüğü %72 ve doğruluğu %70 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.17).

Çizelge 2.15: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		GA	Kontrol	
Plazma hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesine göre belirlenenler	GA	17 (DP)	7 (YP)	24
	Kontrol	8 (YN)	18 (DN)	26
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.68 = \%68$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.72 = \%72$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.70 = \%70$.

3.3.6.2. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi 3.06'ya eşit veya 3.06'dan yüksek olanlar naif RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 21, gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre de naif RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 17, gerçekte kontrol olup tanı testine göre naif RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 4 ve gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 8 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.16).

Çizelge 2.16: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		Naif	Kontrol	
Plazma hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesine göre belirlenenler	Naif	17 (DP)	4 (YP)	21
	Kontrol	8 (YN)	21 (DN)	29
	Toplam	25	25	100

Hata matrisine göre plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %68, özgüllüğü %84 ve doğruluğu %76 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.17).

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.68 = \%68$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.84 = \%84$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.76 = \%76$.

Çizelge 2.17: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi sonuçları.

Modeller	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)	Doğruluk (Accuracy)
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	%68	%72	%70
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	%68	%84	%76

3.4. Plazma miRNA (hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p) Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Gruplar Arasında EDSS ve MSSS Ölçütlerine ve rs2069727 T/C SNP'sine göre Karşılaştırma Analizleri

3.4.1. Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi

GA kullanan RRMS ve naif RRMS hastalarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, EDSS ve MSSS puanları ile ilişkisi incelenmiş, engellilik skorları, $EDSS \leq 3$, $EDSS > 3$ ve $MSSS \leq 5$, $MSSS > 5$ olmak üzere gruplandırılmıştır (Çizelge 3.18). GA grubunda bulunan RRMS hastalarının, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre ($P= .24$); yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre ($P= .24$) karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Naif hasta grubunda bulunan tüm RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için, naif grubunda bulunan RRMS hastalarının plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre karşılaştırılamamıştır. Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi, yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre karşılaştırılmış, ancak anlamlı fark bulunmamıştır ($P=.72$).

Hafif düzey ($EDSS \leq 3$) EDSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hafif düzey ($EDSS \leq 3$) EDSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılmış, anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($P= .11$).

Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılamamıştır.

Yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından ($P=.10$); hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılmış ($P= .67$) ve anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.18).

Çizelge 2.18: GA ve naif gruplarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin $EDSS \leq 3$, $EDSS > 3$ ve $MSSS \leq 5$, $MSSS > 5$ ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	P
Hafif düzey, $EDSS \leq 3$ (GA n= 23, Naif n= 25)	4.06 $\pm$ 2.23 3.92 (2.87-5.18)	3.10 $\pm$ 1.90 2.91 (1.80-4.12)	.11
Orta düzey, $EDSS > 3$ (GA n= 2, Naif n= 0)	2.26 $\pm$ 0.28 2.26 (2.06-X)	-	-
P	.24	-	-
Yavaş progresyon, $MSSS \leq 5$ (GA n= 23, Naif n= 24)	4.06 $\pm$ 2.23 3.92 (2.87- 5.18)	3.07 $\pm$ 1.90 2.84 (1.70- 4.12)	.10
Hızlı progresyon, $MSSS > 5$ (GA n= 2, Naif n=1)	2.26 $\pm$ 0.28 2.26 (2.06-X)	3.87 3.87 (3.87-3.87)	.67
P	.24	.72	
Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. 'n' ifadesi, sınırlandırılan ölçüt içerisinde olan kişi sayısını temsil etmektedir. P değeri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. Bazı gruplarda Q3 değeri analiz sonucunda yeterli kişi olmadığı için elde edilmemiş ve yerine 'X' yazılmıştır. EDSS, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS, Multipl Skleroz Şiddet Skoru.			

3.4.2. Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi

GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireyler *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre sınıflandırılmış olup plazma hsa-miR-24-3p plazma rölatif ekspresyon seviyeleri *IFNG* rs2069727 T/C genotip grupları arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.19).

Gruplar Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Resesif (CC - TC ve TT) ve dominant (CC ve TC - TT) modellere göre ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır (Çizelge 3.19).

İstatistiksel analizler sonucunda plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, yabanıl homozigot genotipli (TT) GA grubu hastalarında 4.92 ± 2.71 , naif grubu hastalarında 3.03 ± 3.14 ve kontrol grubu bireylerinde 1.70 ± 1.23 olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir (   grup arasında: $P = .18$) ( izelge 3.19).

Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, heterozigot genotipli (TC) GA grubu hastalarında 3.80 ± 2.33 , naif grubu hastalarında 3.21 ± 1.31 ve kontrol grubu bireylerinde 1.61 ± 1.67 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (   grup arasında: $P = .002$) ( izelge 3.19).

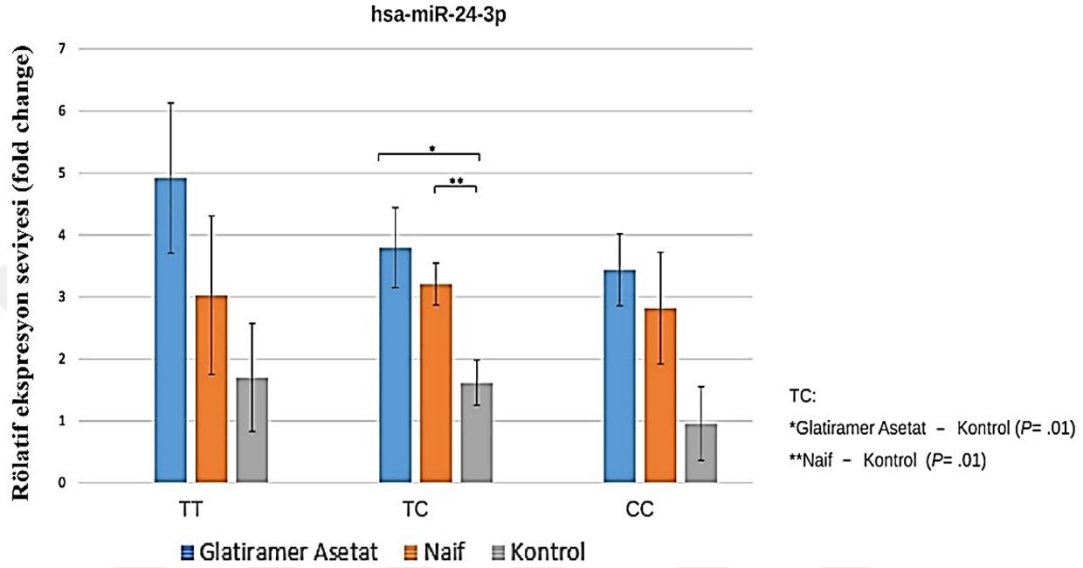
Çizelge 2.19: GA, naif ve kontrol gruplarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre karşılaştırma analizi.

<i>IFNG</i> rs2069727 T/C	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	<i>P</i>
TT (n=13) (GA n= 5, Naif n= 6, Kontrol n= 2)	4.92 ± 2.71 4.12 (3.28-6.96)	3.03 ± 3.14 2.57 (0.26- 5.21)	1.70 ± 1.23 1.70 (0.83-X)	.18 ^a
TC (n=49) (GA n= 13, Naif n= 15, Kontrol n= 21)	3.80 ± 2.33 3.33 (2.01-3.33)	3.21 ± 1.31 2.91 (2.23- 4.12)	1.61 ± 1.67 0.84 (0.45-2.29)	.002 ^a .01 ^b .01 ^c >.99 ^d
CC (n=13) (GA n= 7, Naif n= 4, Kontrol n= 2)	3.44 ± 1.54 3.92 (2.06-4.20)	2.82 ± 1.80 2.35 (1.39- 4.72)	0.96 ± 0.84 0.96 (0.36-X)	.18 ^a
<i>P</i>*	.61	.82	.92	
<i>P</i>**	.21	.90	.62	

Rölatif ekspresyon seviyeleri ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3)  eklinde verilmiştir. Bazı gruplar içerisinde 'kişi sayısı<3' olduğu için Q3 değeri yerine 'X' yazılmıştır. Üç grup arasındaki kar ıla tırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif kar ıla tırmasını göstermektedir. *Resesif modelin: CC - TC ve TT ve **Dominant modelin: CC ve TC - TT karşılaştırma analizi Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir.

Heterozigot genotipe (TC) sahip naif RRMS hastalarının plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin aynı genotipe sahip kontrol kişilerin seviyelerinden anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür ($P = .01$) ( ekil 3.5). Heterozigot genotipe (TC) sahip GA grubu hastalarında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin aynı genotipe sahip kontrol kişilerin seviyelerinden anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P = .01$) ( ekil 3.5) ( izelge 3.19). Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, polimorfik homozigot genotipli (CC) GA grubu hastalarında 3.44 ± 1.54 , naif grubu hastalarında 2.82 ± 1.80 ve kontrol grubu bireylerinde 0.96 ± 0.84 olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık

olmadığı belirlenmiştir ($P=.18$) (Çizelge 3.19). Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, gruplarda, resesif ve dominant modellerde anlamlı ölçüde farklı olmadığı tespit edilmiştir (resesif model: GA: $P=.61$, naif: $P=.82$ ve kontrol: $P=.92$; dominant model: GA: $P=.21$, naif: $P=.90$ ve kontrol: $P=.62$) (Çizelge 3.19). *IFNG* rs2069727 T/C genotip gruplarına göre karşılaştırılan plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin sütun grafiği Şekil 3.5'te sunulmuştur.



Şekil 2.5: Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi. *Hsa (homo sapiens) ön eki insan miRNA'larını belirtmek için kullanılmaktadır. Glatiramer asetat: GA.

3.4.3 Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi

GA kullanan RRMS ve naif RRMS hastalarında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, EDSS ve MSSS puanları ile ilişkisi incelenmiş, engellilik skorları, $EDSS \leq 3$, $EDSS > 3$ ve $MSSS \leq 5$, $MSSS > 5$ olmak üzere gruplandırılmıştır (Çizelge 3.20). GA grubunda bulunan RRMS hastalarının, plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre ($P=.81$); yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre ($P=.81$) karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre karşılaştırılamamıştır. Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının, plazma hsa-miR-181d-3p rölatif

ekspresyon seviyesi, yavaş progresyon (MSSS $\leq$ 5) ve hızlı progresyon (MSSS $>$ 5) MSSS puanlarına göre ($P=.40$) karşılaştırılmış, ancak anlamlı fark bulunmamıştır. Hafif düzey (EDSS $\leq$ 3) EDSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hafif düzey (EDSS $\leq$ 3) EDSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından ($P=.28$) karşılaştırılmış, anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Naif grubunda bulunan RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için orta düzey (EDSS $>$ 3) EDSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile orta düzey (EDSS $>$ 3) EDSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılamamıştır. Yavaş progresyon (MSSS $\leq$ 5) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile yavaş progresyon (MSSS $\leq$ 5) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından ($P=.38$); hızlı progresyon (MSSS $>$ 5) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hızlı progresyon (MSSS $>$ 5) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılmış ($P=.67$) ve anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.20).

Çizelge 2.20: GA ve naif gruplarında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin EDSS $\leq$ 3, EDSS $>$ 3 ve MSSS $\leq$ 5, MSSS $>$ 5 ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	P
Hafif düzey, EDSS $\leq$ 3 (GA n= 23 - Naif n= 25)	4.07 $\pm$ 3.08 3.64 (1.26- 6.24)	6.18 $\pm$ 5.36 4.59 (1.86-9.64)	.28
Orta düzey, EDSS $>$ 3 (GA n= 2 - Naif n= 0)	4.00 $\pm$ 5.05 4.00 (0.43-X)	-	-
P	.81	-	-
Yavaş progresyon, MSSS $\leq$ 5 (GA n= 23 - Naif n= 24)	4.07 $\pm$ 3.08 3.64 (1.26 - 6.24)	6.00 $\pm$ 5.40 4.44 (1.35- 9.22)	.38
Hızlı progresyon, MSSS $>$ 5 (GA n= 2 - Naif n=1)	4.00 $\pm$ 5.05 4.00 (0.43-X)	10.51 10.51-10.51	.67
P	.81	.40	
Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. 'n' ifadesi, sınırlandırılan ölçüt içerisinde olan kişi sayısını temsil etmektedir. P değeri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. Bazı gruplarda Q3 değeri analiz sonucunda yeterli kişi olmadığı için elde edilmemiş ve yerine 'X' yazılmıştır. EDSS, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS, Multipl Skleroz Şiddet Skoru.			

3.4.4 Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi

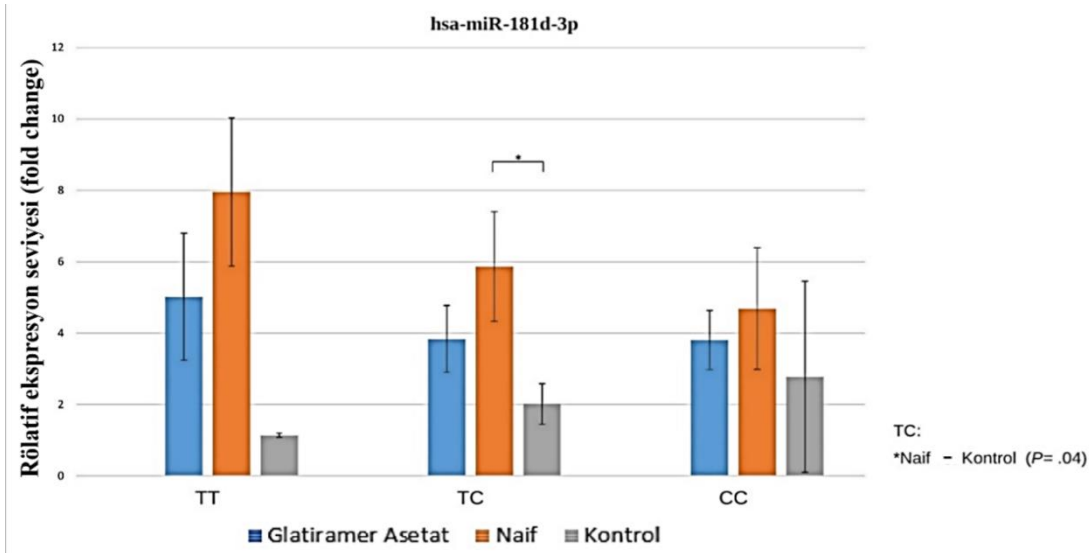
GA, naif ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyeleri *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre gruplandırılarak incelenmiştir. Üç grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda

Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Resesif (CC - TC ve TT) ve dominant (CC ve TC - TT) modellere göre ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır (Çizelge 3.21). İstatistiksel analiz sonucunda plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, yabancı homozygot (TT) genotipli GA grubu hastalarında 5.02 ± 3.97 , naif grubu hastalarında 7.96 ± 5.09 ve kontrol grubu bireylerinde 1.14 ± 0.08 olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir (üç grup arasında: $P=.21$). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, heterozygot genotipli (TC) GA grubu hastalarında 3.84 ± 3.38 , naif grubu hastalarında 5.87 ± 5.95 ve kontrol grubu bireylerinde 2.01 ± 2.61 olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P=.03$). Heterozygot genotipli (TC) naif RRMS hastalarının plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, aynı genotipe sahip kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür ($P = .04$). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, polimorfik homozygot (CC) genotipli GA grubu hastalarında 3.81 ± 2.19 , naif grubu hastalarında 4.69 ± 3.40 ve kontrol grubundaki bireylerde 2.78 ± 3.79 olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P=.75$). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, gruplarda, resesif ve dominant modellerde anlamlı ölçüde farklı olmadığı tespit edilmiştir (resesif model: GA: $P=.95$, naif: $P=.66$ ve kontrol: $P=.92$; dominant model: GA: $P=.50$, naif: $P=.25$ ve kontrol: $P=.76$) (Çizelge 3.21) (Şekil 3.6).

Çizelge 2.21: GA, naif ve kontrol gruplarında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre karşılaştırma analizi.

<i>IFNG</i> rs2069727 T/C	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
TT (n=13) (GA n= 5, Naif n= 6, Kontrol n= 2)	5.02 ± 3.97 6.24 (0.87-8.56)	7.96 ± 5.09 9.62 (2.43-11.86)	1.14 ± 0.08 1.14 (1.08- X)	.21 ^a
TC (n=49) (GA n= 13, Naif n= 15, Kontrol n= 21)	3.84 ± 3.38 2.80 (0.94-5.97)	5.87 ± 5.95 4.29 (0.81-9.23)	2.01 ± 2.61 0.92 (0.61-2.90)	.03 ^a .04 ^b .20 ^c >.99 ^d
CC (n=13) (GA n= 7, Naif n= 4, Kontrol n= 2)	3.81 ± 2.19 3.76 (2.58-4.97)	4.69 ± 3.40 4.91 (1.35-7.81)	2.78 ± 3.79 2.78 (0.10- X)	.75 ^a
P*	.95	.66	.92	
P**	.50	.25	.76	

Rölatif ekspresyon seviyeleri ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. Bazı gruplar içerisinde 'kişi sayısı<3' olduğu için Q3 değeri yerine 'X' yazılmıştır. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a3 grubun, ^bNaif - kontrol, ^cGA - kontrol ve ^dGA - naif karşılaştırmasını göstermektedir. *Resesif modelin: CC - TC ve TT ve **Dominant modelin: CC ve TC - TT karşılaştırma analizi Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6: Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi. *Hsa (homo sapiens) ön eki insan miRNA'larını belirtmek için kullanılmaktadır. Glatiramer asetat: GA.

3.5. Plazmada IFN-gama Seviyesinin Belirlenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri

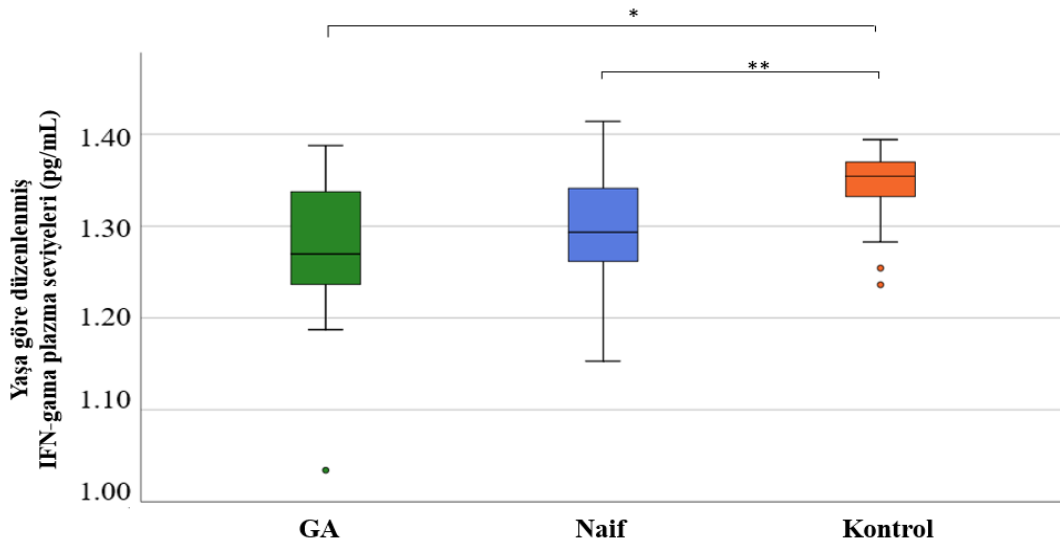
3.5.1. Plazmada IFN-gama seviyesinin belirlenmesi

Plazma IFN-gama seviyesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen ELISA çalışması bölüm 2.2.6'da verilmiştir. Çalışma grupları arasında yaş açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir (Çizelge 3.2). Yaşlanmanın bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri, kemik iliği ve timusta azalmış B ve T hücreleri üretimi ve sekonder lenfoid dokularda olgun lenfositlerin azalmış işlevini içeren birçok düzeyde kendini göstermektedir. T hücrelerinin sayısındaki düşme ve işlevindeki yavaşlama sonucunda IFN-gama seviyelerinde yaşa bağlı bir şekilde azalma gözlenmektedir (Zhang vd., 2020; Yen vd., 2000; Abb ve Deinhardt, 1984). Karşılaştırılan gruplar farklı yaş dağılımlarına sahip olduğunda ve hastalık riski veya sonuç yaş grupları arasında değişiklik gösterdiğinde yaş, karıştırıcı faktör (confounding factor) olmaktadır (Hankey vd., 2000). Bu çalışma kapsamında bu durumun önlenmesi için lineer regresyon analizi kullanılarak plazma IFN-gama seviyeleri yaşa göre düzenlenmiştir (Aickin vd., 1996; Ciolino vd., 2013). Yaş farkının elimine edildiği IFN-gama plazma seviyeleri elde edilmiş ve bu veriler ile analizlere devam edilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu istatistiksel analizi sonucunda plazma IFN-gama seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda (1.28 ± 0.08 pg/mL) ve naif grubundaki hastalarda (1.30 ± 0.06 pg/mL), kontrol grubundaki bireyler ile karşılaştırıldığında

(1.34 ± 0.04 pg/mL) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu tespit edilmiştir (üç grup arasında: $P=.001$, naif - kontrol: $P=.03$, GA - kontrol: $P=.001$) (Çizelge 3.22) (Şekil 3.7).

Çizelge 2.22: GA, naif ve kontrol gruplarındaki yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL).

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL)	1.28 ± 0.08 1.27 (1.24-1.34)	1.30 ± 0.06 1.29 (1.26-1.35)	1.34 ± 0.04 1.35 (1.32-1.37)	.001 ^a .03 ^b .001 ^c .75 ^d
Parametre değerleri ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a 3 grubun, ^b Naif - Kontrol, ^c GA - Kontrol ve ^d GA - Naif karşılaştırmasını göstermektedir.				

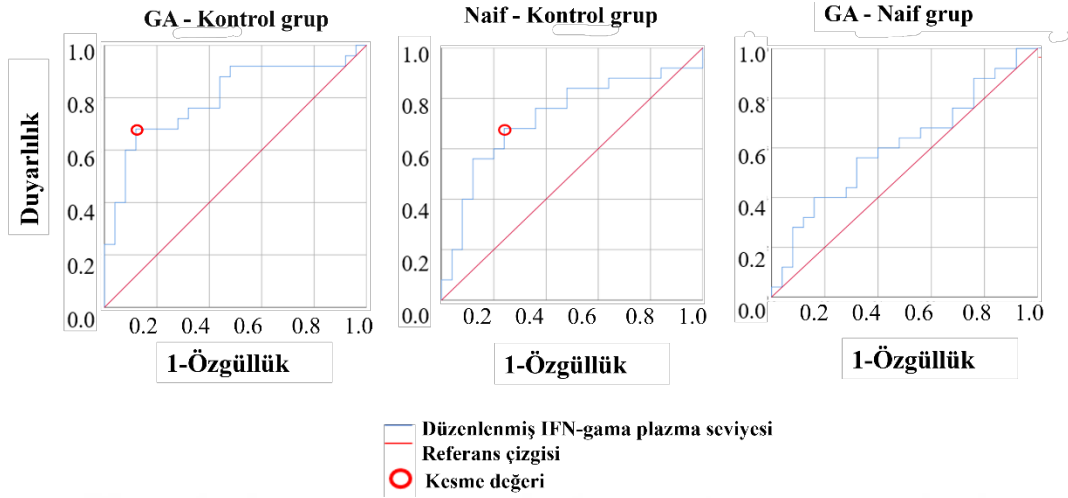


Şekil 2.7: GA, naif ve kontrol gruplarındaki yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL). GA: glatiramer asetat. *: $P < .001$, **: $P = .03$.

3.5.2. Plazmada IFN-gama seviyesi için ROC analizleri

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu yönünden gruplar arasında farklılık görülmesi üzerine, bu parametrenin tanısal performansının tespit edilmesi için ROC analizi yapılmıştır. ROC analizinde, tanı testlerinin gücünü değerlendirmede kullanılan özgüllük, duyarlılık ve AUC değerleri belirlenmiştir. AUC değerleri bölüm 2.2.7’de verilmiş olan başarı derecelendirme skalasına göre değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda kesme

değerleri hesaplanmıştır. ROC eğrileri Şekil 3.8’de verilmiş, ROC analizi ardından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23 ile özetlenmiştir.



Şekil 2.8: Düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin gruplar arasındaki ROC eğrileri.

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “iyi” olduğu görülmüştür ($AUC=0.797$, $P=.001$, %95 CI=0.67-0.93). Youden indeks değerinin maksimum olduğu 1.30 pg/mL noktası kesme değeri olarak seçilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi 1.30 pg/mL’ye eşit veya 1.30 pg/mL’den düşük olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, yüksek olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %68, özgüllüğünün ise %88 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.8) (Çizelge 3.23). Plazma IFN-gama seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde ise elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” olduğu görülmüştür ($AUC=0.726$, $P=.03$, %95 CI=0.58-0.87). Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin kesme değeri 1.33 pg/mL olarak belirlenmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi 1.33 pg/mL’ye eşit veya 1.33 pg/mL’den düşük olanlar naif RRMS hastaları, yüksek olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %68, özgüllüğünün ise %76 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.8) (Çizelge 3.23). Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin GA ile naif grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “zayıf” olduğu görülmüştür ($AUC=0.606$, $P=.75$, %95 CI=0.45-0.77) (Şekil 3.8) (Çizelge 3.23). Bu nedenle kesme değeri hesaplanmamıştır.

Çizelge 2.23: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun ROC analiz sonuçları.

Gruplar	AUC	CI (%95)	P	Kesme değeri	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL) (GA n=25 - Kontrol n= 25)	0.797 (İyi)	(0.67-0.93)	.001	1.30	%68	%88
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL) (Naif n=25 - Kontrol n= 25)	0.726 (Orta)	(0.58-0.87)	.03	1.33	%68	%76
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (pg/mL) (GA n=25 - Naif n= 25)	0.606 (Zayıf)	(0.45-0.77)	.75	---	---	---
Plazma IFN-gama konsantrasyon değerleri yaş parametresine göre SPSS programı kullanılarak düzenlenmiştir. AUC: Area Under the Curve, CI: Confidence Interval						

3.5.3. Plazmada IFN-gama seviyesi için hata matrisi analizleri

ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren modellerde hata matrisi yapılmıştır. Tanı testlerinin değerlendirmesi için ölçütlerin hesaplanma formülleri aşağıda verilmiştir:

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN$.

3.5.3.1. Plazmada IFN-gama seviyesi için GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu 1.30 pg/mL'ye eşit veya 1.30 pg/mL'den düşük olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha yüksek olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 22, gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre de GA tedavisi alan RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 17, gerçekte kontrol olup tanı testine göre GA tedavisi alan RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 3 ve gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 8 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.24). Hata matrisine göre yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama

konsantrasyonunun GA tedavisi alan RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %68, özgüllüğü %88 ve doğruluğu %78 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.24).

Çizelge 2.24: Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		GA	Kontrol	
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesine göre belirlenenler	GA	17 (DP)	3 (YP)	20
	Kontrol	8 (YN)	22 (DN)	30
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.68 = \%68$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.88 = \%88$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.78 = \%78$.

3.5.3.2. Plazmada IFN-gama seviyesi için naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu 1.33 pg/mL'ye eşit veya 1.33 pg/mL'den düşük olanlar naif RRMS hastaları, daha yüksek olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 18, gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre de naif RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 17, gerçekte kontrol olup tanı testine göre naif RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 7 ve gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 8 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.25). Hata matrisine göre yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun naif RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %68, özgüllüğü %72 ve doğruluğu %70 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.26).

Çizelge 2.25: Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		Naif	Kontrol	
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesine göre belirlenenler	Naif	17 (DP)	7 (YP)	24
	Kontrol	8 (YN)	18 (DN)	26
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.68 = \%68$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.72 = \%72$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.70 = \%70$.

Çizelge 2.26: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin hata matrisi sonuçları.

Model	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)	Doğruluk (Accuracy)
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama Plazma Konsantrasyonu (GA - Kontrol)	%68	%88	%78
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama Plazma Konsantrasyonu (Naif - Kontrol)	%68	%72	%70
IFN-gama değerleri yaş parametresine göre SPSS programı kullanılarak düzenlenmiştir. Sonuçlar hata matrisi analizi ile belirlenmiştir.			

3.6. Plazma IFN-gama Seviyesinin Gruplar Arasında EDSS ve MSSS Ölçütlerine ve rs2069727 T/C SNP'sine göre Karşılaştırma Analizleri

3.6.1. Plazma IFN-gama seviyesinin gruplar arasında EDSS ve MSSS ölçütlerine göre karşılaştırma analizi

GA kullanan RRMS ve naif RRMS hastalarında yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, EDSS ve MSSS puanları ile ilişkisi incelenmiş, engellilik skorları, $EDSS \leq 3$, $EDSS > 3$ ve $MSSS \leq 5$, $MSSS > 5$ olmak üzere gruplandırılmıştır (Çizelge 3.27). GA grubunda bulunan RRMS hastalarının, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre ($P=.67$); yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre ($P=.67$) karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına göre karşılaştırılamamıştır. Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu, yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre karşılaştırılmış, anlamlı fark bulunmamıştır ($P=.32$). Hafif düzey EDSS ($EDSS \leq 3$) puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hafif düzey ($EDSS \leq 3$) EDSS

puanlarına sahip naif RRMS hastaları yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu açısından karşılaştırılmış, anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($P = .21$). Naif hasta grubunda bulunan RRMS hastalarının EDSS puanları 3'e eşit veya 3'ten küçük olduğu için orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu açısından karşılaştırılamamıştır. Yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu açısından ($P = .17$); hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına sahip GA kullanan RRMS hastaları ile hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına sahip naif RRMS hastaları yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu açısından karşılaştırılmış ($P > .99$) ve anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.27).

Çizelge 2.27: GA ve naif gruplarında yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonunun $EDSS \leq 3$, $EDSS > 3$ ve $MSSS \leq 5$, $MSSS > 5$ ölçütlerine göre karşılaştırma analizi.

	GA	Naif	P
Hafif düzey, $EDSS \leq 3$ (GA n= 23 - Naif n= 25)	1.28 ± 0.06 1.27 (1.24-1.34)	1.30 ± 0.06 1.29 (1.26-1.35)	.21
Orta düzey, $EDSS > 3$ (GA n= 2 - Naif n= 0)	1.19 ± 0.22 1.19 (1.03-X)	-	-
P	.67	-	-
Yavaş progresyon, $MSSS \leq 5$ (GA n= 23 - Naif n= 24)	1.28 ± 0.06 1.27 (1.24- 1.34)	1.30 ± 0.06 1.30 (1.26-1.35)	.17
Hızlı progresyon, $MSSS > 5$ (GA n= 2 - Naif n=1)	1.19 ± 0.22 1.19 (1.03-X)	1.24 1.24 (1.24-1.24)	>.99
P	.67	.32	

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (pg/mL), ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. 'n' ifadesi, sınırlandırılan ölçüt içerisinde olan kişi sayısını temsil etmektedir. P değeri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. Bazı gruplarda Q3 değeri analiz sonucunda yeterli kişi olmadığı için elde edilmemiş ve yerine 'X' yazılmıştır. EDSS, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS, Multipl Skleroz Şiddet Skoru.

3.6.2. Plazma IFN-gama seviyesinin *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre incelenmesi

İstatistiksel analiz sonucunda yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi ortalamasının, yabancı homozigot genotipli (TT), GA grubu hastalarında 1.30 ± 0.06 pg/mL, naif grubu hastalarında 1.30 ± 0.05 pg/mL ve kontrol grubu bireylerinde 1.34 ± 0.06 pg/mL olduğu görülmüştür. GA, naif ve kontrol grupları arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (üç grup arasında: $P = .48$).

Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi ortalamasının, heterozigot genotipli (TC), GA grubu hastalarında 1.29 ± 0.05 pg/mL, naif grubu hastalarında 1.30 ± 0.07 pg/mL ve kontrol grubu bireylerinde 1.34 ± 0.04 pg/mL olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P = .01$). Heterozigot genotipe (TC) sahip GA kullanan RRMS hastalarının düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin, kontrollere göre anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ($P = .01$).

Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi ortalamasının, polimorfik homozigot genotipli (CC), GA grubu hastalarında 1.23 ± 0.11 pg/mL, naif grubu hastalarında 1.30 ± 0.42 pg/mL ve kontrol grubu bireylerinde 1.32 ± 0.17 pg/mL olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P = .21$) (Çizelge 3.28) (Şekil 3.9).

Çizelge 2.28: GA, naif ve kontrol gruplarında *IFNG* rs2069727 T/C genotipleri ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun karşılaştırma analizi.

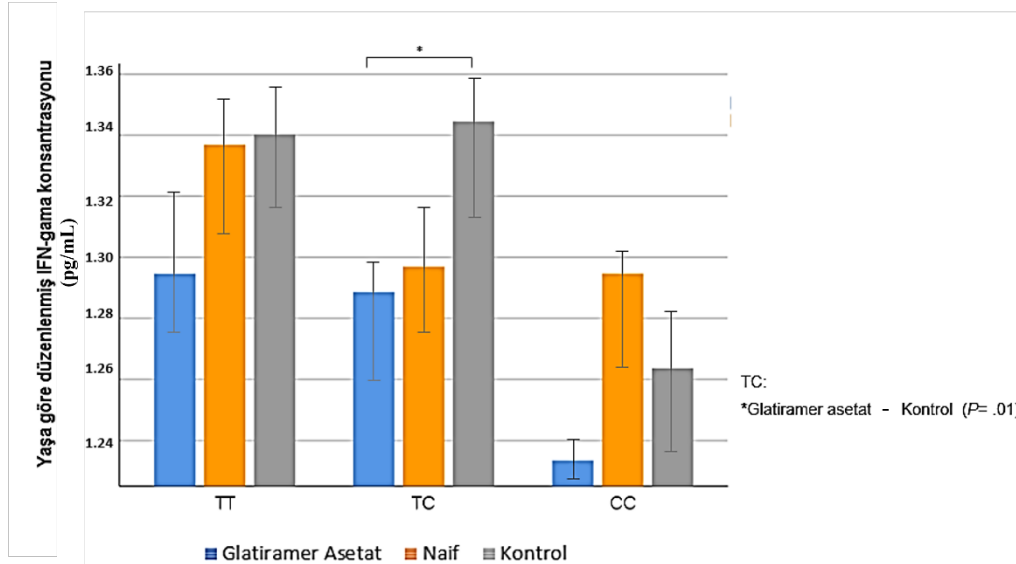
<i>IFNG</i> rs2069727 T/C	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	P
TT (n=13) (GA n= 5, Naif n= 6, Kontrol n= 2)	1.30 ± 0.06 1.34 (1.24-1.35)	1.30 ± 0.05 1.29 (1.26-1.35)	1.34 ± 0.06 1.34 (1.30-X)	.48
TC (n=49) (GA n= 13, Naif n= 15, Kontrol n= 21)	1.29 ± 0.05 1.28 (1.24-1.34)	1.30 ± 0.07 1.30 (1.25-1.35)	1.34 ± 0.04 1.36 (1.34-1.37)	.01 ^a .12 ^b .01 ^c >.99 ^d
CC (n=13) (GA n= 7, Naif n= 4, Kontrol n= 2)	1.23 ± 0.11 1.26 (1.19-1.27)	1.30 ± 0.42 1.30 (1.27-1.35)	1.32 ± 0.17 1.32 (1.31-X)	.21
P*	.17	.94	.16	
P**	.34	.90	.84	
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyeleri (pg/mL) ortalama $\pm$ standart sapma (SS), medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. Bazı gruplar içerisinde 'kişi sayısı<3' olduğu için Q3 değeri yerine 'X' yazılmıştır. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. ^a 3 grubun, ^b Naif vs. kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir. *Resesif modelin: CC - TC ve TT ve **Dominant modelin: CC ve TC - TT karşılaştırma analizi Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir.				

IFNG rs2069727 T/C genotiplerinin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonuna potansiyel etkisinin incelenmesi için, GA, naif ve kontrol grubu olmak üzere ayrı ayrı her bir çalışma grubunda, resesif ve dominant genetik modeller

oluşturularak yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu yönünden karşılaştırma yapılmıştır.

GA grubunda, polimorfik homozigot (CC) genotipe sahip olanlar ile yabanıl homozigot (TT) veya heterozigot (TC) genotipe sahip olanların yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı (resesif model: GA: $P=.17$); polimorfik homozigot (CC) veya heterozigot (TC) genotipe sahip olanlar ile yabanıl homozigot (TT) genotipe sahip olanların yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırıldığında, benzer şekilde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı (dominant model: GA: $P=.34$) görülmüştür.

Naif grubunda, polimorfik homozigot (CC) genotipe sahip olanlar ile yabanıl homozigot (TT) veya heterozigot (TC) genotipe sahip olanların (resesif model: naif: $P=.94$); polimorfik homozigot (CC) veya heterozigot (TC) genotipe sahip olanlar ile yabanıl homozigot (TT) genotipe sahip olanların yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı (dominant model: naif: $P=.90$) belirlenmiştir. Kontrol grubunda yapılan benzer kıyaslamada da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (resesif model: kontrol: $P=.16$; dominant model: kontrol: $P=.84$) (Çizelge 3.28).



Şekil 2.9: Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun *IFNG* rs2069727 T/C genotip gruplarında incelenmesi. Glatiramer asetat: GA.

3.7. Yaşa göre Düzenlenmiş Plazma IFN-gama Seviyesinin ve Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Sınır Değerlerine göre Aralarındaki İlişkinin İncelenmesi

3.7.1. Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama sınır değerine göre incelenmesi

miRNA çalışma grubunun yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun medyan değeri olan 1.311 pg/mL, sınır değer olarak belirlenmiş, bu değer üzerindeki konsantrasyon değerlerine yüksek; 1.311 pg/mL'ye eşit veya bu değerin altındaki konsantrasyon değerlerine ise düşük plazma IFN-gama konsantrasyonu ifadesi kullanılmıştır. miRNA çalışma grubu IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL' ve IFN-gama > 1.311 pg/mL olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmış, tüm gruptaki ve GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve IFN-gama > 1.311 pg/mL grupları arasında karşılaştırılması yapılmıştır (sırası ile Çizelge 3.29; Çizelge 3.30).

Tüm grupta yapılan analizde, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalaması, düşük IFN-gama (IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL) ile yüksek IFN-gama (IFN-gama > 1.311 pg/mL) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük IFN-gama (IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (3.30 ± 1.91) yüksek IFN-gama (IFN-gama > 1.311 pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinden (2.42 ± 2.24) daha fazla çıkmıştır ($P=.02$).

Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, tüm grupta, GA, naif ve kontrol grupları içinde, düşük IFN-gama (IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL) ile yüksek IFN-gama (IFN-gama > 1.311 pg/mL) karşılaştırması sonucu anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

Yüksek IFN-gama konsantrasyonuna sahip bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmış ve GA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri tespit edilmiştir (sırasıyla, üç grup arasında: $P=.009$, GA - kontrol: $P=.01$; üç grup arasında: $P=.01$, GA - kontrol: $P=.01$).

Çizelge 2.29: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve yüksek IFN-gama > 1.311 pg/mL konsantrasyonuna göre, plazma hsa-miR-24-3p rölâtif ekspresyon seviyesi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	Toplam (n=75)	P
IFN-gama ≤ 1.311 (GA n= 17, Naif n= 15, Kontrol=6)	3.90 $\pm$ 2.05 3.93 (2.47-4.75)	3.25 $\pm$ 1.51 3.07 (2.23-4.12)	1.71 $\pm$ 1.69 1.19 (0.36-3.13)	3.30 $\pm$ 1.91 3.31 (2.05-4.25)	.07
IFN-gama > 1.311 (GA n= 19, Naif n= 10, Kontrol=8)	3.97 $\pm$ 2.63 3.18 (2.11-5.29)	2.88 $\pm$ 2.38 2.32 (1.19-4.11)	1.53 $\pm$ 1.58 0.84 (0.47-19.4)	2.42 $\pm$ 2.24 1.88 (0.66-3.43)	.009 ^a .23 ^b .01 ^c .77 ^d
P*	.59	.37	.93	.02	

Plazma hsa-miR-24-3p rölâtif ekspresyon seviyeleri, ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. 'n' ifadesi, verilen parametreyi sağlayan kişi sayısını temsil etmektedir. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar sonucu elde edilen P* değerleri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir.

Çizelge 2.30: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve yüksek IFN-gama > 1.311 pg/mL konsantrasyonuna göre, plazma hsa-miR-181d-3p rölâtif ekspresyon seviyesi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	Toplam (n=75)	P
IFN-gama ≤ 1.311 (GA n= 17, Naif n= 15, Kontrol=6)	4.49 $\pm$ 2.97 3.81 (2.26-6.58)	4.53 $\pm$ 3.58 3.15 (0.81-8.09)	2.22 $\pm$ 1.99 2.06 (0.51-3.65)	4.15 $\pm$ 3.15 3.62 (1.16-6.29)	.27
IFN-gama > 1.311 (GA n= 19, Naif n= 10, Kontrol=8)	3.16 $\pm$ 3.46 1.81 (0.71-6.35)	8.66 $\pm$ 6.74 8.09 (2.58-14.62)	1.94 $\pm$ 2.72 0.92 (0.55-2.27)	4.02 $\pm$ 5.08 1.57 (0.70-6.04)	.01 ^a .23 ^b .01 ^c .77 ^d
P*	.24	.10	.56	.20	

Plazma hsa-miR-181d-3p rölâtif ekspresyon seviyeleri, ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. 'n' ifadesi, verilen parametreyi sağlayan kişi sayısını temsil etmektedir. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar sonucu elde edilen P* değerleri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir.

3.7.2. Plazma yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin sınır değerlerine göre incelenmesi

miRNA çalışma grubunda, rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesinin medyan değeri olan 2.61, sınır değeri olarak belirlenmiş, bu değerin üzerindeki konsantrasyon değerleri için yüksek; bu değere eşit veya bu değerin altındaki konsantrasyon değerleri için ise düşük plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ifadesi kullanılmıştır. miRNA çalışma grubu, rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.61 ve > 2.61 olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Tüm gruptaki ve GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin, rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.61 ve > 2.61 grupları arasında karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 3.31). Tüm grupta yapılan analizde, yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-24-3p ($\text{miR-24-3p} \leq 2.61$) ile yüksek hsa-miR-24-3p ($\text{miR-24-3p} > 2.61$) grupları arasında karşılaştırılmış, anlamlı bir fark bulunmamıştır. Düşük ve yüksek rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesine sahip bireylerin yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri ayrı ayrı olmak üzere GA, naif ve kontrol gruplarında karşılaştırılmış, üç grup arasında sınır değerde anlamlı bir fark elde edilmiş (sırasıyla, $P=.05$; $P=.05$) olup ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark elde edilmemiştir (Çizelge 3.31).

Çizelge 2.31: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük hsa-miR-24-3p ≤ 2.61 ve yüksek hsa-miR-24-3p > 2.61 sınır değerine göre, yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	Toplam (n=75)	P
Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ≤ 2.61 (GA n= 7, Naif n= 11, Kontrol=20)	1.26 $\pm$ 0.12 1.26 (1.21-1.35)	1.29 $\pm$.07 1.30 (1.24-1.35)	1.34 $\pm$.04 1.35 (1.33-1.37)	1.31 $\pm$.08 1.34 (1.26-1.36)	.05
Plazma rölatif hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi > 2.61 (GA n= 18, Naif n= 14, Kontrol=5)	1.28 $\pm$ 0.05 1.27 (1.24-1.33)	1.31 $\pm$.05 1.30 (1.26-1.34)	1.34 $\pm$.04 1.35 (1.30-1.38)	1.30 $\pm$.05 1.28 (1.26-1.34)	.05
P*	.84	.65	.92	.12	

Yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (pg/mL), ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. 'n' ifadesi, verilen parametreyi sağlayan kişi sayısını temsil etmektedir. Üçlü karşılaştırmalar sonucu elde edilen P değerleri Kruskal-Wallis; ikili karşılaştırmalar sonucu elde edilen P* değerleri ise Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir.

miRNA çalışma grubunda, rölatif hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyesinin medyan değeri olan 2.90, sınır değeri olarak belirlenmiş, bu değerin üzerindeki konsantrasyon değerleri için yüksek; bu değere eşit veya bu değerin altındaki konsantrasyon değerleri için ise düşük plazma hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ifadesi kullanılmıştır. miRNA çalışma grubu, rölatif hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.90 ve > 2.90 olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Tüm gruptaki ve GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin rölatif hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.90 ve > 2.90 grupları arasında karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 3.32). Tüm grupta yapılan analizde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-181d-3p (miR-181d-3p ≤ 2.90) ile yüksek hsa-miR-181d-3p (miR-181d-3p > 2.90) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük hsa-miR-181d-3p (≤ 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalaması ($1.32 \pm .05$ pg/mL) yüksek hsa-miR-181d-3p (> 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalamasından ($1.29 \pm .07$ pg/mL) daha fazla çıkmıştır ($P=.02$) (Çizelge 3.32). Düşük plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesine (≤ 2.90) sahip bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, GA grubundaki hastalar ($1.31 \pm .06$ pg/mL), naif grubundaki hastalar ($1.29 \pm .05$ pg/mL) ve kontrol grubundaki bireylerin ($1.35 \pm .04$ pg/mL) oluşturduğu 3 grup arasında karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark elde edilmiştir ($P=.04$). Ancak gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 2.32: Tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda düşük hsa-miR-181d-3p ≤ 2.90 ve yüksek hsa-miR-181d-3p > 2.90 sınır değerine göre, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi.

	GA (n=25)	Naif (n=25)	Kontrol (n=25)	Toplam (n=75)	P
Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ≤ 2.90 (GA n= 11, Naif n= 8, Kontrol=19)	$1.31 \pm .06$ 1.33 (1.24-1.35)	$1.29 \pm .05$ 1.27 (1.26-1.34)	$1.35 \pm .04$ 1.36 (1.34-1.37)	$1.32 \pm .05$ 1.34 (1.26-1.37)	.04 ^a .06 ^b .19 ^c >.99 ^d
Plazma rölatif hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi > 2.90 (GA n= 14, Naif n= 17, Kontrol=6)	$1.25 \pm .08$ 1.26 (1.23-1.28)	$1.31 \pm .06$ 1.31 (1.27-1.35)	$1.33 \pm .03$ 1.32 (1.30-1.36)	$1.29 \pm .07$ 1.28 (1.25-1.34)	.02 ^a .07 ^b .04 ^c >.99 ^d
P*	.12	.34	.12	.02	
Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (pg/mL), ilk satırda ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ikinci satırda medyan (Q1-Q3) şeklinde verilmiştir. 'n' ifadesi, verilen parametreyi sağlayan kişi sayısını temsil etmektedir. Üç grup arasındaki karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı sonuç elde edildiğinde post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş ve Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar sonucu elde edilen P* değerleri Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir. ^a 3 grubun, ^b Naif - kontrol, ^c GA - kontrol ve ^d GA - naif karşılaştırmasını göstermektedir.					

Yüksek plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesine (> 2.90) sahip bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, GA grubundaki hastalar ($1.25 \pm .08$ pg/mL), naif grubundaki hastalar ($1.31 \pm .06$ pg/mL) ve kontrol grubundaki bireylerin ($1.33 \pm .03$ pg/mL) oluşturduğu 3 grup arasında karşılaştırılmış ($P=.02$), GA grubunda bulunan hastalarda kontrollere kıyasla daha düşük yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri tespit edilmiştir ($P=.04$) (Çizelge 3.32).

3.8. Plazma miRNA ve Yaşa göre Düzenlenmiş IFN-gama Seviyesinin Tek Parametre Olarak İncelenmesi, ROC ve Hata Matrisi Analizleri

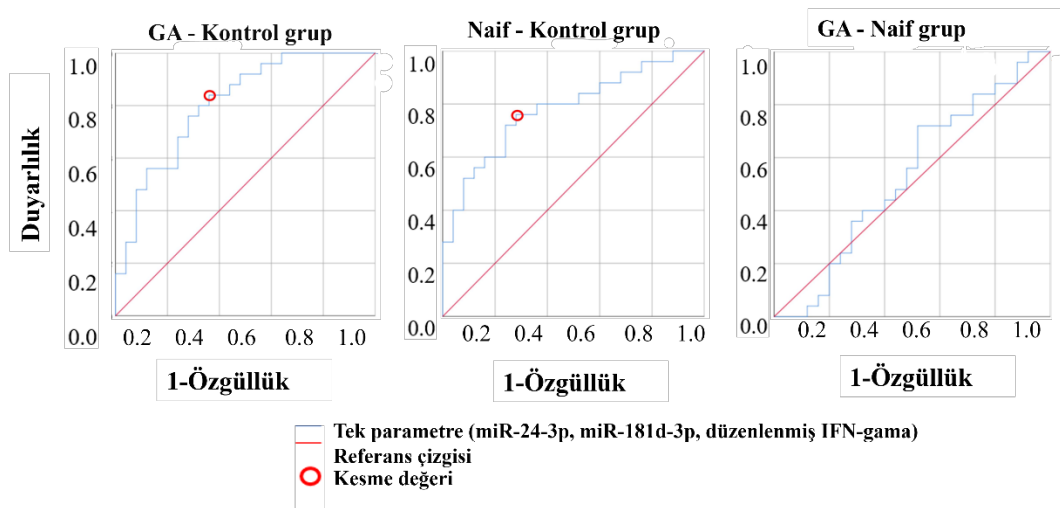
3.8.1. Tek parametre için ROC analizleri

Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyeleri ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu yönünden gruplar arasında farklılık görülmesi üzerine, bu parametrelerin bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisi olup olmadığı hesaplanmıştır. Bu parametrelerin bir arada tanısal performansının tespit edilmesi için ROC analizi yapılmıştır. ROC analizinde, tanı testlerinin gücünü değerlendirmede kullanılan özgüllük, duyarlılık ve AUC değerleri belirlenmiştir. AUC değerleri bölüm 2.2.7’de verilmiş olan başarı derecelendirme skalasına göre değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda kesme değerleri hesaplanmıştır. ROC eğrileri Şekil 3.10’da sunulmuş, ROC analizi ardından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.33’te özetlenmiştir.

Çizelge 2.33: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde ROC analizleri sonuçları.

	AUC	CI (%95)	<i>P</i>	Kesme değeri	Duyarlılık (Sensitivity)	Özgüllük (Specificity)
miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (GA - Kontrol)	0.806 (iyi)	(0.69-0.93)	$<.001$	0.342	%84	%64
miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (Naif - Kontrol)	0.779 (Orta)	(0.65-0.91)	.001	0.355	%76	%72
miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri (GA - Naif)	0.531 (Başarısız)	(0.37-0.70)	.71	---	---	---
AUC: Area Under the Curve						

Plazma miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin birlikte tek bir parametre olarak incelendiği karşılaştırmalarda, GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “iyi” olduğu görülmüştür ($AUC=0.806$, $P<.001$, %95 CI=0.69-0.93). MS hastalığı için erken teşhisin önemi yadsınamaz bir gerçektir. Gerçek pozitiflerin oranını (TP) verme yeteneğinin daha fazla olması yani maksimum duyarlılığa sahip bir ölçütün olması amacımıza uygun bir seçim olduğu için Youden indeks değerinin maksimum olduğu 3 değer içerisinde duyarlılığı en yüksek olan 0.342 noktası kesme değeri olarak seçilmiştir. 0.342 noktasına eşit veya 0.342’den yüksek değerlere sahip olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %84, özgüllüğünün ise %64 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.10) (Çizelge 3.33). Naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde ise elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” olduğu görülmüştür ($AUC=0.779$, $P=.001$, %95 CI=0.65-0.91). Youden indeks değerinin maksimum olduğu 2 değer içerisinde duyarlılığı en yüksek olan 0.355 noktası kesme değeri olarak belirlenmiştir. 0.355’e eşit ve 0.355’ten daha yüksek değerlere sahip olanlar naif RRMS hastaları, düşük değerlere sahip olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının %76, özgüllüğünün ise %72 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.10) (Çizelge 3.33). GA ile naif grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “zayıf” olduğu görülmüştür ($AUC=0.531$, $P=.71$, %95 CI=0.37-0.70) (Şekil 3.10) (Çizelge 3.33). Bu nedenle kesme değeri hesaplanmamıştır.



Şekil 2.10: Tek parametre için gruplar arasındaki ROC eğrileri.

3.8.2. Tek parametre için hata matrisi analizleri

ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren modellerde hata matrisi yapılmıştır. Hata matrisinde tahmin değerler kesme değerine göre belirlenmiştir. Tanı testlerinin değerlendirmesi için ölçütlerin hesaplanma formülleri aşağıda verilmiştir:

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN$.

3.8.2.1. Tek parametre için GA ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde kesme değeri 0.342'ye eşit veya 0.342'den yüksek olanlar GA tedavisi alan RRMS hastaları, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 16, gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre de GA tedavisi alan RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 21, gerçekte kontrol olup tanı testine göre GA tedavisi alan RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 9 ve gerçekte GA tedavisi alan RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 4 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.34). Hata matrisine göre plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin GA tedavisi alan RRMS hastaları ve sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %84, özgüllüğü %64 ve doğruluğu %74 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2.34: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde GA ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		GA	Kontrol	
Plazma miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyelerine göre belirlenenler	GA	21 (DP)	9 (YP)	30
	Kontrol	4 (YN)	16 (DN)	20
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.84 = \%84$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.64 = \%64$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.74 = \%74$.

3.8.2.2. Tek parametre için naif ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde, kesme değeri olarak belirlenen 0.355'e eşit veya 0.355'ten yüksek değerlere sahip olanlar naif RRMS hastaları, daha düşük değerlere sahip olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 18, gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre de naif RRMS hastası olan (DP-doğru pozitif) 19, gerçekte kontrol olup tanı testine göre naif RRMS hastası olan (YP-yanlış pozitif) 7 ve gerçekte naif RRMS hastası olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 6 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur (Çizelge 3.35). Hata matrisine göre plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin naif RRMS hastaları ile sağlıklı kontrolleri ayırmada duyarlılığı %76 özgüllüğü %72 ve doğruluğu %74 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2.35: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde naif ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

		Gerçek durum		Toplam
		Naif	Kontrol	
Plazma miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyelerine göre belirlenenler	Naif	19 (DP)	7 (YP)	26
	Kontrol	6 (YN)	18 (DN)	24
	Toplam	25	25	100

Duyarlılık (Sensitivity): $DP / DP + YN = 0.76 = \%76$.

Özgüllük (Specificity): $DN / DN + YP = 0.72 = \%72$.

Doğruluk (Accuracy): $DP + DN / DP + YP + YN + DN = 0.74 = \%74$.

3.9. Korelasyon Analizleri

Plazma örneği toplanan hastalar grubunda hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi için korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, RRMS hastalarının ve kontrollerin bulunduğu grupta (EK-5, Çizelge Ek.4), GA (n=25) (EK-6, Çizelge Ek.5), naif (n=25) (EK-7, Çizelge Ek.6) ve kontrol (n=25) (EK-8, Çizelge Ek.7) gruplarında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.36: Korelasyon analizi genel tablosu.

	Arasında korelasyon olan parametreler	Spearman korelasyon katsayısı (p)	P
Tüm Grup	Yaş – EDSS	.370	.008
	Yaş-Hastalık süresi	.480	<.001
	Yaş-Tedavi Süresi	.643	.001
	EDSS-MSSS	.590	<.001
	EDSS-Hastalık Süresi	.399	.004
	EDSS-Tedavi Süresi	.699	<.001
	EDSS- Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.317	.03
	MSSS-Hastalık Süresi	.640	<.001
	Hastalık Süresi-Tedavi Süresi	.862	<.001
	Hastalık Süresi- Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.396	.004
	Tedavi Süresi-Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.623	.001
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi -miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	.474	<.001
GA Grubu	Yaş – EDSS	.511	.009
	Yaş-Hastalık süresi	.642	.001
	Yaş-Tedavi Süresi	.643	.001
	EDSS-MSSS	.788	<.001
	EDSS-Hastalık Süresi	.598	.002
	EDSS-Tedavi Süresi	.699	<.001
	EDSS- Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.520	.008
	Hastalık Süresi-Tedavi Süresi	.862	<.001
	Hastalık Süresi- Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.596	.002
	Tedavi Süresi-Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu	-.623	.001
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi -miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	.225	.28
Naif	MSSS-EDSS	.395	.05
	MSSS-Hastalık süresi	.895	<.001
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi -miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	.458	.02
Kontrol Grubu	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi -miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	.607	.001

Normallik analizinde Shapiro-Wilk testi kullanılmış olup parametrelerin normal dağılım göstermediği görülmüştür. Bu nedenle korelasyon analizi için Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.36'da korelasyon katsayıları ve anlamlılık seviyesiyle birlikte verilmişlerdir. Tüm grupların birlikte ele alındığı korelasyon analizi sonucunda, yaş ile EDSS ($\rho=.370$, $P=.008$); hastalık süresi ($\rho=.480$, $P<.001$) ve tedavi süresi ($\rho=.643$, $P=.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. EDSS ile MSSS ($\rho=.590$, $P<.001$); hastalık süresi ($\rho=.399$, $P=.004$) ve tedavi süresi ($\rho=.699$, $P<.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülürken; EDSS ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ($\rho=-.317$, $P=.03$) arasında korelasyonun negatif olduğu görülmüştür.

Hastalık süresi ile MSSS ($\rho=.640$, $P<.001$) ve tedavi süresi ($\rho=.862$, $P<.001$) arasında ve plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.474$, $P<.001$) arasında pozitif korelasyon; yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ile hastalık süresi ($\rho=-.396$, $P=.004$) ve tedavi süresi ($\rho=-.623$, $P=.001$) arasında negatif korelasyon görülmüştür (EK-5, Çizelge Ek.4).

GA grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, yaş ile EDSS ($\rho=.511$, $P=.009$); hastalık süresi ($\rho=.642$, $P=.001$) ve tedavi süresi ($\rho=.643$, $P=.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. EDSS ile MSSS ($\rho=.788$, $P<.001$); hastalık süresi ($\rho=.598$, $P=.002$) ve tedavi süresi ($\rho=.699$, $P<.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülürken; EDSS ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ($\rho=-.520$, $P=.008$) arasında korelasyonun negatif olduğu görülmüştür. Hastalık süresi ile tedavi süresi ($\rho=.862$, $P<.001$) arasında pozitif korelasyon görülürken; hastalık süresi ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ($\rho=-.596$, $P=.002$) arasında negatif korelasyon görülmüştür. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ile tedavi süresi ($\rho=-.623$, $P=.001$) arasında negatif korelasyon görülmüştür. Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon görülmemiştir (EK-6, Çizelge Ek.5).

Naif RRMS hastalarını içeren grupta yapılan korelasyon analizi sonucunda, MSSS ile EDSS ($\rho=.395$, $P=.05$) ve hastalık süresi ($\rho=.895$, $P<.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. Plazma hsa-miR-24-3p ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.458$, $P=.02$) arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (EK-7, Çizelge Ek.6).

Kontrol grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, naif RRMS hastalarını içeren grup ile benzer olarak, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.607$, $P=.001$) arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (EK-8,  izelge Ek.7).

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyelerinin ve *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin, hastalıkla ve tedavi ile ilişkileri istatistiksel analizlerle incelenmiştir.

Tüm grup, GA, naif ve kontrol grupları *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerine göre alt gruplara ayrılmış ve gruplar içerisinde plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyelerinin korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Homozigot yabancı tip genotipli (TT) bireylerin korelasyon analizi sonucunda tüm gruplar birlikte ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.319$, $P=.29$); yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=-.016$, $P=.96$) arasında ve plazma hsa-miR-181d-3p ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=.368$, $P=.22$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir ( izelge 3.37).

GA grubu ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.200$, $P=.75$); yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=.200$, $P=.75$) arasında ve plazma hsa-miR-181d-3p ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=.800$, $P=.10$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir ( izelge 3.37).

Naif grubunda ise, plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.657$, $P=.16$); yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=.314$, $P=.54$) arasında korelasyon görülmemiş, plazma hsa-miR-181d-3p ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama ($\rho=.886$, $P=.02$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür ( izelge 3.37).

Kontrol grubu ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=-1.00$, $P >.99$); yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=1.00$, $P >.99$) arasında ve plazma hsa-miR-181d-3p ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=-1.00$, $P >.99$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir ( izelge 3.37).

Heterozigot genotipli (TC) bireylerin korelasyon analizi sonucunda tüm gruplar birlikte ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.585$, $P<.001$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ile plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=-.214$, $P=.14$); hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=-.201$, $P=.17$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.37).

GA grubu ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.346$, $P=.25$); yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=-.143$, $P=.64$) arasında ve plazma hsa-miR-181d-3p ile yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ($\rho=-.549$, $P=.052$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.37).

Naif grubunda ise, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.672$, $P=.006$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ile plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.118$, $P=.68$); hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.250$, $P=.37$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.37).

Kontrol grubu ele alındığında, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ($\rho=.606$, $P=.004$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ile plazma hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=.135$, $P=.56$); hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi ($\rho=-.014$, $P=.95$) arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.37).

Tüm grup, naif ve kontrol gruplarında bulunan TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında görülen pozitif korelasyonun (sırası ile $\rho=.585$, $P<.001$; $\rho=.672$, $P=.006$; $\rho=.606$, $P=.004$) aksine, GA grubunda, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında korelasyon bulunmamıştır ($\rho=.346$, $P=.25$) (Çizelge 3.37). Homozigot resesif tip genotipli (CC) bireylerin korelasyon analizi sonucunda, gruplar içerisinde plazma hsa-miR-24-3p hsa-miR-181d-3p ve yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri parametreleri arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.37).

Çizelge 2.37: *IFNG* rs2069727 T/C SNP genotiplerine göre gruplandırılmış, tüm grupta, GA, naif ve kontrol grubunda ayrı ayrı, plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyelerinin korelasyon analizleri.

		Korelasyon katsayısı	P	Korelasyon katsayısı	P	Korelasyon katsayısı	P
İlişkili olabilecek parametreler		TT genotipli bireyler (n=13)		TC genotipli bireyler (n=49)		CC genotipli bireyler (n=13)	
Tüm Grupta	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change)	.319	.29	.585**	< .001	.033	.92
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	-.016	.96	-.214	.14	-.302	.32
	Plazma hsa-miR-181d-3p (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	.368	.22	-.201	.17	-.357	.23
		TT genotipli bireyler (n=5)		TC genotipli bireyler (n=13)		CC genotipli bireyler (n=7)	
GA Grubunda	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change)	.200	.75	.346	.25	-.357	.43
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	.200	.75	-.143	.64	.286	.54
	Plazma hsa-miR-181d-3p (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	.800	.10	-.549	.052	-.750	.052
		TT genotipli bireyler (n=6)		TC genotipli bireyler (n=15)		CC genotipli bireyler (n=4)	
Naif Grubunda	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change)	.657	.16	.672**	.006	.400	.60
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	.314	.54	.118	.68	-1.000**	.
	Plazma hsa-miR-181d-3p (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	.886*	.02	.250	.37	-.400	.60
		TT genotipli bireyler (n=2)		TC genotipli bireyler (n=21)		CC genotipli bireyler (n=2)	
Kontrol Grubunda	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change)	-1.000**	.	.606**	.004	1.000**	.
	Plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	1.000**	.	.135	.56	-1.000**	.
	Plazma hsa-miR-181d-3p (fold change) ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama	-1.000**	.	-.014	.95	-1.000**	.
Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). ** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). Veriler normal dağılmadığı için Spearman korelasyon yöntemi kullanılmıştır.							

3.10. Lojistik Regresyon Analizleri

Bu tez çalışmasında, iki durumlu lojistik regresyon analizi yapılmış, tüm modellerde geriye doğru seçim metodu kullanılmıştır. Tüm analizlerde iki durumlu lojistik regresyondan önce eş lineerlik analizi yapılmış ve bağımsız değişkenlerin hepsi birlikte modellere eklenmiştir. Model A ve Model B olmak üzere 2 ana model oluşturulmuştur. Model A, 330 RRMS hastası ve 330 sağlıklı kontrol bireyi içeren genotip grubundan oluşurken; Model B genotip grubunun bir alt grubu olan, 25 GA tedavisi alan RRMS hastası, 25 naif RRMS hastası ve 25 sağlıklı kontrol bireyi içeren plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesi grubundan oluşmaktadır. Model A’da lojistik regresyon analizlerinde yaş, cinsiyet ve genotip parametrelerinin RRMS ile kontrol gruplarında olan ilişkisine bakılmış, genotipler için dominantlık ve resesiflik durumu varsayılarak alt modeller oluşturulmuştur. Model B kapsamında incelenen parametrelerin, yaşa göre düzenlenen plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, total lezyon, kontrast tutan lezyon parametreleri dâhil faktörlerin birlikte MS veya tedavi ile ilişkileri iki durumlu lojistik regresyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Yaşa göre düzenlenen plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ayrı ayrı ve tek bir parametre olarak incelenmiş ve Model B iki alt modele ayrılmıştır: Model B.1 (Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, plazma miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ayrı ayrı incelenmiş), Model B.2. (Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak incelenmiştir). Model B.1, lipit parametrelerini içeren B.1.a ve içermeyen B.1.b; Model B.2, lipit parametrelerini içeren B.2.a ve içermeyen B.2.b olmak üzere iki farklı bölümden oluşmaktadır. Bu alt modeller ikili grup incelemeleri için naif - kontrol, GA - naif, GA - kontrol olmak üzere üç alt modele ayrılmıştır (Model B.1.a.1, Model B.1.a.2, Model B.1.a.3; Model B.1.b.1, Model B.1.b.2, Model B.1.b.3; Model B.2.a.1, Model B.2.a.2 ve Model B.2.a.3; Model B.2.b.1, Model B.2.b.2 ve Model B.2.b.3). Son olarak, genotipler için dominantlık ve resesiflik durumu varsayılarak alt modeller oluşturulmuştur (Model B.1.a.1.1, Model B.1.a.1.2; Model B.1.a.2.1, Model B.1.a.2.2; Model B.1.a.3.1, Model B.1.a.3.2 vb.). Oluşturulan modeller Çizelge 3.38’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.38: Lojistik regresyon analiz modelleri.

Model A (genotip grubunda yapılan analizleri kapsamaktadır) Bağımsız değişkenler: Yaş, cinsiyet, rs2069727 T/C genotipi	Model A.1 RRMS ve kontrol grubu arasındaki analiz		Model A.1.1 Resesif Model
			Model A.1.2 Dominant Model
Model B (miRNA ekspresyon seviyesi analizlerini kapsamaktadır) Model B.1 (her parametre ayrı değerlendirilmiştir.) Bağımsız değişkenler: Plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi, rs2069727 T/C genotipi, MSSS, LD-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit ve total lezyon sayısı, kontrast tutan lezyon sayısı Model B.1 lipit panelini içeren B.1.a ve içermeyen B.1.b olmak üzere iki farklı bölümden oluşmaktadır.	Model B.1.a Lipit parametrelerini içeren model	Model B.1.a.1 GA ve kontrol grubu arasında	Model B.1.a.1.1 Resesif Model
			Model B.1.a.1.2 Dominant Model
		Model B.1.a.2 GA ve naif grubu arasında	Model B.1.a.2.1 Resesif Model
			Model B.1.a.2.2 Dominant Model
		Model B.1.a.3 Naif ve kontrol grubu arasında	Model B.1.a.3.1 Resesif Model
			Model B.1.a.3.2 Dominant Model
	Model B.1.b Lipit parametrelerini içermeyen model	Model B.1.b.1 GA ve kontrol grubu arasında	Model B.1.b.1.1 Resesif Model
			Model B.1.b.1.2 Dominant Model
		Model B.1.b.2 GA ve naif grubu arasında	Model B.1.b.2.1 Resesif Model
			Model B.1.b.2.2 Dominant Model
		Model B.1.b.3 Naif ve kontrol grubu arasında	Model B.1.b.3.1 Resesif Model
			Model B.1.b.3.2 Dominant Model
Model B.2 (plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi, tek bir parametre olarak incelenmiştir) Bağımsız değişkenler: Plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi, rs2069727 T/C genotipi, MSSS, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit ve total lezyon sayısı, kontrast tutan lezyon sayısı Model B.2 lipit panelini içeren B.2.a ve içermeyen B.2.b olmak üzere iki farklı bölümden oluşmaktadır.	Model B.2.a Lipit parametrelerini içeren model	Model B.2.a.1 GA ve kontrol grubu arasında	Model B.2.a.1.1 Resesif Model
			Model B.2.a.1.2 Dominant Model
		Model B.2.a.2 GA ve naif grubu arasında	Model B.2.a.2.1 Resesif Model
			Model B.2.a.2.2 Dominant Model
		Model B.2.a.3 Naif ve kontrol grubu arasında	Model B.2.a.3.1 Resesif Model
			Model B.2.a.3.2 Dominant Model
	Model B.2.b lipit parametrelerini içermeyen model	Model B.2.b.1 GA ve kontrol grubu arasında	Model B.2.b.1.1 Resesif Model
			Model B.2.b.1.2 Dominant Model
		Model B.2.b.2 GA ve naif grubu arasında	Model B.2.b.2.1 Resesif Model
			Model B.2.b.2.2 Dominant Model
		Model B.2.b.3 Naif ve kontrol grubu arasında	Model B.2.b.3.1 Resesif Model
			Model B.2.b.3.2 Dominant Model

Bu modellerin uygunluğu ve güvenilirliği ‘Hosmer–Lemeshow goodness of fit’ testi ile incelenmiştir ve hepsi uygun bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar arasından istatistiksel olarak anlamlı olanlar Çizelge 3.39’ te özetlenmiştir.

GA - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA’nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması durumu ile hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 2.43 kat ($OR=2.434$, $CI=1.352-4.382$, $P=.003$); parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 2.15 kat ($OR=2.148$, $CI=1.321-3.493$, $P=.002$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

GA’nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması durumu ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin, tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.17 kat ($OR=1.169$, $CI=1.037-1.318$, $P=.01$); lipit parametrelerini içermeyen resesif modelde yaklaşık 1.08 kat ($OR=1.077$, $CI=1.016-1.141$, $P=.01$), dominant modelde yaklaşık 1.07 kat ($OR=1.071$, $CI=1.015-1.129$, $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

GA - naif grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA tedavisi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 0.80 kat ($OR=0.789$, $CI=0.628-0.992$, $P=.04$) ilişkili olduğu bulunmuştur. Parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde, 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde ve 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde tedavi ile hsa-miR-181d-3p arasında bir ilişkili bulunmamıştır.

GA - naif grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, tedavi ile total lezyon sayısı, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.116$, $CI=1.028-1.213$, $P=.009$); parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.10 kat ($OR=1.117$, $CI=1.031-1.211$, $P=.007$); 3 parametrenin tek

bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.11 kat ($OR=1.110$, $CI=1.023-1.204$, $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.118$, $CI=1.031-1.213$, $P=.007$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

GA - naif grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, tedavi ile kontrast tutan lezyon sayısı, parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 0.39 kat ($OR=0.392$, $CI=0.195-0.787$, $P=.009$); parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.44 kat ($OR=0.444$, $CI=0.239-0.827$, $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.41 kat ($OR=0.410$, $CI=0.205-0.819$, $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.45 kat ($OR=0.453$, $CI=0.247-0.831$, $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Naif - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 1.5 kat ($OR=1.520$, $CI=1.091-2.116$, $P=.01$); parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.3 kat ($OR=1.348$, $CI=1.096-1.659$, $P=.005$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.13 kat ($OR=1.127$, $CI=1.021-1.245$, $P=.02$); lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.10 kat ($OR=1.072$, $CI=1.018-1.129$, $P=.008$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bazı parametreler için $OR=0.000$ sonucu alınmış olup 0 kat ilişki, ilişki bulunamamıştır ibaresi ile aynı anlamı taşımaktadır (Rawat, 2012) ve tablolarda bu parametrelere yer verilmemiştir.

Çizelge 2.39: Lojistik regresyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar.

GA - Kontrol Karşılaştırması	İlişkili bulunan parametreler	P	OR	%95 CI	Hosmer– Lemeshow goodness of fit testi		
					χ^2	df	P
Model B.1.a.1, Model B.1.a.1.1 Model B.1.a.1.2	GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması ile plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.003	2.434	1.352-4.382	7.570	8	.48
Model B.1.b.1, Model B.1.b.1.1 ve Model B.1.b.1.2	GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması ile plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.002	2.148	1.321-3.493	3.787	8	.88
Model B.2.a.1 ve Model B.2.a.1.1 ve Model B.2.a.1.2	GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması ile tek bir parametre olarak değerlendirilen plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.01	1.169	1.037-1.318	6.146	8	.63
Model B.2.b.1 ve Model B.2.b.1.2	GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması ile tek bir parametre olarak değerlendirilen plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.01	1.077	1.016-1.141	10.696	8	.22
Model B.2.b.1.1	GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması ile tek bir parametre olarak değerlendirilen plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.01	1.071	1.015-1.129	6.165	8	.63
GA - Naif Karşılaştırması	İlişkili bulunan parametreler	P	OR	%95 CI	Hosmer– Lemeshow goodness of fit testi		
					χ^2	df	P
Model B.1.a.2, Model B.1.a.2.1, Model B.1.a.2.2	GA tedavisi ile plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.04	0.789	0.628-0.992	1.28	8	>.99
	GA tedavisi ile total lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.009	1.116	1.028-1.213			
	GA tedavisi ile kontrast tutan lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.009	0.392	0.195-0.787			
Model B.1.b.2, Model B.1.b.2.1, Model B.1.b.2.2	GA tedavisi ile total lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.007	1.117	1.031-1.211	4.92	8	.77
	GA tedavisi ile kontrast tutan lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.01	0.444	0.239-0.827			
Modeller genotip grubu için A (RRMS grubu n=330, kontrol=330) ve miRNA ekspresyon seviyesi grubu için B (Glatiramer asetat n= 25, naif n=25 ve kontrol n=25) olmak üzere iki alt gruba ayrılmış ve analizler binary lojistik regresyon yöntemi ile Backward LR seçilerek yapılmıştır. Model A'da yapılan lojistik regresyon analizleri sonucu anlamlı bir ilişki bulunmadığı için tabloda Model A sonuçlarına yer verilmemiştir. OR: Odds ratio, CI: Confidence interval.							

Çizelge 3.39 (devam): Lojistik regresyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar.

GA - Naif Karşılaştırması	İlişkili bulunan parametreler	P	OR	%95 CI	Hosmer– Lemeshow goodness of fit testi		
					χ^2	df	P
Model B.2.a.2, Model B.2.a.2.1, Model B.2.a.2.2	GA tedavisi ile total lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.01	1.110	1.023-1.204	10.26	8	.25
	GA tedavisi ile kontrast tutan lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.01	0.410	0.205-0.819			
Model B.2.b.2, Model B.2.b.2.1, Model B.2.b.2.2	GA tedavisi ile total lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.007	1.118	1.031-1.213	3.70	8	.88
	GA tedavisi ile kontrast tutan lezyon sayısı ilişkili bulunmuştur.	.01	0.453	0.247-0.831			
Naif - Kontrol Karşılaştırması	İlişkili bulunan parametreler	P	OR	%95 CI	Hosmer– Lemeshow goodness of fit testi		
					χ^2	df	P
Model B.1.a.3, Model B.1.a.3.1, Model B.1.a.3.2	RRMS ile plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.01	1.520	1.091-2.116	4.612	8	.80
Model B.1.b.3, Model B.1.b.3.1, Model B.1.b.3.2	RRMS ile plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur.	.005	1.348	1.096-1.659	5.861	8	.66
Model B.2.a.3, Model B.2.a.3.1 ve Model B.2.a.3.2	RRMS ile tek bir parametre olarak değerlendirilen plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi, ilişkili bulunmuştur.	.02	1.127	1.021-1.245	7.727	8	.46
Model B.2.b.3, Model B.2.b.3.1, Model B.2.b.3.2	RRMS ile tek bir parametre olarak değerlendirilen plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve IFN-gama seviyesi, ilişkili bulunmuştur.	.008	1.072	1.018-1.129	6.446	8	.60
Modeller genotip grubu için A (RRMS grubu n=330, kontrol=330) ve miRNA ekspresyon seviyesi grubu için B (Glatiramer asetat n= 25, naif n=25 ve kontrol n=25) olmak üzere iki alt gruba ayrılmış ve analizler binary lojistik regresyon yöntemi ile backward LR seçilerek yapılmıştır. Model A’da yapılan lojistik regresyon analizleri sonucu anlamlı bir ilişki bulunmadığı için tabloda Model A sonuçlarına yer verilmemiştir. OR: Odds ratio, CI: Confidence interval.							



4. TARTIŞMA

MS, genellikle genç yetişkinlerde görülen, otoimmün nörodejeneratif ve kronik bir MSS hastalığı olup, bireyin yaşam süresini ve kalitesini önemli derecede etkileyerek fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır. Özellikle genç yetişkinlerde travma harici engelliliğin en yaygın sebebi olan MS, hastalarda engellilik durumlarının ve kalıcı sakatlıkların oluşmasına neden olabilmekte ve bu durum, üretim/verimlilik kayıpları ve istihdam sorunları oluşturabilmektedir (Kavaliunas vd., 2021). Ne yazık ki MS'i tamamen ortadan kaldıracak kesin bir tedavi günümüzde mevcut değildir. Uygulanan tedavi yöntemleri, kortikosteroidler, immün baskılayıcı ve immün modülatör ilaçları içermektedir (Dobson ve Giovannoni, 2018). Hastalık seyri ve ilaçlara verilen yanıt hastadan hastaya değişmektedir. Hastalığın erken evrelerinde rol alan, ilerleyişini etkileyen, hastalığa yatkınlığa neden olan ve ilaçlara verilen farklı tepkilerin altında yatan etmenler tam olarak açıklanmamıştır. Bu faktörlerin açıklanması, biyobelirteç olma potansiyelinin araştırılması ve uygunsa kullanılması, hasta ve hastalık yönetiminin daha iyi yürütülmesine olanak sağlayacaktır. Böylece moleküler biyobelirteçlerin tespiti ile riskli olan kişiler belirlenebilir; hastalık seyri izlenebilir ve kişiye özel ilaç tedavisi planlamaları yapılabilir kılınacaktır (Loma ve Heyman, 2011; Paul vd., 2019; Michaličková vd., 2022). TÜBİTAK 1002 projesi (12S345) kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, MS'teki ikili rolü bilinen IFN-gama'nın plazma seviyeleri ile bu seviyeyi etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, MS riskine ve engellilik skorlarına etkileri yönünden incelenmiştir. Bu parametrelerin birbirleri ile ilişkileri de incelenmiş, bunların bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisi olup olmadığı hesaplanmış ve biyobelirteç olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Ek olarak, miRNA ve IFN-gama seviyeleri GA tedavisi alanlar ile tedavi almayanlar arasında karşılaştırılmış, *IFNG* genotipi, plazma IFN-gama seviyesi ve/veya miRNA ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Bu parametrelerin birbiri ile olan ilişkileri incelenmiştir.

IFN-gama'nın, CD4+ ve CD8+ T ile NK hücreleri tarafından salgılanan ve MS patofizyolojisindeki enflamatuvar yolda önemli rollere sahip olan bir proenflamatuvar sitokin olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Link vd., 1994; Young ve Hodge, 2003; Simpson vd., 2015). Öte yandan, Arellano ve arkadaşlarının (Arellano vd., 2015) yaptığı EAE hayvan deneyi çalışmasında, IFN-gama'nın sistemik olarak veya doğrudan MSS'ye enjekte edildiği ve bunun sonucunda klinik semptomlarda iyileşme görüldüğü gösterilmiştir. Ek olarak, IFN-gama'nın, Th17 efektör hücrelerini inhibe ettiği (Arellano vd., 2015); NO üretimini indükleyerek CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu doğrudan inhibe ettiği görülmüştür (Tsareva vd., 2011; Villalba vd., 2020). Bununla birlikte, IFN-gama veya reseptörünün yokluğu, beyinle ilişkili hasarı düşündüren ataksi, distoni ve spastisite gibi atipik EAE semptomlarının gelişmesine yol açmıştır. EAE gelişimi sırasında MSS'de IFN-gama'nın enflamatuvar bir etkisini bildiren verilerin yanı sıra, bu hastalıkta nöroprotektif bir aktivite gösterdiği de gözlemlenmiştir (Lees ve Cross, 2007; Melnikov vd., 2020; Wagner vd., 2020). Genetik varyantlar ve miRNA'lar IFN-gama'nın ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyebilir. Kantarci ve arkadaşlarının ABD'li, Kuzey İrlandalı ve Belçikalı hastalarla yaptığı bir çalışmada (2008), *IFNG* geninde 3' UTR yakınında bulunan rs2069727 T/C SNP'si IFN-gama ekspresyon seviyesi ve MS riski ile ilişkili bulunmuştur. Bu tez çalışmasında toplumumuzda ilk kez olmak üzere, *IFNG* genindeki rs2069727 T/C SNP'si MS riski açısından incelenmiştir. Fayyad-Kazan ve ekibinin (2014) yaptığı çalışmada, *IFNG* geninin 3'UTR'sinde hedef bölgeye sahip miRNA'lar arasında bulunan miR-24-3p ve miR-181-3p (URL-25) hakkında biyoinformatik hesaplamalar yapılmış ve fonksiyonel laboratuvar çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu iki miRNA'nın ifadesini azaltmanın IFN-gama ifadesini arttırdığı gözlenmiştir ($P<.01$) (Fayyad-Kazan vd., 2014).

Çalışmamızda *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si, plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri; MS'e yatkınlık, hastalığın seyri ve GA tedavisi alan RRMS-naif RRMS hastaları arasındaki fark açısından incelenmiştir. Bu parametrelerin birbiri ile olan ilişkileri, literatür bilgileriyle aşağıdaki alt başlıklarda sunulmuştur.

4.1 Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Profili

Bu tez çalışması kapsamında genetik polimorfizm çalışma grubu ile miRNA ve ELISA çalışma grubu olmak üzere birbiri ile çakışan 2 çalışma grubu bulunmaktadır. Genetik polimorfizm bölümünde 330 RRMS hastası ve 330 kontrol birey; miRNA ve ELISA çalışması bölümünde ise naif 25 RRMS hastası, GA tedavisi alan 25 RRMS hastası ve 25 kontrol birey bulunmaktadır. Bu grupların demografik ve klinik bilgileri bölüm 4.1.1 ve bölüm 4.1.2’de ele alınmıştır.

4.1.1 Genetik polimorfizm çalışma grubunun demografik ve klinik profili

Genetik polimorfizm çalışma grubu 330 RRMS hastası ve 330 kontrol bireyden oluşmaktadır. Bu katılımcıların tam kanlarından izole edilen DNA’lar ile *IFNG* rs2069727 T/C genetik polimorfizm çalışması gerçekleştirilmiştir.

RRMS, MS’in en sık rastlanan alt tipi olup, genç yaşlarda (20-40) kendini göstermektedir (Capasso vd., 2023). Bu çalışma grubundaki RRMS hastalarının ortalama yaşlarının 34.1 ± 9.3 olduğu görülmektedir. 330 RRMS hastası ve 330 kontrol bireyin arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu sayede, yaş faktörünün sonuçlar üzerindeki etkisi en aza indirilmiş ve gruplar arasındaki farklar daha doğru bir şekilde değerlendirilebilmiştir. MS hastalığı, kadınlarda erkeklere kıyasla daha sık görülmektedir (URL-4). Bu tez çalışmasında, genetik polimorfizm çalışma grubunda RRMS hastası olan kadınların sayısı, RRMS hastası olan erkeklerin sayısının 1.9 katıdır. Ayrıca genetik polimorfizm grubundaki kadın RRMS hastalarının yüzdesi %66.4’tür. Çalışmamızda, RRMS hastalığında görülen bu kadın ağırlıklı eğilim, Batı Pasifik ve Güneydoğu Asya bölgelerinde daha da belirgindir ve burada erkeklerin üç katından fazla kadın hasta bulunmaktadır. 2020-22 yıllarında yapılan çalışmalar sonucunda, Türkiye’de yaklaşık 58.401 MS hastası olduğu ve bu kişilerin de %33’ünün erkek %67’sinin kadın olduğu raporlanmıştır (URL-4). Çalışmamızda, RRMS hastaları ve kontrol bireyler cinsiyet dağılımı bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sayede, cinsiyet faktörünün sonuçlar üzerindeki etkisi en aza indirilmiş ve gruplar arasındaki farklar daha doğru bir şekilde değerlendirilebilmiştir. Çalışma grubunda bulunan 330 RRMS hastasının cinsiyete göre analiz edilen klinik ve demografik bilgileri Çizelge 3.2’de verilmiştir. RRMS’li erkek ve kadın hastalar

arasında yaş, teşhis yaşı, hastalık ve tedavi süresi, total kolesterol ve 25-hidroksivitamin D düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur. RRMS'li erkek hastaların EDSS puanları RRMS'li kadın hastaların EDSS puanlarına kıyasla daha yüksektir ($P=.01$). RRMS hastalık döneminde cinsiyetler arasındaki bu farklılık, erkeklerin kadınlara kıyasla daha ağır semptomlar ve fonksiyonel kayıplar yaşadıklarını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda, RRMS hastalarında cinsiyet, hastalık aktivitesini etkileyen bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Bu duruma, literatürdeki diğer çalışmalarda da rastlanmaktadır (Ribbons vd., 2015; Koch vd., 2022). EDSS puanlarına göre, 3 ve altı değerler hafif engellilik, 3-5 arası orta engellilik ve 5 ve üzeri ise ağır engellilik olarak tanımlanmaktadır (Güven vd., 2018). Hafif (≤ 3) ve orta ila yüksek (>3) düzey EDSS puanlarına sahip RRMS hastalarının sıklığı cinsiyet açısından incelendiğinde kadın ve erkek hastalar arasında anlamlı bir fark görülmüştür; erkek hastaların içinde orta ila yüksek düzey EDSS puanına sahip olma oranı (%10.6) kadınlarda olduğundan (%4.2) daha yüksektir ($P=.02$). Bu bulgu, erkek RRMS hastalarının EDSS puanlarının daha yüksek olması ile de tutarlılık göstermektedir. EDSS puanları ve hastalık süresi kullanılarak hesaplanan MSSS değerleri, RRMS hastalarında hastalığın progresyon hızını belirlemek için kullanılmaktadır (Roxburgh vd., 2013). Cinsiyet faktörü göz önünde bulundurulduğunda erkek MS hastalarında kadınlara kıyasla hastalığın seyrinin daha ağır olduğu bilinmektedir (Ribbons vd., 2015). Genetik polimorfizm çalışma grubunda, RRMS'li erkek hastaların MSSS değerleri RRMS'li kadın hastaların değerlerine kıyasla daha yüksektir ($P=.02$). RRMS hastalarında cinsiyet, hastalığın progresyonunu etkileyen bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Benzer şekilde, RRMS hastaları hızlı ($MSSS>5$) ve yavaş ($MSSS\leq 5$) progresyon hızı olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır. Kadın ve erkek RRMS hasta sayıları hastalığın yavaş veya hızlı progresyonu açısından ayrı ayrı incelendiğinde sınırda anlamlı bir cinsiyet farkı gözlenmiş ($P=.05$) olup erkek hastaların içinde yüksek progresyon ($MSSS>5$) hızına sahip olma oranının (%17.7) kadınlarda olduğundan (%10.2) daha yüksek ($P=.05$) olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, erkek RRMS hastalarının MSSS değerlerinin kadınlara kıyasla daha yüksek olması ile de tutarlılık göstermektedir. Erkek ve kadın hastalar için kullanılan DMT'ler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. RRMS'li erkek hastalarda en sık kullanılan tedavi interferon-beta (%24.5) ve teriflunomid'dir (%24.5), kadın

hastalarda ise en sık kullanılan tedavi teriflunomid'dir (%24.5). Erkek RRMS hastalarında trigliserit ($P < .001$), LDL-kolesterol ($P = .04$) ve VLDL-kolesterol ($P < .001$) düzeyleri kadın RRMS hastalarında olduğundan daha yüksektir. Ancak, HDL-kolesterol ($P < .001$) erkek hastalarda kadınlara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktür. MS'te KBB yapısının, enflamatuvar sitokin ve kemokinler aracılığıyla bozulduğu bilinmektedir. Bu yapısal bozulma, normalde MSS'ye giriş yapamayan LDL-kolesterolün, KBB'yi aşmasına ve oksidasyona uğramasına yol açmaktadır. Bu durum nöroenflamasyonu arttırarak nöronal hasara neden olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, literatürde yüksek LDL-kolesterol, yüksek EDSS puanları ile ilişkilendirilmektedir (Lorincz vd., 2022). Çalışma grubumuzda, kadın hastalara kıyasla erkek RRMS hastalarında daha yüksek LDL-kolesterol seviyelerinin ($P = .04$) ve buna paralel olarak daha yüksek EDSS puanlarının ($P = .01$) görülmesi bu durumu destekler niteliktedir. Benzer şekilde, VLDL-kolesterol (Lorincz vd., 2022) ve trigliserit (Guttman vd., 2011) düzeyleri yüksek EDSS puanları ile ilişkilendirilmektedir. Çalışma grubumuzda, kadın RRMS hastalarına kıyasla erkek RRMS hastalarında görülen daha yüksek EDSS puanları ($P = .01$), trigliserit ($P < .001$) ve VLDL-kolesterol ($P < .001$) seviyeleri bu durumu açıklar niteliktedir. HDL-kolesterol, antioksidan enzimlerin periferik dolaşıma salınımını artırarak ve adezyon moleküllerinin salınımını azaltarak antienflamatuvar bir etki gösterir. Yapılan çalışmalarda, yüksek HDL-kolesterol seviyelerinin daha düşük EDSS puanları ve hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011).

Çalışma grubumuzda, erkek RRMS hastalarına kıyasla düşük EDSS puanlarına sahip ($P = .01$) kadın RRMS hastalarında görülen daha yüksek HDL-kolesterol ($P < .001$) seviyeleri bu durumu destekler niteliktedir. Ayrıca, genetik polimorfizm çalışma grubu cinsiyete göre sınıflandırıldığında sigara kullanımı erkek RRMS hastalarında (%58.8) kadın RRMS hastalarına göre (%16.3) anlamlı derecede daha fazladır ($P < .001$). Erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına kıyasla daha yüksek EDSS puanlarına ($P = .01$) sahip olmaları sigara kullanımı risk faktörüyle de açıklanabilir.

4.1.2 miRNA ve ELISA çalışma grubunun demografik ve klinik profili

Genetik polimorfizm grubu içerisinde 25 naif RRMS hastası, 25 GA tedavisi alan RRMS hastası ve 25 sağlıklı kontrol birey, bölüm 2.1.1'deki kriterler göz önünde bulundurularak miRNA ve ELISA çalışma grubuna dâhil edilmiştir. miRNA ve ELISA çalışma grubunun tam kanlarından elde edilen plazmalarındaki IFN-gama proteini konsantrasyonu ve miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. GA (n=25), naif (n=25) ve kontrol (n=25) alt gruplarını barındıran miRNA ve ELISA çalışma grubunun klinik ve demografik bilgileri Çizelge 3.3'te gösterilmektedir. GA tedavisi alan RRMS hastalarının yaş ortalamasının sağlıklı kontrol bireylerin yaş ortalamasına göre yüksek olduğu ($P=.01$), ancak GA ile naif grubu arasında ve naif ile kontrol grubu arasında yaş yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. GA, naif ve kontrol grubu arasında, cinsiyet, teşhis yaşı ve EDSS açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. GA grubunda bulunan RRMS hastalarının hastalık süreleri ($P<.001$) ve MSSS puanlarının ortalaması ($P=.001$), naif grubunda bulunan RRMS hastalarında olduğundan daha yüksek çıkmıştır. Tedavi alan RRMS hastalarının hastalık süresi naif RRMS hastalarınınkinden elbette ki daha yüksektir, bu durumla paralel olarak MSSS puanlarının da yüksek olması hastalığın doğal seyri ile ilişkilidir. Ayrıca GA, naif ve kontrol grupları hafif (≤ 3) ve orta ila yüksek (>3) düzey EDSS puanlarına; hızlı (>5) ve yavaş (≤ 5) progresyon MSSS puanlarına göre karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda hasta grupları arasında MRG parametreleri karşılaştırıldığında, T1 lezyon sayılarının ($P=.004$) ve T2 lezyon sayılarının ($P=.004$) GA tedavisi alan RRMS hastalarında naif hastalara kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. Tedavi alan RRMS hastalarında, tedaviye başladıktan sonraki iki yıl içinde T2 lezyon yükünde azalmalar mevcut olsa da hastalığın ilerleyen dönemlerinde T1 ve T2 lezyon yükünde artış görülebilmektedir (Paolillo vd., 2002). Farklı boylamsal çalışmalarda gözlemlenen bu durum, hastalığın doğası gereği ortaya çıkan ve tedavi etkinliğinden bağımsız bir sonuç olarak görülmektedir (Paolillo vd., 2002; Giorgio vd., 2014). Paolillo ve arkadaşlarının 6 yıllık bir MRG takip çalışmasında (2002), tedavi alan RRMS hastalarında, başlangıç taramasından son taramaya kadar T1 lezyon yükünde %23.9'luk ve T2 lezyon yükünde %7'lik ortalama bir artış görülmüştür. Tedavisi devam eden RRMS hastalarının 10 yıl boyunca izlendiği başka bir çalışmada, T1

lezyon yükünde %11.5'lik ve T2 lezyon yükünde %6.7'lik ortalama bir artış görülmüştür (Giorgio vd., 2013).

Kontrast tutan lezyonlar, MSS'de aktif enflamatuvar demiyelinizasyonun göstergesi oldukları için RRMS hastalarında yaygın olarak görülmektedir (Tim vd., 2019). GA grubunda bulunan RRMS hastalarının kontrast tutan lezyon sayısı naif grubunda bulunan RRMS hastalarında olduğundan daha düşüktür ($P=.002$). Naif ile GA grubunda bulunan RRMS hastalarının kontrast tutan lezyon varlığı frekansı karşılaştırıldığında, naif RRMS hastalarında kontrast tutan lezyon görülme oranının (%68.0) GA tedavisi alan RRMS hastalarinkine kıyasla (%24.0) anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür ($P=.002$). Bu durumun henüz tedavi almamış olan naif RRMS hastalarında, hastalığın daha aktif olmasından kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir (Graziano vd. 2015; Ashida vd., 2020).

4.2. *IFNG* rs2069727 T/C Varyasyonunun MS ile İlişkisi

MS genetiği üzerine yapılan çalışmalar bu hastalığın poligenik bir kalıtım modeli olduğunu göstermektedir. Özellikle Avrupa kökenli hastalarda *HLA* lokusu ile ilişki bulunmuş olsa da birçok hasta (%20-40) bu alelleri taşımamaktadır (Greer, 2015). Ayrıca, MS risk varyantları olarak tanımlanan *HLA* genlerinin yakınında, bağışıklık T hücresi büyümesiyle ilgili eomesodermin (*EOMES*) geninde bulunan rs11129295 T/C SNP'si, T hücresi aktivasyonunda rolü olan *CD86* geninde bulunan rs9282641 G/A SNP'si ve hücre aktivasyonu için önemli olan 16A içeren C tipi lektin bölgesi (C-type lectin domain containing 16A, *CLEC16A*) geninde bulunan rs725613 A/C, rs2041670 C/T, rs2080272 G/A ve rs998592 G/A SNP'leri MS riskiyle ilişkili bulunmuştur (Nischwitz vd., 2011; Beecham vd., 2013; Patsopoulos vd., 2019; Timasheva vd., 2022). MS patogenezinde önemli rolleri olan IFN-gamma proteininin ekspresyon seviyesini etkileyen SNP'ler ve mikrosatellitler bulunmaktadır. *IFNG* genindeki varyasyonlar, viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlara ve çeşitli otoimmün hastalıklara karşı artmış duyarlılıkla ilişkilidir (Xu vd., 2001; Izad vd., 2004; Kantarci vd., 2008; Shokrgozar vd., 2009). *IFNG* geninde ilk intronda bulunan +874A/T (rs2430561) SNP'sinin, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) bağlanma bölgesi olduğu ve IFN-gama protein seviyesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İran'da yapılan bir çalışmada +874A/T polimorfizmi ile MS arasında ilişki gözlenmemiştir (Izad vd.,

2004). Yine İran’da yapılan, 211 RRMS hastası ve 359 sağlıklı bireyin bulunduğu benzer bir çalışmada, hastalar ile kontrol bireyler arasında yapılan karşılaştırmada, AA genotipi için bir fark olmadığı; AT genotipinin hastalarda daha yüksek olduğu (%54.5 - %37.8, $P=0.0002$); TT genotipinin ise kontrollerde daha yüksek olduğu (%17.7 - %27.5, $P=0.01$); gözlenmiştir (Shokrgozar vd., 2009). İtalya’nın Sardunya adasında yapılan bir çalışmada, *IFNG* geninin 1. intronundaki CA tekrar bölgesinin MS ile ilişkili olduğu görülmüştür. 396 MS hastası ve 288 kontrol bireyin bulunduğu bu çalışmada 123 baz çifti uzunluğundaki CA tekrar bölgesinin, hastalarda kontrol bireylere kıyasla daha az olduğu gösterilmiştir (kontrollerde alel frekansı: 0.100; hastalarda alel frekansı 0.058; $P=0.04$). Bu çalışmada, *IFNG* genindeki CA tekrar bölgesi (1. intron) ile ilişkili bulunan MS hastalarında riskli sayılan *HLA* alelleri bulunmamaktadır (Vandenbroeck vd., 1998). Öte yandan, Finlandiya’da yapılan bir çalışmada *IFNG* geninin CA tekrar bölgesinin (1. intron) MS ile ilişkisi bulunmamıştır (Wansen vd., 1997). Benzer bir başka çalışmada, bu varyasyonun MS yatkınlığı veya ciddiyeti ile ilişkisi gözlenmemiş, ayrıca IFN-gama mRNA ekspresyonu ile de ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Xu vd., 2001). *IFNG* geninde 3’ UTR yakınındaki rs2069727 T/C SNP’si daha önce ABD’li, Kuzey İrlandalı ve Belçikalıların içeren grupta MS kapsamında çalışılmış ve IFN-gama ekspresyon seviyesi ve MS riski ile ilişkili bulunmuştur (Kantarci vd., 2008). Bu SNP için C alelini taşıyan erkeklerde, bu aleli taşımayanlara kıyasla, daha yüksek IFN-gama ekspresyon seviyesi olduğu tespit edilmiştir ($P=0.002$). Alel frekanslarının toplumlar arasında değiştiği ve MS’in poligenik kalıtım gösterdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, toplumumuzda ilk kez olmak üzere, *IFNG* genindeki rs2069727 T/C SNP’si MS riski açısından incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında, hasta ve kontrol gruplarındaki *IFNG* rs2069727 T/C SNP’sinin genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, gruplar arasında genotip dağılımları açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca, SNPStats programında yaş ve cinsiyete göre düzeltilmiş analiz sonuçlarına göre de herhangi bir genotip modelinde gruplar arasında genotip dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Gruplar arasında polimorfik C alel frekansının RRMS grubunda 0.456, kontrol grubunda ise 0.500 olduğu tespit edilmiş ve bu frekanslar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

NCBI SNP veri tabanındaki bilgilere göre, *IFNG* rs2069727 T/C SNP'sinin minör alel frekansının, farklı popülasyonlarda 0.129 ile 0.467 arasında değiştiği görülmektedir (NCBI-dbSNP) (Çizelge 4.1). Bizim çalışmamızda ise, minör alel frekansı, kontrol grubunda 0.500 olarak hesaplanmıştır ve bu aralığın dışına çıkmıştır.

Çizelge 3.1: NCBI SNP veri tabanında rapor edilen *IFNG* rs2069727 T/C SNP' sinin polimorfik alel frekansları (URL-26, NCBI-dbSNP).

Popülasyon	C alel frekansı
Avrupalı	0.443
Afrikalı	0.467
Afro-Amerikalı	0.204
Diğer Afrikalı	0.130
Asyalı	0.177
Doğu Asyalı	0.129
Güney Asyalı	0.393
Diğer Asyalı	0.331
Latin Amerikalı	0.352

Çeşitli hastalıklar kapsamında ve farklı popülasyonlarda yapılmış çalışmalarda rapor edilmiş hasta ve kontrol gruplarındaki *IFNG* rs2069727 T/C polimorfik alel frekansları ve *P* değerleri Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. *IFNG* rs2069727 T/C polimorfizminin şistozom enfeksiyonu (Hanton vd., 2022) ($P=.019$), ankilozan spondilit (Liu vd., 2020) ($P=.006$) gibi bağışıklık sistemi bozuklukları ile ilişkili bazı hastalıkların ve hepatoselüler karsinomun (Li vd., 2016) ($P=.014$) patolojik sürecinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Öte yandan, yapılan bir meta-analiz sonucunda *IFNG* rs2069727 T/C ile T hücreli lenfoma, Hodgkin lenfoma, B hücreli lenfoma, tüberküloz ve astım arasında bir ilişki bulunmamıştır (Kumar ve Ghosh, 2008; Butterbach vd., 2011; Petrovic, 2016; He vd., 2017).

Çizelge 4.2'de, *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si ile ilgili farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalara göre hasta ve kontrol gruplarındaki C alel frekansları sunulmuştur. Farklı popülasyonlardaki çalışmalar, kontrol gruplarında C alel frekanslarının çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Avrupa ve Kuzey Batı İngiltere popülasyonlarında, C alel frekanslarının bizim sonuçlarımıza benzer olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın,

Afrika, Çin ve Hindistan popülasyonlarında C alel frekanslarının bizim sonuçlarımıza göre daha düşük olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.2: *IFNG* rs2069727 T/C SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları.

Popülasyon	Hastalık	C alel frekansı		P	Kaynak
		Hasta	Kontrol		
ABD-Kuzey İrlanda-Belçika	MS (Sadece erkekler)	0.442	-	.002	Kantarci vd., 2008
Afrika	Şistozom enfeksiyonu	0.172	0.130	.02	Hanton vd., 2022
Avrupa	B hücreli lenfoma	0.496	0.456	.06	Butterbach vd., 2011
Avrupa	T hücreli lenfoma	0.487	0.494	.78	Butterbach vd., 2011
Avrupa	Hodgkin lenfoma	0.468	0.524	.27	Butterbach vd., 2011
Çin	Ankiloza spondilit	0.276	0.164	.006	Liu vd., 2020
Çin	Hepatoselüler Karsinom	0.354	0.250	.01	Li vd., 2016
Çin	Tüberküloz	0.154	0.130	.13	He vd., 2017
Hindistan	Astım	0.394	0.406	.73	Kumar ve Ghosh, 2008
Kuzey Batı İngiltere	Tüberküloz	0.443	0.495	.32	Petrovic, 2016
Türkiye	MS	0.456	0.500	.11	Bu çalışma

Enflamatuvar, otoimmün özellikleri yönünden MS'e benzeyen bir hastalık olan ankiloza spondilit ile *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada (Liu vd., 2020), hasta ve kontrol karşılaştırmasında, C alel frekansının, hastalarda anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.006$). Bizim çalışmamızda ise, gruplar arasında, polimorfik C alel frekansının RRMS grubunda 0.456, kontrol grubunda 0.500 olduğu görülmüş ve *IFNG* rs2069727 T/C genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.3. Plazma miRNA Seviyelerinin ve IFN-gama Konsantrasyonunun MS ile İlişkileri

4.3.1. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle MS arasındaki ilişkiler

Vücut sıvılarında miRNA'ların stabiliteleri oldukça yüksektir ve bu nedenle güçlü biyobelirteç potansiyeli taşımaktadırlar (Weber vd., 2010). Bir çalışmada MS'in erken tanısında kullanılabilecek biyobelirteçlerin bulunması amacıyla 10 RRMS hastasının,

9 SPMS hastasının ve 9 sağlıklı kontrol bireyin plazmasında toplam 368 miRNA seviyesi incelenmiş, RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla, hsa-miR-9 ($P=.03$), hsa-miR-22 ($P=.01$), hsa-miR-181b ($P=.01$), hsa-miR-196a ($P=.04$), hsa-miR-431 ($P=.04$) ve hsa-miR-449b ($P=.00003$) dâhil olmak üzere 29 miRNA'nın anlamlı seviyede daha yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir. SPMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla, hsa-miR-20b ($P=.001$), hsa-miR-30e ($P=.004$), hsa-miR-181b ($P=.02$), hsa-miR-210 ($P=.002$) ve hsa-miR-449b ($P=.01$) dâhil olmak üzere 35 miRNA'nın anlamlı derecede daha yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir (Gandhi vd., 2013).

hsa-miR-24-3p'nin de içinde bulunduğu dolaşımdaki bazı miRNA (hsa-miR-191-5p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-376c-3p) seviyelerinin serumda incelendiği bir çalışmada, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-191-5p rölatif ekspresyon seviyeleri, RRMS-kontrol; PPMS-kontrol gruplarında karşılaştırılmış, RRMS ve PPMS hasta gruplarında bahsedilen miRNA'ların rölatif ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere kıyasla, anlamlı derecede daha yüksek ifade edildiği bulunmuştur (hsa-miR24-3p rölatif ekspresyon seviyesi için RRMS ile kontrol ($P=.01$) ve PPMS ile kontrol ($P=.01$); hsa-miR-191-5p rölatif ekspresyon seviyesi için RRMS ile kontrol ($P=.01$) ve PPMS ile kontrol ($P<.001$) (Vistbakka vd., 2018) (Çizelge 4.3). 20 RRMS hastası ve 19 sağlıklı bireyden oluşan başka bir çalışmada 866 farklı miRNA profili incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, hsa-miR-145, hsa-miR-186, hsa-miR-664, hsa-miR-422a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-584, hsa-miR-223, hsa-miR-1275 ve hsa-miR-491-5p'nin MS hastalarında anlamlı derecede yüksek ifade edildiği (sırasıyla, $P=.001$, $P=.003$, $P=.04$, $P<.001$, $P<.001$, $P<.001$, $P<.001$, $P<.001$ ve $P<.001$) ve sadece hsa-miR-20b'nin anlamlı derecede düşük ifade edildiği ($P<.001$) bildirilmiştir (Keller vd., 2009; Ehya vd., 2017). PBMC, serum ve plazma örnekleriyle yapılan çalışmalarda MS ile miRNA'ların değişen rölatif ekspresyon seviyeleri Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Literatürde MS'te kullanılan immünomodülatör tedaviler ile miRNA'lar arasındaki ilişkiye dair yayın sayısı oldukça sınırlıdır. Kullanılan MS ilaçlarının miRNA ekspresyonları üzerindeki etkisini araştıran bazı çalışmalar bulunmaktadır (Manna vd., 2018; Mansoor vd., 2020; Yaşar vd., 2022). Waschbisch vd. tarafından yapılan çalışmada (2011), 5 miRNA (hsa-miR-20b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a, hsa-miR-

155 ve hsa-miR-326) seçilerek PBMC'lerde ekspresyonları incelenmiş, hsa-miR-20b için fark görülmezken, hsa-miR-142-3p ($P<.005$), hsa-miR-146a ($P<.05$), hsa-miR-155 ($P<.05$) ve hsa-miR-326 ($P<.05$) ekspresyonlarının tedavi almamış MS hastalarında kontrollere göre 3 kat artmış olduğu gözlenmiştir. Bu miRNA'ların ekspresyonu tedavi almamış MS hastaları ile IFN-beta tedavisi alanlar arasında değişmezken, hsa-miR-142-3p ($P=.003$) ve hsa-miR-146a ($P=.03$) ekspresyon seviyelerinin GA tedavisi alan RRMS hastalarında, naif RRMS hastalarına kıyasla, önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. Çalışmada, bu miRNA'ların her ikisinin de T düzenleyici hücrelerin baskılayıcı fonksiyonunu artırarak immünotolerans ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Waschbisch vd., 2011).

IFN-beta tedavisi ile serum seviyeleri değişen miRNA'ları araştıran Manna ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, serumdaki eksozomlar izole edilerek içlerindeki miRNA'lardan bir grubu incelenmiştir. Sonuçta IFN-beta tedavisinden sonra hsa-miR-22-3p ($P=.01$) ve hsa-miR-660-5p ($P<.001$) ekspresyon seviyelerinin arttığı; hsa-miR-486-5p ($P=.01$), hsa-miR-451a ($P=.01$), hsa-miR-320b ($P<.001$), hsa-miR-122-5p ($P=.01$), hsa-miR-215-5p ($P=.001$), hsa-miR-320d ($P=.001$), hsa-miR-19-3p ($P=.01$), hsa-miR-26a-5p ($P=.03$), hsa-miR-142-3p ($P=.002$), hsa-miR-146a-5p ($P=.03$) ve hsa-miR-15b-3p ($P<.001$) ekspresyon seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Manna vd., 2018).

Periferik kan örneklerinden izole edilen miRNA'ların incelendiği bir çalışmada, atak dönemindeki RRMS hastalarının ve sağlıklı kontrollerin 3 ay sonra kontrole çağırılarak tekrar ayrıntılı muayenesi ardından kan örnekleri alınmıştır. MS atak dönemi miRNA düzeyleri (hsa-miR-145, hsa-miR-301b, hsa-miR-214, hsa-miR-190a ve hsa-miR-1304) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir; remisyon döneminde ise tüm miRNA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı (sırasıyla, $P=.010$, $P=.023$, $P=.002$, $P=.006$ ve $P=.003$) görülmüştür. Bunun yanında, yine bu çalışmada IFN-beta ve GA başta olmak üzere kullanılan diğer ilaçların miRNA gen ekspresyonları üzerine etkisi olmamıştır (Yaşar vd., 2022).

Çizelge 3.3: Literatürde PBMC, serum veya plazmada MS ile ilişkili bulunan miRNA'lar.

Kaynak	Grup	Örnek	miRNA	P	Hedef mRNA ve/veya rolü	
Keller vd., 2009	20 RRMS 19 kontrol	Kan	hsa-miR-145↑	.001	IFNGR1'i hedefleyerek bağışıklık yanıtını düzenleme	
			hsa-miR-186↑	.003	İmmün yanıtların ve enflamasyonun önemli bir düzenleyicisi olan IL-10'u hedefleme	
			hsa-miR-664↑	.04		
			hsa-miR-422a↑	<.001	IL-7R ve IL10RA'nın düzenlenmesi	
			hsa-miR142-3p↑		FOXP3 ekspresyonunu baskılayarak immün toleransı düzenleme	
			hsa-miR-584↑		BDNF'yi hedefleyerek sinir gelişimi düzenleme	
			hsa-miR-223↑		IL-6' nın düzenlenmesi	
			hsa-miR-1275↑		Sinir sistemi gelişimini düzenleme	
			hsa-miR-491-5p↑		Nöronal apoptozu düzenleme	
			hsa-miR-20b ↓		TLR4'ü hedefleme, proenflamatuar sitokinlerin aşağı regülasyonunu tetikleme	
Cox vd., 2010	59 MS 37 kontrol	PBMC	hsa-miR-17 ↓	<.001	MS ile ilişkili T hücre farklılaşmasının inhibisyonu	
			hsa-miR-20a ↓	<.001		
Waschbisch vd., 2011	36 MS 32 kontrol	PBMC	hsa-miR-142-3p↑	<.005	İmmün toleransı düzenleme	
			hsa-miR-326 ↑		Th17 farklılaşması	
			hsa-miR-146a ↑	<.05	İmmün toleransı düzenleme	
			hsa-miR-155 ↑		Th17 farklılaşması	
Martinel li-Boneschi vd., 2012	19 MS 14 kontrol	PBMC	hsa-let-7g ↓	.001	LRRK1'i hedefleyerek B hücresi yanıtlarını düzenleme	
			hsa-miR-150↓	.002	B hücresi farklılaşmasını teşvik etme	
Søndergaard vd., 2012	30 MS 31 kontrol	PBMC	hsa-let-7d ↑	<.001	Enflamasyonu destekleme	
	28 MS 27 kontrol		hsa-miR-744 ↑	<.001		
	22 MS, 15 kontrol	Plazma	hsa-miR-145 ↑	.004	NF-κB sinyal yolunu etkileme pro-enflamatuar sitokinleri (IL-6 ve IL-8) düzenleme	
	27 MS, 25 kontrol			PBMC		.0004
	49 MS, 40 kontrol			Serum		<.0001
MS'le birlikte düzensiz ifade edilen miRNA'ların sağında bulunan "↑" işareti ekspresyon seviyesindeki artışı gösterirken; ↓ işareti ekspresyon seviyesindeki düşüşü göstermektedir. Forkhead kutusu P3 (Forkhead box P3, FOX3), beyinden türetilen nörotrofik faktör (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), toll benzeri reseptör 4 (toll-like receptor 4, TLR4), lösin-zengin tekrar kinaz 1'i (leucine-rich repeat kinase 1, LRRK1), nöronal PAS alanı içeren protein 3 (neuronal PAS domain-containing protein 3, NPAS3), nöral hücre adezyon molekülü 1 (neural cell adhesion molecule 1, NCAM1), miyelinle ilişkilendirilmiş oligodendrosit temel proteini (myelin-associated oligodendrocyte basic protein, MOBP). B hücresi lenfoma 2 benzeri protein 11 (B-cell lymphoma 2-like protein 11, BIM), p53 tarafından artırılmış apoptoz modülatörü (p53-upregulated modulator of apoptosis, PUMA), cinsiyet belirleyici bölge y-kutusu 2 SRY (Sex-determining region Y box 2, SOX2), protein tirozin fosfataz reseptör tip Z1 (protein tyrosine phosphatase receptor type Z1, PTPRZ1) ve fosfotaz ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog, PTEN).						

Çizelge 4.3 (devam): Literatürde PBMC, serum veya plazmada MS ile ilişkili bulunan miRNA'lar.

Kaynak	Grup	Örnek	miRNA	P	Hedef mRNA ve/veya rolü
Siegel vd., 2013	4 MS 4 kontrol	Plazma	hsa-miR-614 ↑	.003	NPAS3/NCAM1/MOBP/NPAS 3'ü hedefleyerek nöronal farklılaşmayı destekleme
			hsa-miR-572 ↑	.02	
			hsa-miR-648 ↑	.03	
			hsa-miR-422a ↑		
			hsa-miR-1826 ↑	.04	
			hsa-miR-22 ↑		
	hsa-miR-1979 ↓	.02	Otoimmüniteyi önleme		
Vistbak ka vd., 2018	53 RRMS 20 PPMS 27 kontrol	Serum	hsa-miR-191-5p ↑	.01	Nöronal rejenerasyonu teşvik eden BDNF'nin inhibisyonu
			hsa-miR-24-3p ↑	.01	BIM, PUMA ve IL-4 hedefleme, Th1/Th2 denge kontrolü
Zanoni vd., 2020	74 MS 17 kontrol	Serum	hsa-miR-128-3p ↑	.04	P53 Pro-apoptotik sinyal yolağını düzenleme
Shadem an vd., 2020	30 MS 30 kontrol	Serum	hsa-miR-146a ↑	.001	Th1 ve Th17 farklılaşmasını düzenleme
			hsa-miR-155 ↑	<.001	
Ibrahim vd., 2020	39 RRMS 35 SPMS 10 kontrol	Serum	hsa-miR-450b-5p ↓	<.001	SOX2 ve PTPRZ1 hedefleme, nöron farklılaşmasını ve gelişimin, teşvik etme
Moghad am vd., 2020	32 MS 32 kontrol	Kan	hsa-miR-18a-5p ↓	.05	P53 MAPK sinyal yolağında görevli PTEN'in inhibisyonu
Rahimir ad vd., 2021	32 MS 32 kontrol	Kan	hsa-miR-160a ↓	.05	IL-6 ekspresyonunu etkileme
MS'le birlikte düzensiz ifade edilen miRNA'ların sağında bulunan '↑' işareti ekspresyon seviyesindeki artışı gösterirken; ↓ işareti ekspresyon seviyesindeki düşüşü göstermektedir. Forkhead kutusu P3 (Forkhead box P3, FOX3), beyinden türetilen nörotrofik faktör (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), toll benzeri reseptör 4 (toll-like receptor 4, TLR4), lösin-zengin tekrar kinaz 1'i (leucine-rich repeat kinase 1, LRRK1), nöronal PAS alanı içeren protein 3 (neuronal PAS domain-containing protein 3, NPAS3), nöral hücre adezyon molekülü 1 (neural cell adhesion molecule 1, NCAM1), miyelinle ilişkilendirilmiş oligodendrosit temel proteini (myelin-associated oligodendrocyte basic protein, MOBP). B hücreli lenfoma 2 benzeri protein 11 (B-cell lymphoma 2-like protein 11, BIM), p53 tarafından artırılmış apoptoz modülatörü (p53-upregulated modulator of apoptosis, PUMA), cinsiyet belirleyici bölge y-kutusu 2 SRY (Sex-determining region Y box 2, SOX2), protein tirozin fosfataz reseptör tip Z1 (protein tyrosine phosphatase receptor type Z1, PTPRZ1) ve fosfotaz ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog, PTEN).					

GA ile tedavi edilen bir EAE fare modelindeki miRNA değişikliklerinin idrar ve plazmadan analiz edildiği bir çalışmada, EAE farelerinin plazma örnekleri, kontrol farelerinki ile karşılaştırıldığında, plazma miR-27a-3p, miR-126-5p, miR-155-5p ve miR-350-5p seviyelerinin anlamlı derecede yüksek ifade edildiği (miR-27a-3p, miR-155-5p ve miR-350-5p için $P<.01$; miR-126-5p için $P<.05$); GA tedavisi alan EAE fareleri ile tedavi almayan EAE fareleri karşılaştırıldığında ise plazma miR-27a-3p, miR-126-5p, miR-155-5p ve miR-350-5p seviyelerinin anlamlı derecede düşük ifade

edildiği görülmüştür (sırası ile $P<.01$, $P<.05$, $P<.001$ ve $P<.001$). EAE farelerinin idrar örnekleri, kontrol farelerinki ile karşılaştırıldığında; idrar miR-9-5p ($P<.01$) ve miR-350-3p ($P<.01$) seviyelerinin anlamlı derecede yüksek ifade edildiği; GA tedavisi alan EAE fareleri ile tedavi almayan EAE fareleri karşılaştırıldığında ise idrar miR-9-5p ($P<.01$) ve miR-350-3p ($P<.01$) seviyelerinin anlamlı derecede düşük ifade edildiği görülmüştür. Çalışmada miRNA'ların tamamı, T hücrelerinin Th1 ve Th17 fenotiplerine doğru değişen polarizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Singh vd., 2016). Bu veriler, miRNA'ların bu hastalıkta potansiyel tanı-tedavi biyobelirteçleri olduğu hipotezini desteklemektedir.

Bu sonuçları doğrulamak ve MS patogeneğinde, izlenmesinde ve terapötik yanıtında miRNA'ların özgül rolünü, daha iyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu bölümde plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle MS arasındaki ilişkiler literatür bulguları verilerek incelenmiştir. Bölüm 4.3.1.1 ve 4.3.1.2'de tez çalışma konusunda bulunan hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile MS arasındaki ilişkiler literatür bulguları verilerek incelenmiştir.

4.3.1.1. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS tanı-tedavi biyobelirteci olma potansiyeli

Günümüzde, miRNA'ların Th hücrelerinin ve Treg farklılaşmasının önemli modülatörleri olarak giderek daha fazla tanındığı görülmektedir (Naqvi ve Nares, 2015). Bu miRNA'lar içerisinde bulunan hsa-miR-24-3p, T hücrelerinde özellikle IL-4 ve IFN-gama üretiminin inhibisyonunda rol oynamaktadır. IL-4 saf yardımcı CD4+ T hücrelerinin Th2'ye farklılaşmasına aracılık etmekte (Paul vd, 2010; Fayyad-Kazan vd., 2014); IFN-gama ise proenflamatuar Th1 hücre tipine farklılaşmayı kontrol etmektedir. Bu kanıtlar, hsa-miR-24-3p'nin IL-4'ü (Pua vd., 2016) ve IFN-gama'yı (Fayyad-Kazan vd., 2014) hedeflediğini ve böylece MS patogeneğinde önemli bir yeri olan CD4+ Th1/Th2 homeostazına her iki yönden de etki edebildiğini göstermiştir. Ayrıca son bulgular, hsa-miR-24-3p'nin aşırı ekspresyonunun, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ilişkili faktör 6'yı (TNF receptor associated factor; TRAF6) baskılayıp proenflamatuar mediatörlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α) seviyelerini azaltarak hsa-miR-24-3p'nin antienflamatuar bir etkisi olduğunu göstermiştir (hepsi için, $P<.01$) (Oladejo vd., 2022). Diğer yandan, hsa-miR-24-3p'nin dönüştürücü büyüme faktörü beta-1'i (transforming growth factor beta 1; *TGF- β 1*) baskılayarak

Treg hücre fonksiyonunu bozarak proenflamatuvar bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (Sun vd., 2008). Özetle, bu çalışmalar, hsa-miR-24-3p'nin MS patofizyolojisinde sergilediği çift yönlü rolüne dikkat çekmektedir. hsa-miR-24-3p'nin çalışmamıza konu olan hedef bölgesi, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR'sinde yer almaktadır (Fayyad-Kazan vd., 2014). Fayyad-Kazan vd. tarafından yapılan çalışmada miR-24-3p'nin *IFNG* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde bulunan hedef bölgesine bağlanarak IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014).

MS hastalığıyla birlikte, hsa-miR-24-3p'nin ekspresyon seviyelerinde görülen artış, birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Ehya vd., 2017; Vistbakka vd., 2017; Vistbakka vd., 2018; Vistbakka vd., 2022). Ehya ve arkadaşları tarafından İran'da yapılan çalışmada hsa-miR-24-3p'nin de bulunduğu sekiz miRNA'nın ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PCR kullanılarak 33 MS hastasından ve 30 sağlıklı kontrolden alınan serum numunelerinde ölçülmüştür. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi sonuçları, kontrollerle karşılaştırıldığında MS hastalarında (RRMS, SPMS ve PPMS hastaları birlikte incelenmiştir) önemli ölçüde daha fazla ($P<.01$) olduğu görülmüştür (Ehya vd., 2017). Ehya ve arkadaşlarının çalışmalarının devamında hsa-miR-24-3p'nin tanısal değerini test etmek için ROC eğrisi çizilmiş ve eğrinin altındaki alan 0.68 olarak hesaplanmıştır. AUC 0.60-0.70 arasında olduğundan tanısal gücü “zayıf” (poor) kabul edilmiştir.

Vistbakka ve arkadaşları tarafından (2017) Finlandiya'da yapılan bir çalışmada ise, progresif MS'li (PPMS ve SPMS) hastalarda serumdaki miRNA seviyeleri incelenmiş, hsa-miR-24-3p ifade edilme seviyesinin, PPMS'li hastalarda 1.43 (0.74–2.40) kontrollere 1.08 (0.50–1.88) kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.02$) (rölatif ekspresyon seviyesi değerleri ortalama (min.-maks.) şekilde verilmiştir). Ayrıca, PPMS ve SPMS tipleri arasında hsa-miR-24-3p seviyesinin ayırt edici özelliğinin araştırılması için, bu iki MS tipi karşılaştırılmış ve hsa-miR-24-3p ifade edilme seviyesi PPMS hastalarında SPMS hastalarına kıyasla daha yüksek çıkmıştır ($P=.02$; $P=.01$). Bu çalışmada RRMS hastaları incelenmemiştir (Vistbakka vd., 2017). Bu sonuçlar, serum hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, progresif MS (PPMS ve SPMS) hastaları arasında ayırt edici özelliğinin

olduğunu göstermektedir. Vistbakka ve arkadaşları tarafından yapılan ikinci çalışmada (Vistbakka vd., 2018) hsa-miR-24-3p de dâhil olmak üzere 4 miRNA'nın ifade edilme seviyesi 53 RRMS, 20 PPMS ve 27 kontrolden oluşan çalışma grubunun serum örneklerinde incelenmiştir. hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-191-5p'nin seviyelerinin RRMS ve PPMS hastalarında kontrollere kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur (RRMS-kontrol: $P=.01$; PPMS-kontrol: $P=.01$). Bu iki hasta grubu arasında ise fark gözlenmemiştir. Neticede, Vistbakka ve arkadaşlarının çalışma gruplarını oluşturan MS alt tipleri birbirleri ile ve kontrollerle hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi açısından karşılaştırılmıştır. Sonucunda, serum hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin MS alt tiplerini ayırma gücü bulunmamakta olup, PMS (progresif MS, PPMS ve SPMS) tanısı alan hastalar arasında PPMS için ayırma gücü bulunmaktadır. Ek olarak, serum örneklerinde yükselmiş hsa-miR-24-3p seviyeleri çalışmadaki MS alt tiplerini sağlıklı kontrollerden ayıran bir özellik olması yönüyle potansiyel bir tanı biyobelirteci olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, hsa-miR-24-3p seviyelerinin tüm hastalardan oluşan birleştirilmiş grupta EDSS puanları ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($r=.264$; $P=.03$). Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak yalnızca miRNA'lar incelenmiş olup plazma IFN-gama seviyesi veya *IFNG* genetik polimorfizmleri incelenmemiştir (Vistbakka vd., 2018). Bunun yanında, RRMS hastalarında kontrollere kıyasla hsa-miR-24-3p seviyesinin anlamlı derecede yüksek olması yönünden tez çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda 3.92 ± 2.19 , naif grubundaki hastalarda 3.10 ± 1.87 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.57 ± 1.57 olduğu görülmüştür ($P<.001$). Naif ve GA grubundaki hastaların plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyonunun kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (naif - kontrol: $P=.01$; GA - kontrol: $P<.001$).

Çalışmamızda, GA ile naif grubu arasında plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyonu yönünden önemli bir farklılık bulunmamıştır. Daha kesin sonuçlar, çalışma grubunun belirli bir süre boyunca izlendiği, tedavi etkinliği hakkında bilgilerin toplandığı boylamsal çalışmalar ile elde edilebilir. Böylece tedaviye yeni başlayan hastalardan, ilaç kullanımından önce ve sonra olmak üzere belirli periyotlarla; serum-plazma örneklerinin toplanması ile her hasta bazında bir referans noktası oluşturulabilir ve

periyot sonunda ölçülen hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin, EDSS ve MSSS puanlarıyla birlikte incelenmesi sayesinde tedavi sürecinin takibi gerçekleştirilerek hastaların tedaviye uyumu gözlenebilir.

Çalışmamızın devamında, hsa-miR-24-3p'nin tanısal değerini test etmek için ROC eğrisi grafikleri çizdirilmiştir. Naif ile kontrol grubu arasında yapılan analizde AUC 0.75 olarak hesaplanmış ve 0.70-0.80 arasında olduğu için tanısal değeri “orta” (fair) olarak belirlenmiştir ($P=.01$, duyarlılık=%84, özgüllük=%68 ve kesme değeri=1.57). ROC analizlerinde anlamlı derecede sonuçlar veren bu model, hata matrisi analiziyle de incelenmiştir. Bu analiz sonucunda naif hasta ile kontrol grubu arasında duyarlılık %84, özgüllük %68 ve doğruluk % 76 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu analizlere göre, hasta plazma örneklerinde bulunan yüksek hsa-miR-24-3p seviyeleri RRMS alt tipini sağlıklı kontrollerden ayıran bir özellik olması yönüyle tanısal değeri ‘orta’ olan potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. Ancak bu analizler önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla birlikte yorumlandığında, hsa-miR-24-3p seviyelerinin sadece RRMS alt tipi (Vistbakka vd., 2018) ($P=.01$) özelinde değil, PPMS’li hastaları içeren grupta (Vistbakka vd., 2017 ($P=.02$); Vistbakka vd., 2018 ($P=.01$)) ve PPMS, SPMS ve RRMS’li hastaları içeren karma grupta ($P<.01$) (Ehya vd., 2017) kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür. Dolayısıyla hsa-miR-24-3p seviyelerinin potansiyel ayırt edici gücünün RRMS tipine ait bir özgüllüğünün olmadığı görülmektedir. Ayrıca, literatürde kanser, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi hastalıklarla birlikte ifade seviyesi değişen hsa-miR-24-3p seviyeleri ile ilgili yapılan pek çok çalışmaya göre, hsa-miR-24-3p'nin serum-plazma seviyeleri, hastalıklar arasında ve hatta aynı hastalığın farklı evrelerinde bile değişebilir (Rashighi ve Harris, 2017; Vistbakka vd., 2018; Vistbakka vd., 2022; Zhang vd. 2022). hsa-miR-24-3p'nin belirli bir hastalıktaki rolü ve ifade düzeyleri hala tam olarak anlaşılmadığı için, belirli bir hastalığın hsa-miR-24-3p ile ilişkisinin değerlendirilmesi için daha fazla araştırma ve çalışma gereklidir.

GA tedavisinin hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi üzerindeki etki mekanizması hala bilinmezliğini sürdürmektedir. Çalışmamızda hsa-miR-24-3p seviyelerinin, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olması (GA - kontrol: $P<.001$) ilk bakışta şaşırtıcıdır. Dahası bulguların ROC

analizleri yapıldığında, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, GA tedavisi alan hastalar için kontrollere kıyasla “iyi” ($AUC=0.822$, $P<.001$, duyarlılık=%92,  zg ll k=%72 ve kesme değeri=1.77) derecede ayırım yapabileceği görülmüştür. Ardından gerçekleştirilen hata matrisi analizi ile GA ile kontrol grupları arasında duyarlılık %92, özgüllük %72 ve doğruluk %82 olarak belirlenmiştir ( izelge 4.4). Hastalıkla birlikte ifadesi değişen herhangi bir parametrenin ( rneğin, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-27a-3p hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-350-5p vb.) tedavi sonucunda sağlıklı kontrol bireylerde bulunan normal seviyelerine dönmesi beklenirdi. Elde edilen bu sonuç bu nedenle  a ırtıcıdır (Singh vd., 2016). GA’nın miyelin antiğenleriyle rekabet ettiği ve MHC sınıf 2’ye bağlandığında gerçekleşen mekanizmalar sonucunda, MBP’ye özgü T-hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği yarışmalı inhibisyon ortamında bulunan çeşitli bağışıklık hücreleri ve etkileri, sağlıklı kontrollerde olduğundan farklı olabilir. Dolayısıyla, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-24-3p seviyelerinin görülmesi, GA tedavisi ile doğal, adaptif bağışıklık ve GA-spesifik T hücrelerinin kompozisyonundaki değişiklikler sonucunda birbirini izleyen mekanizmalara bağlı olabilir ve buna bölüm 4.3.6’ da ayrıntılı bir şekilde değinilmiştir. GA tedavisi alan hastalarda hsa-miR-24-3p seviyelerinin kontrol bireylere kıyasla daha yüksek olması ($P<.001$), GA’nın farmakodinamik etkisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilerle birlikte yorumlanıp geniş bir perspektifte sunulabilir ve yeni çalışmalarla GA’nın moleküler düzeydeki tedavi mekanizması aydınlatılabilir.

Naif - kontrol ve GA - naif gruplarında yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında bir ilişki bulunmamıştır. GA - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 2.43 kat ($OR=2.434$, $CI=1.352-4.382$ ve $P=.003$); parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 2.15 kat ($OR=2.148$, $CI=1.321-3.493$ ve $P=.002$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Ehya ve arkadaşlarının çalışmasında EDSS ile hsa-miR-24-3p ($\rho=-0.39$ ve $P<.01$) ekspresyon seviyesi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmasının (Ehya vd., 2017) aksine, çalışmamızda yapılan korelasyon analizleri sonucunda böyle bir bulgu elde

edilmemiştir. GA grubunda yapılan korelasyon analizleri sonucunda, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyonu ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonu ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon g r lmemi ken; naif ve kontrol grubunda hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında pozitif korelasyon (sirasıyla $\rho=.458$, $P=.02$; $\rho=.607$ ve $P=.001$) olduğu görülmüştür. Hastalıkla birlikte hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p arasındaki doğrusal ilişkinin yönü deği memi tir. Kontrol ve naif grubunun aksine, GA tedavisi alan RRMS hastalarında hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p arasında herhangi bir korelasyonun olmaması dikkat çekmektedir. Kontrol bireylerde ve naif RRMS hastalarında hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p arasında pozitif bir korelasyon mevcutken, tedavi alan hastalarda bu iki miRNA arasında herhangi bir korelasyonun olmaması, GA'nın farmakodinamik etkisinin inceleneceği birçok çalışma için ön ayak olabilir. hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerini geri beslemeli mekanizmalarla düzenleyen bir transkripsiyon faktörü (TF), sağlıklı bireylerde ve naif hastalarda normal seviyelerinde iken; GA tedavisi ile GA-spesifik T hücrelerinin ürettiği sitokinler ve/veya nöroprotektif proteinler bu seviyelerin d  mesine veya bu TF'nin inhibisyonuna sebep oluyor olabilir. Başka bir açıdan bakıldığında, GA tedavisi ile GA-spesifik T hücrelerinin ürettiği sitokinlerin ve/veya nöroprotektif proteinlerin tez kapsamında çalışılan miRNA'lardan sadece birini doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkilemesi sonucunda, GA tedavisiyle birlikte hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p arasındaki doğrusal ilişki bozulmuş olabilir.

4.3.1.2. hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve RRMS tanı-tedavi biyobelirteci olma potansiyeli

Günümüzde, miRNA'ların Th hücrelerinin ve Treg farklılaşmasının önemli modülatörleri olarak giderek daha fazla tanındığı gözlemlenmektedir (Afsar ve Nares, 2015). Bu miRNA'lar içerisinde bulunan hsa-miR-181d-3p, çeşitli immünite süreçlerinde düzenleyici bir işlev görür ve bağışıklık hücrelerinin gelişimi, aktivasyonu ve yanıtının düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir. 2017'de yapılan bir çalışmada, hsa-miR-181d-3p'nin NF- B yolunu indükleyerek insan dendritik hücre olgunlaşmasını düzenlediği ve aşırı ifadesinin, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Su vd., 2017). Ayrıca, TargetScan kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada östrojen reseptörü 1 (estrogen receptor 1; *ESR1*),

çift özgüllüklü fosfataz 10 (dual specificity phosphatase 10; *DUSP10*) ve silindromatozis (turban tümör sendromu) lizin 63 deubikuitinaz (cylindromatosis (turban tumor syndrome) Lysine 63 Deubiquitinase; *CYLD*) genlerinin hsa-miR-181d-3p'nin hedef genleri olduğu tahmini yapılmış ve varsayılan hsa-miR-181d-3p doğrudan hedeflerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Sonucunda hsa-miR-181d-3p'nin aşırı ifadesinin, dendritik hücrelerin olgunlaşması sırasında enflamasyon ve immün yanıt süreçlerini kontrol etmede ortak rolleri olan *ESR1* ($P<.05$), *DUSP10* ($P<.05$) ve *CYLD*'nin ($P<.05$) ifadesini aşağı regüle ettiği bulunmuştur. Ayrıca, hsa-miR-181d-3p'nin proenflamatuar sitokin IL-12 ve TNF- α ekspresyonunu desteklediği gösterilmiştir (Su vd., 2017). Başka bir çalışmada, hsa-miR-181d-3p'nin proenflamatuar rolü olan *IL-2* mRNA'sını direkt olarak hedefleyerek post-transkripsiyonel düzenlemede rolü olduğu bildirilmiştir (Xue vd., 2011). hsa-miR-181d-3p'nin hem proenflamatuar hem de antienflamatuar süreçlerdeki mekanizmalarını ve etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. hsa-miR-181d-3p'nin çalışmamıza konu olan hedef bölgesi, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR'sinde yer almaktadır (Fayyad-Kazan vd., 2014).

Günümüzde, hsa-miR-181d-3p'nin MS'teki rolü yeterince anlaşılmamıştır. Fayyad-Kazan vd. tarafından yapılan çalışmada miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Ehya ve arkadaşları tarafından İran'da gerçekleştirilen bir çalışmada (2017), aralarında hsa-miR-181d-3p'nin de bulunduğu sekiz miRNA'nın ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PCR kullanılarak 33 MS hastasından ve 30 sağlıklı kontrolden alınan serum numunelerinde ölçülmüştür. hsa-miR-181d-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesi, kontrollerle karşılaştırıldığında MS hastalarında (RRMS, SPMS ve PPMS hastaları birlikte incelenmiştir) önemli ölçüde düşük ifade edildiği gözlenmiştir ($P<.05$). hsa-miR-181d-3p'nin tanısal değerini test etmek için ROC eğrisi çizilmiş ve eğrinin altındaki alan 0.63 olarak hesaplanmıştır. AUC 0.60-0.70 arasında olduğunda “zayıf” (poor) kabul edilmiştir. Ayrıca EDSS ile hsa-miR-181d-3p ($\rho=-0.33$ ve $P<.01$) ekspresyon seviyesi arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür (Ehya vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda 4.07 ± 3.13 , naif grubundaki hastalarda 6.18 ± 5.36 ve kontrol

grubundaki bireylerde 2.00 ± 2.52 olduğu görülmüştür ($P=.002$). GA ve naif grubundaki hastaların plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonunun kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir (GA - kontrol: $P=.05$ ve naif - kontrol: $P=.002$).

GA ile naif grubu arasında plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonu yönünden önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bu yüzden tedavi ile değişen hsa-miR-181d-3p seviyesi hakkında daha kapsamlı sonuçlara ulaşılması için tedaviye yeni başlayan hastalardan ilaç kullanımından önce ve kullanımından sonra belirli periyotlarla; örnek alınarak, serum-plazma örneklerinden elde edilen miRNA verileri ile yeni analizler gerçekleştirilebilir. Böylece, her periyot sonunda ölçülen hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin, EDSS ve MSSS puanlarıyla birlikte incelenmesi ile tedavi sürecinin takibi gerçekleştirilerek hastaların tedaviye uyumu gözlenebilir. RRMS’li naif hasta - kontrol grubunda yapılan parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren modellerdeki lojistik regresyon analizleri sonucunda, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile yaklaşık 1.5 kat ($OR=1.520$, $CI=1.091-2.116$ ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızın devamında, plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin tanısal gücünü test etmek için, ROC eğrisi grafikleri çizdirilmiştir. RRMS’li naif hasta ile kontrol grubu arasında yapılan analizde, AUC, 0.76 olarak hesaplanmış ve 0.70-0.80 arasında olduğu için tanısal değeri “orta” (fair) olarak belirlenmiştir ($P=.002$, duyarlılık=%68, özgüllük=%84 ve kesme değeri=3.09). ROC analizi ardından yapılan hata matrisi analizi sonucunda RRMS’li naif hasta ile kontrol grubu arasında duyarlılık %68, özgüllük %84 ve doğruluk %76 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu analizlere göre, hasta plazma örneklerinde bulunan yüksek hsa-miR-181d-3p seviyeleri RRMS alt tipini sağlıklı kontrollerden ayıran bir özellik olması yönüyle tanısal değeri ‘orta’, duyarlılığı %68, özgüllüğü %84 ve doğruluğu %76 olan potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir.

Bizim çalışmamızın aksine, Ehya ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada, serumdaki hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri MS hastalarında kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşüktür ($P<.05$). Çalışmalarının devamında hsa-miR-181d-3p’nin tanısal değerini test etmek için ROC eğrisi çizilmiş

ve eğrinin altındaki alan 0.63 olarak hesaplanmıştır. AUC 0.60-0.70 arasında olduğundan “zayıf” (poor) kabul edilmiştir ($P<.05$). Bu iki çalışma arasındaki farklılık, Ehya ve arkadaşlarının oluşturduğu hasta grubunda 3 farklı MS alt tipinin (RRMS, SPMS ve PPMS); bizim oluşturduğumuz hasta grubunda ise sadece RRMS alt tipinin bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.

Ehya ve arkadaşlarının çalışmasında MS alt tipleri ayrı ayrı kontrollerle karşılaştırılmamış, RRMS, SPMS ve PPMS gruplarını tek bir MS kategorisi içerisinde değerlendirilmiş; bizim çalışmamızda ise sadece RRMS grubu kontrollerle karşılaştırılmıştır. Bu iki farklı çalışmada birbirinden farklı sonuçların elde edilmesi, hsa-miR-181d-3p seviyelerinin RRMS’i diğer MS alt tiplerinden ayırma yeteneğinin olup olmadığının sorgulanmasına neden olmaktadır. Bu sorunun cevabı için, MS alt tiplerinin kontrollerle ve birbiriyle hsa-miR-181d-3p seviyeleri açısından serum-plazma örneklerinden karşılaştırıldığı çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Ayrıca, literatürde kanser, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi hastalıklarla birlikte ifadesi değişen hsa-miR-181d-3p seviyeleri ile ilgili yapılan pek çok çalışmaya göre (Zhang vd., 2012; Burgos vd., 2014), hsa-miR-181d-3p’nin seviyeleri, hastalıklar arasında değişiklik gösterebilir. Ancak, hastalıkların karmaşıklığı ve farklı dokuların etkileşimi nedeniyle hsa-miR-181d-3p’nin kesin rolü hala tam olarak anlaşılmamıştır. Belirli bir hastalığın hsa-miR-181d-3p ile ilişkisinin değerlendirilmesi için daha fazla araştırma ve çalışma gereklidir.

GA tedavisinin hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyesi üzerindeki etki mekanizması hala bilinmezliğini sürdürmektedir. Çalışmamızda hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha fazladır ($P=.05$).

Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonu ile ilgili elde ettiğimiz bulguların ROC analizleri yapıldığında, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, GA tedavisi alan hastalar için “orta” ($AUC=0.717$, $P=.05$, duyarlılık=%68, özgüllük=%72 ve kesme değeri=2.32) derecede ayırım yapabileceği görülmüştür. ROC analizlerinde anlamlı ölçüde sonuç veren modeller hata matrisi analizi ile de değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda GA ile kontrol grupları arasında duyarlılık %68, özgüllük %72 ve doğruluk %70 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu durum şaşırtıcı bulunmuştur

çünkü hastalıkla birlikte ifadesi değişen herhangi bir parametrenin (örneğin, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-27a-3p hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-350-5p vb.) tedavi ardından sağlıklı kontrol bireylerde bulunan normal seviyelerine ulaşması beklenir (Singh vd., 2016). Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri naif RRMS hastalarında kontrollere kıyasla yüksektir ($P=.002$). Tedavi etkisi ile, GA tedavisi alan RRMS hastalarında bu seviyelerin naif RRMS hastalarına kıyasla düşük olması beklenmektedir ve bu azalma gerçekleşmiştir; ancak yeterli düzeyde bir düşüş görülmemiştir ($P>.99$). Elde ettiğimiz bu sonucun olası nedenleri şu şekilde açıklanabilir:

GA' nın miyelin antijenleriyle rekabet ettiği ve MHC sınıf 2'ye bağlandığında gerçekleşen mekanizmalar sonucunda, MBP'ye özgü T-hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği yarışmalı inhibisyon ortamında bulunan çeşitli bağışıklık hücreleri ve etkileri, sağlıklı kontrollerde olduğundan farklı olabilir. Dolayısıyla, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-181d-3p seviyelerinin görülmesi, GA tedavisi ile, doğal, adaptif bağışıklık ve GA-spesifik T hücrelerinin kompozisyonundaki değişiklikler sonucunda birbirini izleyen mekanizmalara bağlı olabilir ve bu konu bölüm 4.3.6'da incelenmiştir. GA tedavisi alan hastalarda hsa-miR-181d-3p seviyelerinin kontrol bireylere kıyasla daha yüksek olması GA'nın farmakodinamik etkisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilerle birlikte yorumlanıp geniş bir perspektifte sunulabilir ve yeni çalışmalarla GA'nın moleküler düzeydeki tedavi mekanizması aydınlatılabilir.

4.3.1.3. Plazma IFN-gama konsantrasyonu ve RRMS tanı ve tedavi biyobelirteci olma potansiyeli

Bu çalışmada MS'teki ikili rolü bilinen IFN-gama plazma seviyeleri incelenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, IFN-gama'nın CD4 ve CD8 T hücreleri ile NK hücreleri tarafından salgılandığı ve enflamatuvar yolda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Link vd., 1994; Young ve Hodge, 2003; Simpson vd., 2015). Ancak, Arellano ve arkadaşlarının (2015) yaptığı EAE hayvan deneyi çalışması, sistematik olarak veya doğrudan MSS'ye enjekte edilen IFN-gama'nın, ilginç bir şekilde klinik semptomlarda iyileşme sağladığını göstermiştir. Ayrıca, IFN-gama'nın Th17 efektör hücrelerini inhibe ettiği ve NO üretimini artırarak CD4+ T hücrelerinin doğrudan proliferasyonunu engellediği gözlemlenmiştir (Tsareva vd, 2011; Villalba vd., 2020).

Bununla birlikte, IFN-gama veya IFN-gama reseptörünün eksikliği, beyinle ilişkili hasarı düşündüren atipik EAE semptomları olan ataksi, distoni ve spastisite gibi semptomların gelişmesine neden olmuştur. EAE gelişimi sırasında, MSS'de IFN-gama'nın hem enflamatuar bir etkiye sahip olduğunu gösteren veriler hem de nöroprotektif bir aktivite sergilediği gözlenmiştir (Lees ve Cross, 2007; Melnikov vd., 2020; Wagner vd., 2020).

Farelerde bıçak yarası oluşturarak kortikal nöronların hayatta kalması üzerinde IFN-gama ve IL-1 β 'nın etkisinin incelendiği bir çalışmada, hem IFN-gama hem de IL-1 β 'nın astrogliozu indüklediği ve bıçak yarası beyin hasarında kortikal nöronların hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir. IFN-gama ve IL-1 β 'nın, astrositleri ve mikrogliayı aktive ettiği ve her ikisinin de beyinden türetilen nörotrofik faktör (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), seviyelerini artırarak ($P<.001$) nöronal hayatta kalmaya katkıda bulunduğu görülmüştür (Basset vd., 2020). Bu veriler, IFN-gama'nın MS patogeneğinde karmaşık bir rol oynadığını ve hem enflamatuar hem de nöroprotektif etkiler sergileyebildiğini göstermektedir.

Bir EAE hayvan modeli çalışmasında, EAE başlangıcından önce fare *IFNG* geni ile tasarlanan bir vektörle tedavi edilen fareler, boş vektörle tedavi edilen kontrol fareleri ile kıyaslanmıştır. *IFNG* geninin bulunduğu vektörle tedavi edilen farelerde hastalığın daha erken başladığı ancak daha hafif bir seyir gösterdiği görülmüştür. Ek olarak, IFN-gama ile tedavi edilen farelerin %83'ü bağışıklamadan sonraki 25 gün içinde tamamen iyileşirken, kontrol fareleri bağışıklamadan sonraki 60. güne kadar iyileşmemiştir. EAE başlangıcından sonraki 1 hafta içinde IFN-gama içeren vektörle tedavi edilen fareler, vektör enjeksiyonundan sonraki 25 gün içinde kısmen hastalıktan kurtulurken kontrol farelerin kötüleştiği rapor edilmiştir. Bu çalışma, IFN-gama'nın EAE'deki hastalık evresine özgü ikili rolünü yansıtmaktadır: başlangıç aşamasında patogenezi teşvik ederken ilerleyen aşamalarda immün baskılamayı teşvik etmektedir. Literatürde bu duruma IFN-gama paradoksu denmektedir. Başlangıç fazı sırasında *IFNG* gen vektörünün sisteme dâhil edilmesi, hastalığın daha erken başlamasını ve ardından iyileşmesini tetiklemektedir (Furlan vd., 2001). Ayrıca, Naves ve arkadaşları IFN-gama reseptör protein geni olan *IFNGR*'nin eksik olduğu farelerin, yabancıl tip (wild type, WT) *IFNGR* farelerine kıyasla gecikmiş hastalık başlangıcı ve ardından daha şiddetli bir kronik faz sergilediğini göstermiştir (Naves vd., 2013).

Proteazomlar, hücre içi proteinlerin parçalanmasından sorumlu büyük protein kompleksleridir. Birincil insan astrositlerinin kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada, 48 saat boyunca IFN-gama stimülasyonunu takiben immünproteazom (IP) transkript seviyelerinde artış görülürken ($P < .0001$); azalmış ROS ($P < .0001$) ve oksidatif hasara uğramış ve poli-ubikitinlenmiş protein birikimi ($P < .001$) tespit edilmiştir. Devamında, yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, astrositlerdeki IFN-gama sinyalinin IP'nin yukarı regülasyonuna yol açarak kronik EAE şiddetini azalttığı gösterilmiştir ($P < .0001$). Bu çalışma kronik nöroenflamasyonda IFN-gama'nın koruyucu rolünü ortaya koymakla birlikte MSS otoimmünitesi sırasında IP'nin astrositlerde bulunan yeni fonksiyonunu tanımlamıştır (Smith vd., 2020). Yaşlanmanın bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri, kemik iliği ve timusta azalmış B ve T hücreleri üretimi ve sekonder lenfoid dokularda olgun lenfositlerin azalmış işlevini içeren birçok düzeyde kendini göstermektedir. T hücrelerinin sayısındaki düşme ve işlevindeki yavaşlama sonucunda IFN-gama seviyelerinde yaşa bağlı bir şekilde azalma gözlenmektedir (Zhang vd., 2020; Yen vd., 2000 ve Abb ve Deinhardt, 1984).

Karşılaştırılan gruplar farklı yaş dağılımlarına sahip olduğunda ve hastalık riski veya sonuç yaş grupları arasında değişiklik gösterdiğinde yaş, karıştırıcı faktör (confounding factor) olmaktadır (Hankey vd., 2000). Bu tez çalışması kapsamında bu durumun önlenmesi için lineer regresyon analizi kullanılarak plazma IFN-gama seviyeleri yaşa göre düzenlenmiştir (Aickin vd., 1996; Ciolino vd., 2013). Yaş farkının elimine edildiği IFN-gama plazma seviyeleri elde edilmiş ve bu veriler ile analizlere devam edilmiştir. Çalışmamızda, plazma IFN-gama seviyesi GA tedavisi alan RRMS hastalarının ve naif RRMS hastalarının plazma örneklerinde incelenerek birbirleri ile ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalamasının, GA grubundaki hastalarda 1.28 ± 0.08 pg/mL, naif grubundaki hastalarda 1.30 ± 0.06 pg/mL ve kontrol grubundaki bireylerde 1.34 ± 0.04 pg/mL olduğu görülmüştür ($P = .001$). GA ve naif grubundaki hastaların plazma IFN-gama seviyesinin kontrollere kıyasla önemli derecede düşük olduğu görülmüştür (GA - kontrol: $P = .001$ ve naif - kontrol: $P = .03$). GA ile naif grubu arasında plazma IFN-gama konsantrasyonu yönünden önemli bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca, lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Tedaviye yeni

başlayan hastalardan, ilaç kullanımından önce ve sonra olmak üzere belirli periyotlarla; serum-plazma örneklerinin toplanması ardından elde edilen plazma IFN-gama seviyelerinin ve EDSS, MSSS puanlarının birlikte incelenmesi ile tedavi sürecinin takibi gerçekleştirilerek hastaların tedaviye uyumu gözlenebilir. Çalışmamızın devamında, yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama'nın tanısal değerini test etmek için, ROC eğrisi grafikleri çizdirilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin, naif hastalar kontrollerle kıyaslandığında “orta” ($AUC=0.726$, $P=.03$, duyarlılık=%68, özgüllük=%76 ve kesme değeri=1.33 pg/mL) dereceli bir tanı testi olabileceği görülmüştür.

ROC analizlerinde anlamlı ölçüde sonuç veren bu model, hata matrisi analizi ile de değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda naif hasta ile kontrol grubu arasında duyarlılık %68, özgüllük %72 ve doğruluk %70 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu analizlere göre, hasta plazma örneklerinde bulunan düşük yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri RRMS alt tipini sağlıklı kontrollerden ayıran bir özellik olması yönüyle tanısal değeri ‘orta’ olan potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan unutulmamalıdır ki, IFN-gamma proteininin hastalık evrelerine özgü rolleri henüz tam aydınlatılmamıştır. Ayrıca, adjuvan içinde miyelin türevli antijenlerle immünizasyon yoluyla veya aktive edilmiş miyeline özgü T hücrelerinin adaptif transferi yoluyla oluşturulan EAE modellerinde IFN-gama paradoksu hala tam olarak çözülmemiştir (Merril vd., 1992; Furlan vd., 2001; Lees vd., 2008; Chen vd., 2009; Jagessar vd., 2012). MS gidişatındaki evrelerin IFN-gama ile ilişkisinin değerlendirilmesi için daha fazla araştırma ve çalışma gerekmektedir. GA tedavisinin IFN-gama seviyesi üzerindeki etki mekanizması hala bilinmezliğini sürdürmektedir. Çalışmamızda yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyelerinin, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha az olduğu görülmüştür (GA - kontrol: $P=.001$). Bu durum şaşırtıcı bulunmuştur çünkü hastalıkla birlikte ifadesi değişen herhangi bir parametrenin tedavi ardından sağlıklı kontrol bireylerde bulunan normal seviyelerine ulaşması (Singh vd., 2016) beklenmektedir. Çalışmamızda yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri naif RRMS hastalarında kontrollere kıyasla düşüktür ($P=.03$). GA tedavisi alan RRMS hastalarında, naif RRMS hastalarına kıyasla, tedavi etkisiyle artması beklenen yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonlarında bu artış

görülmemiştir. Bulguların ROC analizleri yapıldığında GA tedavisi alan hastalar kontrollerle kıyaslandığında “iyi” ($AUC=0.797$, $P=.001$, duyarlılık=%68, özgüllük=%88 ve kesme değeri=1.30 pg/mL) dereceli bir ayırım yaptığı görülmüştür. ROC analizlerinde anlamlı ölçüde sonuç veren modeller hata matrisi analizi ile değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda GA ile kontrol grupları arasında duyarlılık %68, özgüllük %88 ve doğruluk %78 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu konu bölüm 4.3.6’da incelenmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin EDSS ve MSSS puanları ile ilişkileri istatistiksel analizlerle incelenmiştir. GA tedavisi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının plazma hsa-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS grupları arasında; yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS grupları arasında karşılaştırılmış, anlamlı bir fark bulunmamıştır. Plazma IFN-gama seviyesi ve miRNA ekspresyon seviyelerine bakarak, bu kişilerin GA ile tedaviye uyum durumunun incelenmesi açısından, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta düzey ($EDSS > 3$) EDSS; yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre gruplandırılan RRMS hastalarının plazma hsa-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu, hasta grupları arasında karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır. Lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi arasında bir ilişki bulunamamıştır.

GA grubunda yapılan korelasyon analizleri sonucunda, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ile EDSS ($\rho=-.520$ ve $P=.008$), hastalık süresi ($\rho=-.596$ ve $P=.002$) ve tedavi süresi ($\rho=-.623$ ve $P=.001$) arasında negatif korelasyon görülmüştür. Bu bulgumuz Naves ve arkadaşlarının (Naves vd., 2013) ve Furlan ve arkadaşlarının (Furlan vd., 2001) çalışmalarında bahsedildiği gibi, IFN-gama'nın hastalık sürecinde immün baskılamayı tetikleme özelliği olduğunu desteklemektedir. Daha detaylı bakılacak olursa, çalışma grubumuzda IFN-gama seviyesi naif hasta ve GA gruplarında kontrollere kıyasla daha düşük olduğu için hastalarda yeterince immün baskılamamanın yapılamadığı, bu nedenle de engellilik puanlarında ilerleme yaşandığı yorumu yapılabilir.

Bu çalışmada, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesine bakarak, bu kişilerin GA ile tedaviye uyum durumu yorumlanabilir: GA tedavisi alan RRMS hastalarında, tedaviye rağmen hastalığın ilerleyen aşamalarında immün baskılamayı teşvik ettiği bilinen IFN-gama'nın (Furlan vd., 2001; Naves vd., 2013; Lees ve Cross, 2007; Melnikov vd., 2020; Wagner vd., 2020) yükselmemesi, MSSS puanlarının artması ($P=.001$) ve EDSS puanlarının iyiye gitmemesi, bu hastaların GA tedavisine yanıtızlığını gösteriyor olabilir. Çalışmada gerçekleştirilen diğer lojistik regresyon analiz sonuçlarına göre, GA - naif grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, total lezyon sayısının, GA tedavisi ile, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.116$, $CI=1.028-1.213$ ve $P=.009$); lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 1.1 kat ($OR=1.117$, $CI=1.031-1.211$ ve $P=.007$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren modellerde yaklaşık 1.11 kat ($OR=1.110$, $CI=1.023-1.204$ ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.118$, $CI=1.031-1.213$ ve $P=.007$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Kontrast tutan lezyon sayısı GA tedavisi ile, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 0.39 kat ($OR=0.392$, $CI=0.195-0.787$ ve $P=.009$); lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 0.44 kat ($OR=0.444$, $CI=0.239-0.827$ ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren modellerde yaklaşık 0.41 kat ($OR=0.410$, $CI=0.205-0.819$ ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 0.45 kat ($OR=0.453$, $CI=0.247-0.831$ ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yeni bir çalışma tasarımıyla GA tedavisi alacak naif hastalardan tedavi öncesi ve sonrası serum-plazma örnekleri alındıktan sonra bu iki grup arasında yapılan karşılaştırma analizleriyle, bu kişilerin GA ile tedaviye uyum durumu incelenebilir. Çalışma grubumuzda bulunan, Naif RRMS hastaları ile GA tedavisi alan RRMS hastaları arasında bulunan farmakokinetik ve farmakodinamik farklılıklar, bu çalışma dizaynı sayesinde, tedavi öncesi ve sonrası yapılacak çalışmalarla tek bir hastadan elde edilen verilerin toplamı sonucunda elimine edilmiş olacaktır.

Çizelge 3.4: Plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölâtif ekspresyon seviyesinin ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun ROC analizleri ve hata matrisi sonuçları.

	ROC analizi sonucu				Duyarlılık (Sensitivity)		Özgüllük (Specificity)		Doğruluk (Accuracy)
Gruplar	AUC	CI (%95)	P	Kesme değeri	ROC	Hata matrisi	ROC	Hata matrisi	Hata matrisi
hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	0.822 (İyi)	0.70-0.95	<.001	1.77	%92	%92	%72	%72	%82
hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	0.751 (Orta)	0.61-0.90	.01	1.57	%84	%84	%68	%68	%76
hsa-miR-181d-3p rölâtif ekspresyon seviyesi (GA - Kontrol)	0.717 (Orta)	(0.57-0.86)	.05	2.32	%68	%68	%72	%72	%70
hsa-miR-181d-3p rölâtif ekspresyon seviyesi (Naif - Kontrol)	0.759 (Orta)	(0.62-0.90)	.002	3.06	%68	%68	%84	%84	%76
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (GA - Kontrol)	0.797 (İyi)	(0.67-0.93)	.001	1.30	%68	%68	%88	%88	%78
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu (Naif - Kontrol)	0.726 (Orta)	(0.58-0.87)	.03	1.33	%68	%68	%76	%72	%70
miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri (GA - Kontrol)	0.806 (İyi)	(0.69-0.93)	<.001	0.34	%86	%84	%64	%64	%74
miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri (Naif - Kontrol)	0.779 (Orta)	(0.65-0.91)	.001	0.35	%76	%76	%72	%72	%74
AUC: Area Under the Curve									

4.3.3. *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri ile ilişkileri

IFNG rs2069727 T/C genotipleri ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin birlikte analizi sonucunda, genotiplere göre ayrılan naif RRMS hastaları ve kontrol bireyler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Devamında, IFN-gama seviyesinin TC genotipli GA tedavisi alan RRMS hastalarında kontrol grubundaki bireylere göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu ($P=.01$) görülmüştür. TT ve CC genotipli GA tedavisi alan RRMS hastaları ve kontrol grubundaki bireyler arasında anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. Bu durum, plazma IFN-gama seviyesinin GA kullanımı ile kontrole yakınsamama sebebinin heterozigot genotiple ilişkili olabileceğinden kaynaklanıyor olacağı gibi, çalışmamızda yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi ölçülen kontrol grubu içerisinde rs2069727 TT genotipine sahip sadece iki kişi ve CC genotipine sahip sadece iki kişi olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin ve *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin, hastalıkla ve tedavi ile ilişkileri istatistiksel analizlerle incelenmiştir. Naif grubunda bulunan TT genotipli bireylerin plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($\rho=.886$ ve $P=.02$) görülmüştür. Tüm grup, naif ve kontrol gruplarında bulunan TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında görülen pozitif korelasyonun (sırası ile, $\rho=.585$, $P<.001$; $\rho=.672$, $P=.006$; $\rho=.606$ ve $P=.004$) aksine, GA grubunda, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında korelasyon bulunmamıştır ($\rho=.346$ ve $P=.25$). Bu analiz sonucunda, çalışma grubundaki TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasındaki pozitif korelasyon, GA kullanımı ile birlikte anlamlılık değerini yitirmiştir. Yeni bir çalışma tasarımıyla GA tedavisi alacak naif hastalardan tedavi öncesi ve sonrası serum-plazma örnekleri alınarak serum-plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon incelenebilir.

Çalışmamızda, *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu üzerinde etkilerinin olup olmadığı incelenmek istenmiştir. Kontrol grubu, GA tedavisi alan ve naif RRMS hastalarında ayrı ayrı olmak üzere *IFNG* rs2069727 T/C polimorfizmi açısından farklı genotiplere sahip bireyler arasında yapılan yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırmalarında gruplar arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Çalışmamızda, rs2069727 SNP'si ile plazma IFN-gama ekspresyonu arasında bir ilişki olmadığını görülmüştür. Diğer taraftan, ABD'li, Kuzey İrlandalı ve Belçikalı 861 MS hastası ve 843 kontrol bireyi içeren bir grupta, *IFNG* rs2069727 G haplotipi taşıyıcıları, yüksek *IFNG* mRNA ifadesiyle ($P=.04$) ilişkilendirilmiştir (Kantarci vd., 2008).

Ayrıca IFN-gama ekspresyon seviyesini etkileyen başka faktörler de literatürde belirtilmiştir: *IFNG* geninde ilk intronda bulunan +874A/T (rs2430561) SNP'sinin, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) bağlanma bölgesi olduğu ve IFN-gama protein seviyesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Zhang ve diğerlerinin 2018'de yaptığı bir çalışmada, serum IFN-gama seviyelerinin *IFNG* +874 TT taşıyıcılarında AT ($P<.05$). ve AA ($P<.05$) taşıyıcılarına kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2018). Ayrıca, *IFNG* geninin 3'UTR bölgesinde bulunan *IFNG* +2109A/G SNP'sinin plazma IFN-gama seviyeleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, *IFNG* +2109 AA taşıyıcılarının, AG taşıyıcılarına kıyasla daha yüksek plazma IFN-gama seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir ($P<.05$) (Peresi vd., 2013). Bir başka faktör olarak hsa-miR-223'ün, IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin inhibisyonu yoluyla IFN-gama ekspresyonunu pozitif bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir ($P<.001$) (Dorhoi vd., 2013). Diğer çalışmalarda ise, hsa-miR-146a ve hsa-miR-146b'nin her ikisinin de *IFNG* promotörünün fonksiyonu için önemli olan TRAF6 ve IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) protein ekspresyonunun aktivitesini baskılayarak IFN-gama ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir ($P<.01$) (Park vd., 2015).

Genetik varyantlar ve miRNA'lar IFN-gama'nın ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyebilir. Bu durumu destekleyen başka bir çalışmada, miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak *IFNG* mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Çalışmamızda bu çalışmayı destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamıza göre MS hastalığıyla birlikte ekspresyon seviyesi anlamlı derecede artan hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p, Fayyad-Kazan ve arkadaşlarının çalışmasında bahsedildiği gibi, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak post-transkripsiyonel düzenlenmesini negatif yönde etkiliyor olabilir. MS hastalığıyla birlikte plazma IFN-gama seviyelerinin anlamlı derecede azalması bunun bir sonucu olarak yorumlanabilir. Bu ilişkilerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için daha kapsamlı deneysel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.3.4. IFN-gamma, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinin ve bu seviyeleri etkileyen diğer faktörlerin RRMS'teki rolü

hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin çalışmamıza konu olan hedef bölgesi, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR'sinde yer almaktadır (Fayyad-Kazan vd., 2014). Fayyad-Kazan vd. tarafından yapılan çalışmada miR-24-3p'nin ve miR-181d-3p'nin *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde bulunan hedef bölgesine bağlanarak IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Bizim çalışmamızda, *IFNG* geninin 3' UTR bölgesine bağlanan, hastalıkla birlikte artan hsa-miR-24-3p (kontrollere kıyasla, $P=.01$) ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinin (kontrollere kıyasla, $P=.002$) IFN-gama protein seviyesini negatif yönde düzenlediği gösterilmiştir. Çalışmamızda, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin, plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin medyan değeri ayrı ayrı sınır değeri olarak belirlenmiş olup bu değere göre 2 ayrı grup oluşturulmuştur. Medyan değer üzerindeki seviyeler için yüksek; medyan değerine eşit veya bu değerlerin altındaki konsantrasyon veya ekspresyon değerleri için ise düşük ifadesi kullanılmıştır. Sınır değerlerine göre parametrelerin birbirleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

miRNA çalışma grubunun yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun medyan değeri olan 1.311 pg/mL, sınır değeri olarak belirlenmiştir. Tüm gruptaki, GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL ve IFN-gama > 1.311 pg/mL grupları arasında karşılaştırılmıştır. Tüm grupta yapılan analizde, düşük IFN-gama (IFN-gama ≤ 1.311 pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi yüksek IFN-gama (IFN-gama > 1.311 pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinden daha fazla çıkmıştır.

($P=.02$). Bu durumda, hsa-miR-24-3p artışı doğrudan veya dolaylı bir şekilde Şekil 4.1'de gösterilen etkileşimlerle ve bu etkileşimlere ek olarak henüz bilinmeyen mekanizmalar sonucu IFN-gama protein seviyesini negatif yönde etkilemektedir. Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, tüm grupta, GA, naif ve kontrol grupları içinde, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311 \text{ pg/mL}$) ile yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311 \text{ pg/mL}$) karşılaştırması sonucu anlamlı bir fark bulunmamıştır.

miRNA çalışma grubu, rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.61 ve > 2.61 olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Tüm gruptaki ve GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin, rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.61 ve > 2.61 grupları arasında karşılaştırılması yapılmıştır. Tüm grupta yapılan analizde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-24-3p ($\text{hsa-miR-24-3p} \leq 2.61$) ile yüksek hsa-miR-24-3p ($\text{hsa-miR-24-3p} > 2.61$) grupları arasında karşılaştırılmış, anlamlı bir fark bulunmamıştır. Düşük ve yüksek rölatif hsa-miR-24-3p plazma ekspresyon seviyesine sahip bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri ayrı ayrı olmak üzere GA, naif ve kontrol gruplarında karşılaştırılmış anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

miRNA çalışma grubu rölatif hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.90 ve > 2.90 olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Tüm gruptaki ve GA, naif ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin rölatif hsa-miR-181d-3p plazma ekspresyon seviyesi ≤ 2.90 ve > 2.90 grupları arasında karşılaştırılması yapılmıştır. Tüm grupta yapılan analizde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} \leq 2.90$) ile yüksek hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} > 2.90$) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük hsa-miR-181d-3p (≤ 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalaması yüksek hsa-miR-181d-3p (> 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalamasından daha fazla çıkmıştır ($P=.02$). Bu durum Şekil 4.1'de gösterilen etkileşimlerle birlikte yorumlanırsa, hsa-miR-181d-3p doğrudan veya dolaylı bir şekilde IFN-gama protein seviyesini negatif yönde etkilemektedir. Düşük plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesine (≤ 2.90) sahip bireylerin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, GA grubundaki hastalar, naif grubundaki

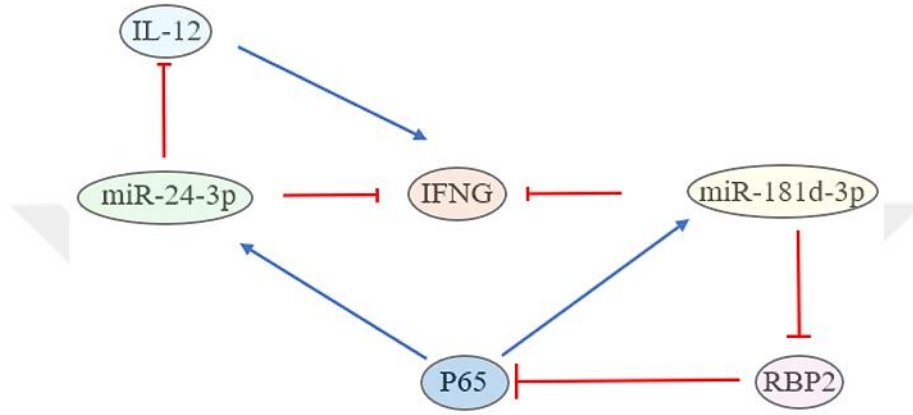
hastalar ve kontrol grubundaki bireylerin oluşturduğu 3 grup arasında karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark elde edilmiştir ($P=.04$). Ancak gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin bağışıklık tepkisinin kontrolünde ve kronik enflamatuvar süreçte çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. NF- κ B ailesinin beş üyesi (p50, p52 ve p65 (v-rel avian retiküloendotelyoz viral onkogen homolog A, Rel A)), c-Rel ve Rel B) memeli hücrelerinde, çeşitli genlerin ekspresyonunu farklı şekilde düzenleyebilir (Karin ve Ben-Neriah, 2000; Hoesel ve Schmid, 2013; Zhang vd, 2017). RRMS'de, MSS'ye sızan bağışıklık hücrelerinde NF- κ B'nin p65 alt biriminin miktarının arttığı hem beyin dokusunda hem de PBMC'lerde NF- κ B ile ilgili genlerin yukarı regüle edildiği rapor edilmiştir (Bonetti ve diğerleri, 1999; Flores ve diğerleri, 2003; Achiron ve diğerleri, 2007; Eggert ve diğerleri, 2008). Ayrıca başka bir çalışmada, p65'in aşırı ekspresyonunun hsa-miR-181d-3p ekspresyonunu önemli ölçüde yukarı regüle ettiği ($P<.05$) ve p65 inhibisyonunun, hsa-miR-181d-3p ifadesini büyük ölçüde aşağı doğru düzenlediği ve hsa-miR-181d promotör aktivitesini bastırdığı ($P<.01$) gösterilmiştir. Yine bu çalışmada, hsa-miR-181d-3p'nin p65'i geri beslemeli bir mekanizma ile inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Zhou vd., 2021). Ek olarak, Zu ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, p65'in hsa-miR-23a, hsa-miR-27a ve hsa-miR-24 ifadesini yukarı doğru düzenlediği gösterilmiştir ($P<.05$) (Zu vd., 2018). Tüm bu çalışmalar ve bizim çalışmamız birlikte yorumlandığında, RRMS ile birlikte artan p65 seviyeleri yüksek hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerine sebep olabilir. Bu durum IFN-gama konsantrasyonunun düşüşünde dolaylı bir şekilde rol oynuyor olabilir.

Retinol bağlayıcı protein 2 (RBP2), p65'i inhibe eden bir proteindir. hsa-miR-181d-3p aşırı ekspresyonunun RBP2 ekspresyonunu doğrudan inhibe ettiği, düşük RBP2 seviyelerinin ise p65'in ekspresyonunu baskılayamadığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2021). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda RRMS hastalarında kontrollere kıyasla daha yüksek ifade edilen hsa-miR-181d-3p seviyeleri, RBP'nin inhibisyonunu sağlayarak p65 üzerinden hsa-miR-24-3p ekspresyonunu dolaylı bir şekilde etkiliyor olabilir.

IL-12, IFN-gama proteinini yukarı yönde düzenleyen bir sitokindir. PBMC'lerde izole edilen CD14 monositleri ile oluşturulan *in vivo* kültür çalışmasında, hsa-miR-24-

3p'nin aşırı ekspresyonunun, TNF- α ($P<.001$), IL-6 ($P<.001$) ve IL-12 ($P<.001$) sitokinlerini aşağı yönde düzenlediği bulunmuştur (Afsar ve Nares, 2015). IL-12'nin hsa-miR-24-3p ile negatif yönde düzenlendiği bilgisi, bizim çalışmamızdaki verilerle birlikte yorumlandığında, RRMS hastalarında, kontrollere kıyasla yüksek seviyelerde ifade edilen hsa-miR-24-3p, *IFNG* mRNA'sını doğrudan hedef alarak inhibe edebileceği gibi, IL-12 sitokin seviyesini negatif yönde düzenleyerek düşük IFN-gama seviyelerine yol açabilir.



Şekil 3.1: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p ve IFN-gama seviyelerini etkileyen/seviyelerinden etkilenen moleküler faktörler (Literatürdeki verilere göre oluşturulan bu ağda mavi ok, yukarı regülasyonu; kırmızı gösterge ise ekspresyon seviyesinin baskılandığını temsil etmektedir).

4.3.5. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin tek bir parametre olarak değerlendirilmesi

Bu çalışmada, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyeleri ve plazma IFN-gama konsantrasyonunun bir arada tek bir parametre olarak değerlendirilerek analiz edilmiştir. hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisi olup olmadığı hesaplanmış, bu parametrelerin bir arada tanısallık performansının tespit edilmesi için ROC analizi yapılmış ve hata matrisi çizilmiştir. ROC analizi sonucunda, tek bir parametre olarak değerlendirilen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyeleri ve plazma IFN-gama konsantrasyonunun, GA tedavisi alan RRMS hastalarını kontrollerden ayırmak için “iyi” ($AUC=0.806$, $P<.001$, duyarlılık=%86,

özgüllük=%64 ve kesme değeri=0.34), naif RRMS hastalarını kontrollerden ayırmak için “orta” (AUC=0.779, $P=0.001$, duyarlılık=%76, özgüllük=%72 ve kesme değeri=0.35) dereceli bir test olduğu görülmüştür. GA tedavisi alan RRMS hastalarını kontrollerden ayırmak için, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu parametreleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde (AUC=806, iyi), ayrı parametreler olarak değerlendirilen hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesine (AUC=0.717, orta) ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonuna (AUC=797, iyi) göre daha iyi bir ayırım gücü elde edilmişken; hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi parametresine (AUC=0.822, iyi) göre ise daha düşük bir ayırım gücü elde edildiği görülmüştür. Bu veriler, GA’nın farmakodinamik etkisinin inceleneceği birçok çalışma için potansiyel araştırma konusu olarak daha büyük gruplarda incelenebilir.

Naif RRMS hastalarını kontrollerden ayırmak için, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu parametreleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde, ayrı parametreler olarak ele alındığından daha iyi bir (AUC= 0.779, orta) diagnostik güç elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Ayrıca naif - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde lipid parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.13 kat (OR=1.127, CI=1.021-1.245 ve $P=0.02$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, MS tanısında plazmadaki IFN-gama seviyesinin, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin önemli role sahip olabileceği görülmüştür. Plazmadaki hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p’nin rölatif ekspresyon seviyesindeki artışın ve IFN-gama seviyesindeki düşüşün MS oluşum mekanizmalarına etkisinden söz edebileceği gibi, başka bir bakışla, plazmadaki hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin artmasına; IFN-gama seviyesinin ise azalmasına MS oluşum mekanizmalarının etki edebileceği de söylenebilir.

4.3.6. IFN-gama hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p GA-kontrol arası karşılaştırma sonuçları

GA tedavisinin, tipik bir hastalığı modifiye edici tedaviye kıyasla periferik bağışıklık tepkisini bastırmak yerine, koruyucu etkisiyle hem periferik hem de merkezi immün yanıtları geliştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca, immünojenik veya immünomodülatör etkisinin yanında nöroprotektif bir etki içerdiği de gösterilmiştir. Aktive edilmiş GA-reaktif Th2 hücrelerinin sadece IL-4, IL-5, IL-13 ve TGF- β gibi koruyucu Th2 sitokinlerini değil aynı zamanda insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), IGF-2 ve BDNF gibi koruyucu nörotrofik faktörleri de ürettiği gösterilmiştir. Nöronal ve glial hücre farklılaşması ve hayatta kalması ve aksonal koruma için kritik rollere sahip olan BDNF üretimi genellikle sinir hücreleri ve bazı glial hücreler tarafından gerçekleştirilir. Th2 hücreleri, genellikle sitokinler aracılığıyla bağışıklık tepkilerini düzenleme ve alerjik yanıtlara katkıda bulunma rolüne sahiptir, BDNF üretme kapasitesine sahip değildir (Sundqvist vd., 2010). GA ile indüklenen Th2 hücrelerinin sitokin profilleri ile sağlıklı kontrol bireylerin Th2 hücrelerinin sitokin profillerinin bire bir aynı olmaması, katıldıkları hücresel mekanizmaların ve fonksiyonların farklı olmasına sebep olabilir. Dolayısı ile, Th2 hücrelerinden salınan sitokin profillerindeki farklılıklar, henüz bilinmeyen mekanizmalar sonucunda bir protein ve/veya mRNA ve/veya miRNA profilinin, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla farklı seviyelerde ifade edilmesinde rol alabilir.

GA tedavisinin hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyesi üzerindeki etki mekanizması daha kapsamlı bir bakış açısı ile değerlendirilecek olursa, GA güdümlü antienflamatuar T hücrelerinin, yalnızca Th2 hücrelerini değil aynı zamanda Tip 1 düzenleyici hücrelerini (Type 1 regulatory cells; Tr1) ve Treg hücrelerini de içerebilir (Stern vd., 2008; Tsareva vd., 2011; Sheremata ve Campos, 2016; Ganji vd., 2020). Ayrıca, GA'nın MHC sınıf 2'ye bağlanmak için miyelin antijenleriyle rekabet ettiği ve bağlandığında gerçekleşen mekanizmalar sonucunda, MBP'ye özgü T-hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği bu yarışmalı inhibisyon ortamında bulunan çeşitli bağışıklık hücreleri ve etkileri, sağlıklı kontrollerde olduğundan farklı olabilir. GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-24-3p seviyelerinin görülmesi, GA tedavisi ile, doğal, adaptif bağışıklık ve GA-spesifik T hücrelerinin kompozisyonundaki değişiklikler sonucunda birbirini izleyen

mekanizmalara bağılı olabilir. Ek olarak, GA'nın karmaşık patofizyolojik ortama yarışmalı inhibisyon ile dâhil olması, kompleks MS doğasına yeni bir boyut kazandırmaktadır. GA'nın T hücrelerine sunumu ile gelişen, sağlıklı hücrelerde bulunmayan GA-spesifik T hücrelerinin ürettiği sitokinler ve katıldığı mekanizmalar hesaba katıldığında, tedavi ile hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinde geline noktanın sağlıklı kontrollere yakınsamaması normal bir durum olarak görülebilir. Diğer yandan, hsa-miR-24-3p'nin T hücrelerinin proliferasyonunu ve Th1 ve Th17 farklılaşmasını düzenlediğini gösteren çalışmalar değerlendirildiğinde (Podshivalova ve Salomon, 2013; Fayyad-Kazan vd., 2014; Pua vd., 2016) GA tedavisi alan hastalarda, hsa-miR-24-3p seviyeleri, GA-spesifik T hücre farklılaşmasında rol oynuyor olabilir. Ek olarak, hsa-miR-181d'nin T hücrelerinin olgunlaşma ve seleksiyon süreçlerini düzenleyen IL-6 ve lenfosit indükleyen faktör (LIF) gibi sitokinlerin ifade seviyelerini etkilediği (Service ve Chen, 2008; Belkaya vd., 2011) bilindiğinden, GA tedavisi alan hastalarda, hsa-miR-181d-3p seviyeleri, GA-spesifik T hücre farklılaşmasında rol oynuyor olabilir yorumu yapılabilir.

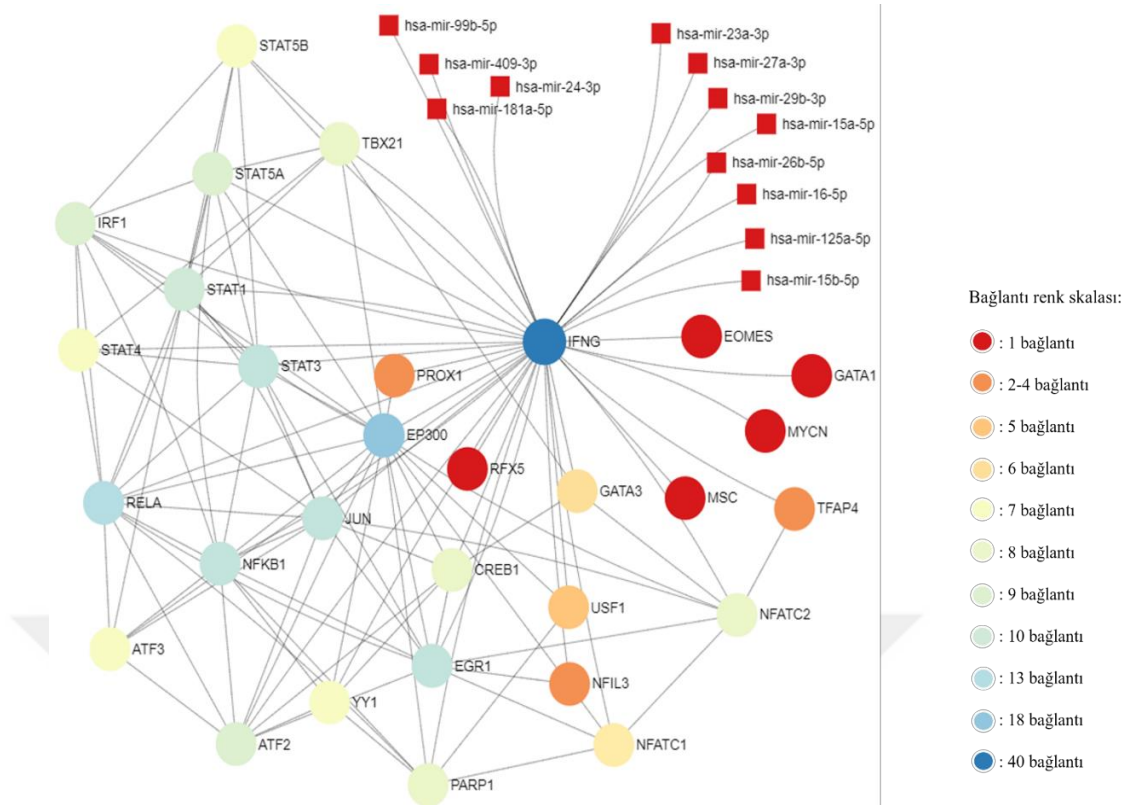
GA terapisi boyunca ekspresyon seviyesi değişen genlerin incelendiği bir çalışmada, C-X-C motif kemokin ligand-9 (C-X-C motif chemokine ligand-9; *CXCL-9*), *CXCL-10*, vasküler hücre yapışma molekülü 1 (vascular cell adhesion molecule 1; *VCAM1*), proopiyo-melano-kortin (proopiomelanocortin; *POMC*), oksitosin (*OXC*) ve *CD38* genlerinin yukarı düzenlenmiş; *CD34* ve protein tirozin fosfataz reseptör Tip C (*PTPRC*) genlerinin ise aşağı düzenlenmiş majör genler olduğu gösterilmiştir (Benecke vd., 2014). Net cevaplar için, GA tedavisi ile ekspresyonu değişen gen havuzunun genişletilmesine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç giderildikten sonra, genlerin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile ilişkilerinin incelendiği, kontrol, naif ve GA tedavi gruplarını içeren boylamsal çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bu çalışmalar GA'nın farmakodinamik etkisinin gölgede kalan yanlarına ışık tutabilir.

4.4. *In silico* -Fonksiyonel Zenginleştirme- Analizleri: *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p Etkileşim Ağı

4.4.1. IFN-gamma protein seviyesini etkileyen miRNA ve transkripsiyon faktörleri

Tez kapsamında, MiRNET veri tabanı (2.0) kullanılarak yapılan *in silico* analizler sonucunda *IFNG* genini düzenleyen miRNA ve TF'ler Şekil 4.2'de bulunmaktadır.

Protein-protein etkileşimleri gösterilen, IFN-gama protein seviyelerini etkileyen bu TF'ler çeşitli sinyal yollarında görev almaktadır. JAK-STAT sinyal yolağında: adenovirüs erken bölge 1A (early region 1A, *E1A*) ile ilişkili hücresel p300 transkripsiyonel ortak aktivatör proteini (*EP300*), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1 (signal transducer and activator of transcription 1, *STAT1*), *STAT3*, *STAT4*, *STAT5A* ve *STAT5B*; B hücre reseptörü sinyal yolağında: jun proto-onkogen, aktivatör protein 1 TF alt birimi (*JUN*), aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü 2 (nuclear factor of activated T cells 2, *NFATC2*), B hücre kappa hafif polipeptit gen güçlendirici nükleer faktörü 1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, *NFKB1*) ve *RELA* proto-onkogen NFKB alt birimi (*RELA*, *P65*); T hücresi sinyal yolağında: *JUN*, *NFATC2*, *NFKB1* ve *RELA*; MAPK sinyal yolağında: aktive edici TF 2 (*ATF2*), *JUN*, *NFATC2*, *NFKB1* ve *RELA*; eritroblastik onkogen B sinyal yolağında: *JUN*, *STAT5A* ve *STAT5B*; nörotrofin sinyal yolağında: *JUN*, *NFKB1* ve *RELA*; wnt (wingless-related integration site) sinyal yolağında: *EP300*, *JUN* ve *NFATC2*; T hücre reseptör sinyal yolağında: *ATF3*; bağışıklık sistemi sitokin sinyallemede: erken büyüme yanıt proteini 1 (early growth response protein 1, *EGR1*), IFN düzenleyici faktör 1 (IFN regulatory factor 1, *IRF1*), *NFKB1*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* ve *IFNG*; proenflamatuar sitokinlerin *TRAF6* aracılı indüksiyonunda: *ATF2*, *CREB1*, *JUN*, *NFKB1* ve *RELA*; apoptozda: *NFKB1* ve *RELA*; NK aracılı sitotoksitede: *NFATC2* ve *IFNG*; aşağı akış (down-stream) sinyal iletiminde: *CREB1*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5A* ve *STAT5B*; sinir sistemi gelişiminde: yin yang 1 (*YYL1*); NFKB sinyal yolağında: *GATA* bağlanma faktörü 1 (*GATA1*), *EOMES*, T-kutusu (T-box) TF 21 (*TBX21*) ve nükleer faktör IL-3 ile düzenlenen protein (*NFIL3*); IL-18 sinyal yolağında: *GATA1* ve poli(ADP-riboz) polimeraz 1 (*PARP1*) görev almaktadır. *ATF2*, *EP300*, *JUN*, *NFKB1*, *RELA* ve *STAT3* EBV enfeksiyonu ile aktifleşen TF'lerdir. Biyoinformatik bir çalışmada, *STAT3*, miyelositomatozis proto-onkogen (*MYC*), *JUN*, *NFKB* ve fosfataz ve tensin homologu (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*), MS duyarlılığı için aday genler olarak tanımlanmışlardır (Lou vd., 2018).



Şekil 3.2: Protein-protein etkileşimleri gösterilen, IFN-gama protein seviyelerini etkileyen TF'ler ve miRNA'lar. Gen renkleri miRNET programı tarafından bağlantı sayısına göre atanmıştır.

Şekil 4.2'de miRNET'e göre IFN-gama protein seviyesini etkileyen miRNA'lar gösterilmektedir. *IFNG* mRNA'sını hedefleyen miRNA'lar hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-99-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-23a-3p ve hsa-miR-26b-5p Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna ek olarak, hsa-miR-181d-3p'nin *IFNG* mRNA'sını hedeflediği de görülmektedir (miRPathDB). Ayrıca Fayyad-Kazan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak IFN-gama ekspresyon seviyesini negatif yönde düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Bu analizlerde bulunan bazı miRNA'lar literatürde MS ile ilintili çalışmaları yer almaktadır. hsa-miR-181a-5p'nin rölatif ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada, RRMS hastalarında kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha düşük ($P=.01$) hsa-miR-181a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. *In silico* analizler, hsa-miR-181a-5p'nin enflamasyon ve nörodejenerasyon yollarındaki *MAP2K1*, *CREB1*,

ataksin1 (*ATXN1*), *ATXN3* ve *IFNG* genlerini hedefleyerek MS patolojisine katılabileceğini göstermiştir (Edgünlü vd., 2022).

miR-99b-5p'nin omurilik yaralanmasındaki rolünü araştırmayı amaçlayan bir çalışmada, *in vivo* hayvan modelinde omurilik yaralanmasını takiben, miR-99b-5p'nin ekspresyon seviyelerinin, yukarı doğru düzenlendiği ($P<.05$) ve miR-99b-5p inhibitörünün nöronal apoptozu baskıladığı ($P<.05$) gösterilmiştir. Sonucunda, mTOR (mammalian target of rapamycin) ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla nöronal apoptozu inhibe eden potansiyel bir tedavi: miR-99b-5p inhibitörü (anti-miR-99b-5p) kullanımı önerilmiştir (Su vd., 2015). Başka bir çalışmada, remisyon dönemindeki RRMS hastalarında kontrollere kıyasla daha yüksek miR-99b-5p seviyeleri görülmüştür ($P=.02$) (Cao vd., 2017). Bu çalışma Şekil 4.2'de verilen, IFN-gama inhibisyonundan sorumlu miR-99b-5p'nin etkileşim ağındaki rolünü destekleyici niteliktedir.

Hücre farklılaşması, çoğalması, apoptoz dâhil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alan hsa-miR-23a-3p'nin MS hastalarında ve kontrollerde incelendiği bir çalışmada, MS hastalarında kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-23a-3p seviyeleri görülmüştür ($P=.01$) (Jernås vd., 2013). MS ile artan *IFNG* mRNA'sını negatif yönde düzenleyen hsa-miR-23a-3p seviyeleri hastalıkla birlikte düşen IFN-gama seviyelerini açıklamaktadır.

Hücre çoğalmasını ve apoptozunu düzenleyen hsa-miR-15b-5p'nin MS hastalarında ve kontrollerde incelendiği bir çalışmada, MS hastalarında kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-15b-5p seviyeleri görülmüştür ($P=.003$) (Santis vd., 2010). MS ile artan *IFNG* mRNA'sını negatif yönde düzenleyen hsa-miR-15b-5p seviyeleri hastalıkla birlikte düşen IFN-gama seviyelerini açıklamaktadır.

Th1 ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını inhibe eden ve oligodendrosit farklılaşmasını düzenleyen hsa-miR-27a-3p'nin ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, MS ve kontrol serum örnekleri incelenmiş, bu seviyelerin RRMS hastalarında PPMS hastalarına ($P=.01$) ve SPMS hastalarına ($P<.001$) kıyasla anlamlı derecede yüksek seviyelerde ifade edildiği görülmüştür. RRMS ile PPMS ve SPMS arasında yapılan ROC analizleri sonucunda AUC değerleri sırasıyla 0.68 ve 0.78 olarak bulunmuştur. *IFNG*'nin negatif regülatörü olan hsa-miR-27a-3p'nin hastalık seyrinin takibinde

biyobelirteç olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Hasta kontrol karşılaştırmasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (Regev vd., 2018).

Bizim çalışmamız ($P=.01$) ve Vistbakka ve arkadaşlarının çalışmasında ($P=.01$), RRMS hastalarında kontrollere kıyasla, anlamlı derecede yüksek hsa-miR-24-3p ekspresyon seviyeleri görülmüştür (Vistbakka vd., 2018). Çalışmamızda, naif grubundaki hastaların plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonunun kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir ($P=.002$). Fayyad-Kazan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde hedef bölgelere bağlanarak *IFNG* mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Serum örnekleri ile yapılan bir çalışmada, *IFNG*'nin negatif regülatörü olan hsa-miR-16-5p'nin, RRMS'te sağlıklı kontrollere ($P=.01$) ve KİS hastalarına ($P<.0001$) kıyasla yukarı regüle edildiği bulunmuştur. Bu parametrenin RRMS'e özgü bir biyobelirteç olma durumu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, serum hsa-miR-16-5p rölatif ekspresyon seviyesinin, KİS ve RRMS evreleri arasındaki ayrımı yapmada (AUC= 0.98) ve RRMS tanısında (AUC=0.94) potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği görülmüştür (Haymour vd., 2022). Bu çalışmalar Şekil 4.2'de verilen etkileşim ağını destekleyici nitelikte olup hastalıkla birlikte düşen IFN-gama seviyelerini açıklamaktadır.

Bu bölümde *in silico* analizler sonucunda, IFN-gama protein seviyelerini etkileyen TF'ler ve miRNA'lar verilmiştir. Ayrıca, MS kapsamında literatür araştırmaları bulunan TF ve miRNA'larla ilgili bulgular sunulmuştur. Bölüm 4.4.2'de ise *in silico* analizler sonucunda, *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p etkileşim ağı verilmiş ve MS kapsamında yapılan çalışmaları sunulmuştur.

4.4.2. *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşimleri

Bu bölümde *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p etkileşim ağı verilmiştir. Bu ağda bulunan, MS kapsamında literatür araştırmaları yapılan TF ve miRNA'larla ilgili bulgular sunulmuştur. *IFNG* mRNA'sını hedefleyen miRNA'lar: hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-99-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-23a-3p ve hsa-miR-26b-5p olup Şekil 4.3'te verilmiştir. Buna ek olarak, hsa-miR-181d-

3p'nin *IFNG* mRNA'sını hedeflediği de görülmektedir (miRPathDB veritabanında). Fayyad-Kazan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin, *IFNG* mRNA'sının 3'UTR bölgesi yakınındaki hedef bölgelere bağlanarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Bu miRNA'ların MS ile ilişkisinin incelendiği çalışmalara bölüm 4.4.1'de yer verilmiştir.

hsa-miR-24-3p'nin post-transkripsiyonel olarak düzenlediği, hücre döngüsünde, DNA onarımında ve apoptozda önemli rolleri olan P53 sinyal yolağında görevli genler: P53 regülatörü fare çift dakika 4 (mouse double minute 4 regulator of P53, *MDM4*), ribonükleotid redüktaz düzenleyici alt birim 2 (ribonucleotide reductase regulatory subunit 2, *RRM2*), sestrin 1 (*SESNI*), *BCL2* bağlama bileşeni 3 (*BCL2* binding component 3, *BBC3*), siklin bağımlı kinaz 4 (cyclin dependent kinase 4, *CDK4*), Mg^{2+}/Mn^{2+} bağımlı protein fosfataz 1D (protein phosphatase, Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D, *PPM1D*), apoptotik peptidaz aktivasyon faktörü 1 (apoptotic peptidase activating factor 1, *APAF1*), kontrol noktası kinaz 1 (checkpoint kinase 1, *CHK1*), insülin benzeri büyüme faktörü 1, (insulin-like growth factor 1, *IGF1*), siklin B1 (cyclin B1, *CCNB1*), *CCND1*, prostat altı transmembran epitel antijeni 3 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3, *STEAP3*), tümör proteini 53 (tumor protein P53, *TP53*) ve halka parmağı ve WD tekrar alanı 2 (ring finger and WD repeat domain 2, *RFPWD2*)'dir (Şekil 4.3). *In vivo* bir çalışmada, MSS yaralanmalarından sonra aksonal yenilenmeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi kontrol eden ve P53 sinyal yolağında görevli MDM4/MDM2-p53-IGF1 aksı incelenmiştir. Aksonal yenilenmede önemli rolleri olan *IGF1*'in negatif regülatörü olduğu gösterilen *MDM4*'ün delesyonu veya MDM2/p53 etkileşiminin farmakolojik inhibisyonu ile, optik sinirde ve omurilik yaralanması sonrası üst omurilik yolağında (supraspinal trakt) aksonal yenilenmenin gerçekleştiği görülmüştür (Joshi vd., 2015). Çalışmamızdaki *in silico* analizlerle bu çalışma birlikte yorumlandığında, hsa-miR-24-3p'ün *MDM4*'ü hedefleyip ekspresyon seviyesini negatif yönde düzenleyerek aksonal yenilenmeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği yorumu yapılabilir. Diğer taraftan hsa-miR-24-3p aksonal yenilenmeyi sağlayan *IGF1*'i hedefleyerek bu etkileşimde aksonal yenilenme ve fonksiyonel iyileşme için negatif bir rol de almaktadır. Başka bir çalışmada, *in silico* analizlerle hsa-miR-24-3p'nin negatif yönde düzenlediği görülen ve apoptoz sürecinde önemli bir rol oynayan *APAF1* mRNA'sı RRMS hastalarında kontrollere kıyasla önemli ölçüde

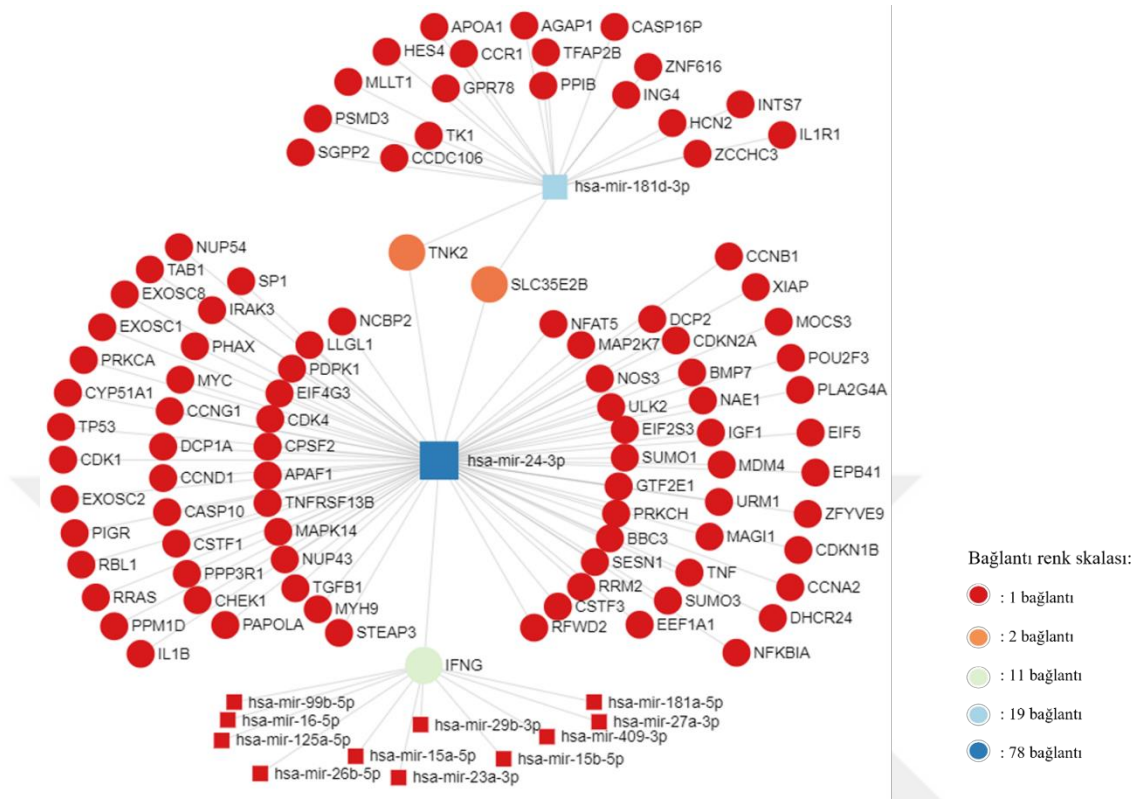
aşağı regüle edilmiştir ($P<.01$). MS tanısında, *APAF-1*'in duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %85.3 ve %76.5 olarak hesaplanmıştır (Dalia vd., 2022). Bizim çalışmamızla bu bulgular birlikte yorumlandığında, RRMS hastalarında kontrollere kıyasla görülen yüksek hsa-miR-24-3p seviyeleri ($P=.01$) düşük *APAF1* mRNA seviyelerine sebep olan mekanizmalar içinde bulunmaktadır (Chen vd., 2014). Başka bir bakışla, plazmadaki hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin yüksek olmasına; *APAF-1* seviyesinin ise azalmasına MS oluşum mekanizmalarının etki edebileceği de söylenebilir. Şekil 4.3'te verilen, hsa-miR-24-3p'nin hedeflediği ve post-transkripsiyonel olarak düzenlediği EBV enfeksiyonu ile ilintili genler: TGF-beta ile aktiveleştirilen kinaz (TGFB-activated kinase 1, *TAB1*), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, *CDKN1B*), *CCNA2*, *MAPK14*, genel TF IIE alt birimi 1 (general TF IIE subunit 1, *GTF2E1*), *MYC*, *NFKB* inhibitörü alfa (*NFKBIA*), *MAP2K7* ve *TP53*; apoptozla ilintili genler: *APAF1*, apoptoz inhibitörü X bağlantılı protein (X-linked inhibitor of apoptosis, *XIAP*), *CASP10*, *IL1B*, *NFKBIA*, protein fosfataz 3 düzenleyici alt birimi B, alfa (protein phosphatase 3 regulatory subunit B, alpha, *PPP3R1*), tümör nekrozis faktör (*TNF*), *TP53* ve *IRAK3*; sıkı bağlantıda (tight junction) görevli genler: *CDK4*, eritrosit membranı protein bandı 4.1 (erythrocyte membrane protein band 4.1, *EPB41*), ölümcül büyük larva homolog 1 (lethal giant larvae homolog 1, *LLGL1*), miyozin ağır zincir 9 (myosin heavy chain 9, *MYH9*), protein kinaz C alfa ve eta (*PRKCA*, *PRKCH*), ras ile ilişkili (ras related, *RRAS*) gen ve membran ilişkili guanilat kinaz 1 (membrane-associated guanylate kinase 1, *MAGI1*); nörotrofin sinyal yolağında görevli olan genler: *NFKBIA* ve *TP53*; T hücre reseptör sinyal yolunda görevli genler: *NFKBIA*, *MAP2K7* ve aktive T hücrelerinin nükleer faktörü 5 (nuclear factor of activated T cells 5, *NFAT5*); Alzheimer hastalığı ile ilişkili genler: *APAF1* ve gelişimsel olarak eksprese edilmiş aşağı düzenlenmiş nöral öncü hücre 8 aktive edici enzim E1 alt birimi (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8 activating enzyme E1 subunit 1, *NAE1*); Herpes enfeksiyonu ile ilişkili genler: *CDK1*, *IFNG*, *NFKBIA*, *TNF*, *TAB1* ve POU sınıfı 2 homeo kutusu 3 (POU class 2 homeobox 3, *POU2F3*); mRNA gözetim yoluyla (mRNA surveillance) ilişkili genler: kırılma uyarı faktörü birimi 1 (cleavage stimulation factor subunit 1, *CSTF1*), *CSTF3*, poli(A) polimeraz alfa (*PAPOLA*), nükleer kep bağlayıcı protein birimi 2 (nuclear cap binding protein subunit 2, *NCBP2*) ve kırılma ve poliadenilasyon özgül faktör 2 (cleavage and polyadenylation specific

factor 2, *CPSF2*); TGFB yolu ile ilintili genler: küçük ubiquitin benzeri modifiye edici 1 (small ubiquitin-like modifier 1, *SUMO1*), *SUMO3*, *IFNG*, özgüllük protein 1 (specificity protein 1, *SPI1*) ve *TGFB1*; VEGF sinyal yolağında görevli olan genler: *MAPK14*, fosfolipaz A2 grubu IVA (phospholipase A2 group IVA, *PLA2G4A*) ve NO sentaz 3 (*NOS3*); ATP/ITP metabolizmasında görevli genler: eksozom bileşeni 1 (exosome component 1, *EXOSC1*), *EXOSC2* ve *EXOSC8*; olgun mRNA'nın taşınmasında görevli genler: RNA ihracı için fosforile edilmiş adaptör (phosphorylated adaptor for RNA export, *PHAX*), nükleoprin 43 (*NUP43*) ve *NUP54*; oksitativ hasar yanıtı ile ilintili genler: *APAF1* ve tirozin kinaz 2 (*TNK2*); nöromusküler transmisyon disfonksiyonu ile karakterize olan konjenital miyastenik sendromu ile ilişkili olan gen: çözücü taşıyıcı ailesi 35 üyesi E2 (solute carrier family 35 member E2, *SLC35E2*) ve sinir sistemi gelişiminde rol alan genler: sitokrom P450 aile 51 alt aile A üye 1 cytochrome P450 family 51 subfamily A member 1, *CYP51A1*) ve *NFKB*'dir.

hsa-miR-24-3p'nin hedeflediği, apoptozla ilintili *TP53*'ün MS biyobelirteci olma potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmada, MS hastaları (RRMS %78.6, CIS %14.3 ve PPMS %7.1) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha düşük *TP53* ekspresyonu görülmüştür ($P=.002$) (Essa vd., 2024). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki bulgularla birlikte yorumlandığında, RRMS hastalarında kontrollere kıyasla; yüksek hsa-miR-24-3p seviyelerinin ($P=.01$) görülmesi, düşük *TP53* seviyelerinin olası nedeni olabilir. hsa-miR-24-3p hedefi olan, apoptoz, T hücre reseptör ve nörotrofin sinyal yolağında görevli olan *NFKB1* geninin, NF- κ B transkripsiyonel kompleksinin p50 alt birimini kodladığı bilinmektedir. Çeşitli çalışmalar, bu genin içindeki veya yakınındaki genetik varyantların MS ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Beecham vd., 2013; Hussman vd., 2016). Bir *in vivo* çalışmada, genetiği değiştirilmiş *NFKB1* -/- (knock out) farelerin EAE'ye önemli ölçüde dirençli olduğu gösterilmiştir ($P< .001$) (Hilliard vd., 1999).

hsa-miR-181d-3p'nin hedeflediği MAPK sinyal yolunda görevli, T-lenfotropik virüs tip 1 enfeksiyonuyla ve apoptozla ilişkili *IL1R1* geni Şekil 4.3'te verilmiştir. *IL-1R1* ekspresyonunun, *in vitro* farklılaşmış Th17 hücrelerinde Th1 ve Th2 kültürlerine kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P< .001$). *IL-1R1* sinyallemesi, otoimmün hastalığın gelişimi için gerekli olan Th17 hücrelerinin farklılaşmasıyla ilişkilendirilmiştir (Chung vd., 2009; Sutton vd., 2006). *IL-1R1* ekspresyonunun,

RRMS hastalarından elde edilen Th hücrelerinde, sağlıklı olanlara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P < .001$) (Capone vd., 2019) .



Şekil 3.3: *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşimleri. Gen ve miRNA renkleri miRNET programı tarafından bağlantı sayısına göre atanmıştır.

Pirimidin ve ilaç metabolizmasında görevli timin kinaz 1 (*TK1*) geni; peroksizom aktive edici reseptör sinyal yolunda görevli apolipoprotein A1 (*APOA1*) geni; JAK-STAT sinyal yolunda görevli proteazom 26S alt birimi, ATPaz olmayan 3 (proteasome 26S subunit, non-ATPase 3, *PSMD3*); sitokin-sitokin reseptör etkileşiminde görevli C-C kemokin reseptörü tip 1 (*CCR1*) ve *IL1R1* genleri; sfingolipit metabolizmasında görevli sfingozin-1-fosfat fosfataz 2 (sphingosine-1-phosphate phosphatase 2, *SGPP2*) geni; kromatin organizasyonunda görevli miyeloid/lenfoid veya karışık hat kökenli lösemi; taşınmış olan, 1 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 1, *MLLT1*) ve büyümeyi engelleyici aile üyesi 4 (inhibitor of growth family member 4, *ING4*) genleri; konjenital miyastenik sendromu ile ilişkili olan çözücü taşıyıcı aile üyesi 35, E2 (solute carrier family 35 member E2, *SLC35E2*) geni; oksidatif hasar yanıtı ile ilintili *TNK2* geni; *TGFB* reseptör sinyal yolunda görevli TF

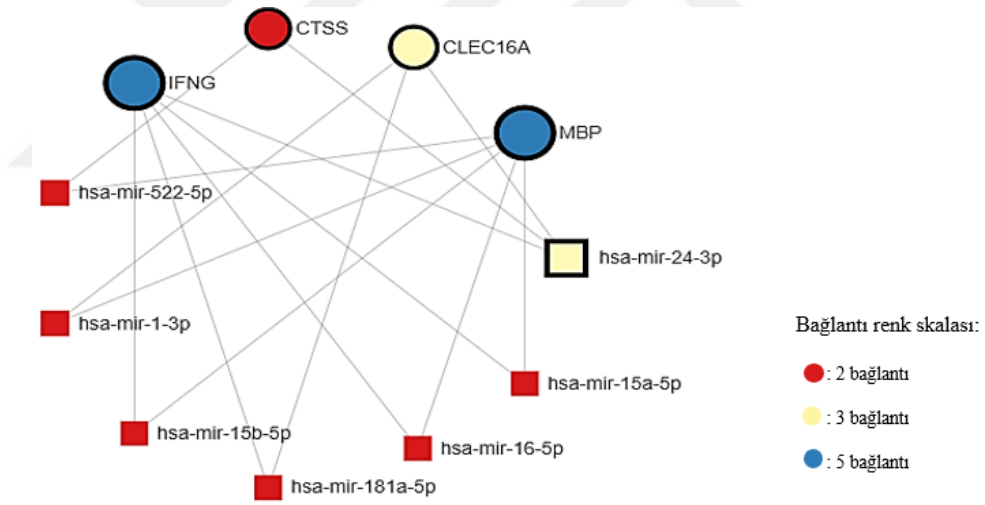
AP-2 beta (TF AP-2 beta, *TFAP2B*) geni; G proteinine bağı reseptör sinyal yolunda görevli G protein bağı reseptör 78 (G protein-coupled receptor 78, *GPR78*) geni ve RNA polimeraz 2 transkripsiyonunda görevli çinko parmak protein 616 (zinc finger protein 616, *ZNF616*) geni hsa-miR-181d-3p'nin post-transkripsiyonel olarak düzenlediği genlerdir (Şekil 4.3). Bu bölümde *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p etkileşim ağı sunulmuştur. Bir sonraki bölüm olan 4.4.3'te *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile etkileşimi bulunan ve GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler *in silico* analizlerle incelenmiştir.

4.4.3. GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler ile *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşim analizi sonuçları

GA tedavisi ile ilişkilendirilen C-tipi lektin alan ailesi 16 A üyesi (*CLEC16A*), katepsin S (*CTSS*), C-C motifi kemokin reseptörü 5 (*CCR5*), *CD95*, steril alfa motifi ve lösin fermuar içeren kinaz *AZK* (sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase *AZK*, *ZAK*), *HLA-DRB1*, *MBP* ve protein tirozin fosfataz, reseptör tip T (protein tyrosine phosphatase, receptor type T, *PTPRT*) genlerinin (Kulakova vd., 2017; Anat vd., 2009) *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile etkileşimleri *in silico* analizlerle incelenmiştir (Şekil 4.4). Bu genler içinden, *CLEC16A* ve *CTSS* genleri ile yalnızca hsa-miR-24-3p arasında etkileşimler bulunmuştur. GA ile ilişkilendirilen genlerin IFN-gama ve miR-181d-3p ile herhangi bir etkileşimi bulunmamıştır. hsa-miR-1-3p, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181a-5p'nin post transkripsiyonel olarak düzenlediği *CLEC16A*, 16p13 kromozom lokasyonunda bulunan, otofaji ve antijen sunumunun düzenlenmesinde rol oynayan, membranla ilişkili bir endozomal proteindir. Çalışmalar *CLEC16A*'nın, otofajide (Schuster vd., 2015; Tam vd., 2017), mitofajide (mitokondriyal kalite kontrolü için gerekli olan seçici bir otofaji şeklidir) (Soleimanpour vd., 2014) ve HLA-II antijen sunumunda (Soleimanpour vd., 2014; Betz vd., 2015; Rijvers vd., 2020) rol oynadığını göstermiştir. Genetiği değiştirilmiş *CLEC16A* *-/-* (knock-out) farelerde, *CD40* ($P<.0001$), *CXCL2* ($P<.05$), *CXCL9* ($P<.05$), *CXCL13* ($P<.001$), *IL-2* ($P<.001$), *IL-3* ($P<.001$), *IL-6* ($P<.001$) ve *IFNG* ($P<.001$) seviyelerinin yukarı regülasyonu görülmüştür (Pandey vd., 2021). İlginç bir şekilde, bu fareler aynı zamanda yürüme bozukluğu ve istemsiz ve sürekli kas kasılması durumlarıyla birlikte ciddi nörolojik fenotipler de geliştirmiştir (Hain vd., 2021).

GA tedavisi gören 296 RRMS hastasından oluşan bir Rus popülasyonunda, *CLEC16A* rs6498169 (G/A; intron varyantı) polimorfizminin A aleli ile GA tedavisinin etkinliği arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, A aleli tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir ($P=.03$) (Kulakova vd., 2017).

CLEC16A geninin yüksek seviyelerde ifadesinin, IFN-gama ekspresyon seviyesini etkileyip etkilemediğinin değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmada, *CLEC16A* aşırı ekspresyonunun IFN-gama üretiminde önemli bir düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir ($P=.01$) (Fukuoka vd., 2016). hsa-miR-522-5p ve hsa-miR-24-3p'nin post transkripsiyonel olarak düzenlediği 1q21.3 bölgesinde *CTSS* geni, lizozomal sistein proteaz ailesine aittir (Deussing vd., 1997). Kodladığı protein, antijene sunulmadan önce hem dendritik hücrelerde hem de mikrofajlarda MHC sınıf 2'nin yapısında değişikliklere sebep olan endoproteaz görevi görür. Ek olarak *CTSS*, salgılandığında dokulardaki hücre dışı matrisi değiştirebildiği için antijen işlenmesinde önemli bir role sahiptir (Cuzzola vd., 2012).



Şekil 3.4: GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler ile *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin etkileşim analizi sonuçları. GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler ve çalışmamız kapsamında bulunan hsa-miR-24-3p siyah sınırlarla belirlenmiştir. Gen ve miRNA renkleri miRNET programı tarafından bağlantı sayısına göre atanmıştır.

Grossman ve arkadaşları, RRMS tanısı alan 101 hasta üzerinde farmakogenetik bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada, *CTSS* rs2275235 G/A (intron varyantı) polimorfizmi için, 47 hastada, G aleli ile GA tedavisine verilen pozitif yanıt arasında 11.7 kat anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir ($OR=11.659$, $CI=1.6-81.9$ ve $P=.01$).

Ayrıca *CTSS* rs1415148 A/G (intron varyantı) polimorfizmi için 47 hastada A aleli ile GA tedavisine verilen pozitif yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (OR= 6.85, CI=1.6-29.2 ve $P=.002$) (Grossman vd., 2007). *CTSS* geninin yüksek seviyelerde ifadesinin, IFN-gama ekspresyon seviyesini etkileyip etkilemediğinin değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmada, *CLEC16A* aşırı ekspresyonunun IFN-gama üretiminde önemli bir düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir ($P=.01$).

hsa-miR-522-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-15b-5p ve hsa-miR-16-5p'nin post transkripsiyonel olarak düzenlediği *MBP* geni, 18q23 kromozom lokasyonunda yer almaktadır (Saxe vd., 1995). *MBP*, MSS'de en çok bulunan ikinci proteindir ve sinir dokularını kaplayan miyelin içeren katmanların yapılarını korumak için yapışmasından sorumludur (Boggs, 2006). 32 RRMS hastası ile yürütülen bir çalışmada, *MBP* rs470929 T/C (intron varyantı) polimorfizminin GA yanıtıyla ilişkisi değerlendirilmiştir. RRMS'li T aleli taşıyan hastalarla GA'ya verilen pozitif yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (OR= 5.30, CI=1.1-25.9 ve $P=.04$) (Grossman vd., 2007).

Bu bölümdeki *in silico* analizde, *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile etkileşimi bulunan ve GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler incelenmiştir. Neticede, araştırdığımız parametreler içerisinde sadece hsa-miR-24-3p ile, GA tedavisiyle ilişkilendirilen genler içerisinde yalnızca *CTSS* ve *CLEC16A* arasında bir etkileşim bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nöroenflamatuvar bir hastalık olan ve genç yetişkinlerde sık görülen MS, otoimmün, nörodejeneratif ve kronik bir MSS hastalığı olup hastanın yaşam süresi ve kalitesini önemli ölçüde etkileyerek fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır. MS, genç yetişkinlerde en yaygın sakatlık nedeni olup, engellilik ve kalıcı hasar oluşturabilir. Günümüzde MS'i tamamen tedavi edecek kesin bir çözüm bulunmamaktadır. Mevcut tedaviler kortikosteroidler, immünsüpresif ve immünomodülatör ilaçları içermektedir. Ancak hastaların hastalık seyri ve ilaç tepkileri bireysel olarak değişmektedir. Hastalığın erken evrelerindeki, ilerlemesini etkileyen ve ilaç yanıtlarına neden olan faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. Bu faktörlerin aydınlatılması, biyobelirteç olma potansiyelinin araştırılması ve uygunsa kullanılması, hasta ve hastalık yönetiminin daha iyi yürütülmesine olanak sağlayacaktır. Böylece moleküler biyobelirteçlerin tespiti ile riskli olan kişiler belirlenebilir; hastalık seyri izlenebilir ve kişiye özel ilaç tedavisi planlamaları yapılabilir kılınacaktır (Loma ve Heyman, 2011; Paul vd., 2019; Michaličková vd., 2022). Belirli tamamlayıcı diziyi hedefleyerek gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak düzenleyen miRNA'lar, hastalık tanısı, tedavisi ve prognoz takibi için yapılan biyobelirteç çalışmalarında yer almaktadırlar (Lee vd. 2016; Undi vd., 2013). miRNA'ların gen ifadesi ile ilişkisi, MS hastalık seyri ve kullanılan ilaçlarla etkileşimleri, otoimmünite ve enflamasyonda düzenleyici rollerinin saptanması hastalık etiyopatogenezini açığa çıkarmayı hedefleyen araştırmaların odağı haline gelmiştir (Lee vd. 2016).

Çalışmamıza konu olan IFN-gama'nın MS patogenezinde karmaşık bir rol oynadığı, hastalık başlangıç aşamasında patogenezi teşvik ederken ilerleyen aşamalarda immün baskılamayı teşvik ettiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Genetik varyantlar ve miRNA'lar IFN-gama'nın ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyebilir. *IFNG* geninde 3' UTR yakınındaki rs2069727 T/C SNP'si daha önce ABD'li, Kuzey İrlandalı ve Belçikalıları içeren grupta MS kapsamında çalışılmış ve IFN-gama ekspresyon seviyesi ve MS riski ile ilişkili bulunmuştur (Kantarci vd., 2008).

Fayyad-Kazan vd. tarafından yapılan çalışmada, *IFNG* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde bulunan hedef bölgesine bağlanan miR-24-3p ve miR-181d-3p'nin IFN-gama mRNA ve protein ifadesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan vd., 2014). Fayyad-Kazan ve ekibinin (2014) yaptığı çalışmada, *IFNG* geninin 3'UTR'sinde hedef bölgeye sahip olan miR-24-3p ve miR-181d-3p (URL-25) hakkında biyoinformatik hesaplamalar yapılmış ve fonksiyonel laboratuvar çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu iki miRNA'nın ifadesini azaltmanın IFN-gama ifadesini arttırdığı gözlenmiştir ($P<.01$) (Fayyad-Kazan vd., 2014).

Çalışmamızda, plazmadaki IFN-gama seviyeleri ile bu seviyeyi etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, MS riskine ve engellilik skorlarına etkileri yönünden incelenmiştir. Bu parametrelerin birbirleri ile ilişkileri de incelenmiş, bunların bir arada hastalıkla daha güçlü ilişkisi olup olmadığı hesaplanmış ve biyobelirteç olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. İlave olarak, miRNA ve IFN-gama seviyeleri GA tedavisi alanlar ile tedavi almayanlar arasında karşılaştırılmış, *IFNG* genotipi, plazma IFN-gama seviyesi ve/veya miRNA ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Bu parametrelerin birbiri ile olan ilişkileri incelenmiştir. Bu tez çalışması bu konuda ilktir ve TÜBİTAK 1002 (121S345) araştırma projesi kapsamında, birbiri ile çakışan genetik polimorfizm çalışma grubu (330 RRMS hastası ve 330 kontrol birey) ve miRNA ve ELISA çalışma grubu (25 naif RRMS hastası, 25 GA tedavisi alan RRMS hastası ve 25 kontrol birey) adlı iki çalışma grubu ile gerçekleştirilmiştir.

Genetik polimorfizm çalışma grubundaki 330 RRMS hastası içinde, erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS ($P=.01$) ve MSSS ($P=.02$) puanlarına, trigliserit ($P<.001$), LDL-kolesterol ($P=.04$) ve VLDL-kolesterol ($P<.001$) düzeylerine; daha düşük HDL-kolesterol ($P<.001$) seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgular, erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına kıyasla daha kötü prognoza sahip olduklarını göstermektedir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011).

Çalışmamızda, miRNA ve ELISA çalışma grubunda, 25 naif RRMS hastası ile 25 GA tedavisi alan RRMS hastası arasında MRG parametreleri karşılaştırıldığında, T1 lezyon sayılarının ($P=.004$) ve T2 lezyon sayılarının ($P=.004$) GA tedavisi alan RRMS hastalarında naif hastalara kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. Bu

durumun tedavi etkinliğinden bağımsız olup doğası gereği ilerleyici bir hastalık olan MS'te görülebildiği ifade edilmiştir (Paolillo vd., 2002; Fiorini vd., 2013; Giorgio vd., 2014). GA grubunda bulunan RRMS hastalarının kontrast tutan lezyon sayısı naif grubunda bulunan RRMS hastalarında olduğundan daha düşüktür ($P=.002$). Naif ile GA grubunda bulunan RRMS hastaları arasında, kontrast tutan lezyonu olanların frekansı karşılaştırıldığında, naif RRMS hastalarında kontrast tutan lezyon görülme oranının (%68.0) GA tedavisi alan RRMS hastalarinkine kıyasla (%24.0) anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür ($P=.002$). Bu durumun henüz tedavi almamış olan naif RRMS hastalarında, hastalığın daha aktif olmasından kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir (Graziano vd. 2015; Ashida vd., 2020).

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, naif ve GA tedavisi alan RRMS hastalarının plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (hsa-miR-24-3p için, naif - kontrol: $P=.01$ ve GA - kontrol: $P<.001$; hsa-miR-181d-3p için, naif - kontrol: $P=.002$ ve GA - kontrol: $P=.045$). Bunun tam tersi olarak, naif ve GA tedavisi alan RRMS hastalarının yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla önemli oranda düşüktür (naif - kontrol: $P=.03$ ve GA - kontrol: $P=.001$). Öte yandan, GA tedavisi alan RRMS hasta grubu ile naif RRMS hasta grupları arasında plazma hsa-miR-24-3p veya hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyonu ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. hsa-miR-24-3p'nin rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastalarını kontrollerden ayıran orta düzeyde bir prediktör olduğu ve GA farmakodinamiği için önemli bir faktör olabileceği görülmüştür.

Çalışmanın devamında, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin, plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin sınır değerlerine göre aralarındaki ilişkileri incelenmiştir. Tüm grupta yapılan analizde, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalaması, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311 \text{ pg/mL}$) ile yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311 \text{ pg/mL}$) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311 \text{ pg/mL}$) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (3.30 ± 1.91) yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311 \text{ pg/mL}$) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinden (2.42 ± 2.24) daha fazla ($P=.02$) çıkmıştır. Tüm grupta

yapılan diğ er analizde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} \leq 2.90$) ile yüksek hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} > 2.90$) grupları arasında kar ıla tırılmı , düşük hsa-miR-181d-3p (≤ 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalaması ($1.32 \pm .05$ pg/mL) yüksek hsa-miR-181d-3p (> 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalamasından ($1.29 \pm .07$ pg/mL) daha fazla çıkmıştır ($P=.02$). hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p’nin, doğrudan veya dolaylı bir şekilde IFN-gama protein seviyesini negatif yönde etkilediğ  g r lm   t r. Bu bulgular Fayyad-Kazan’ın çalışmasını desteklemektedir (Fayyad-Kazan vd., 2014).

hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastalarını kontrollerden ayıran orta düzeyde bir prediktör olduğ  ve GA farmakodinamiğ  için önemli bir faktör olduğ  g r lm   t r. hsa-miR-181d-3p ile ilgili MS’te yapılmış herhangi bir çalışma literatürde yoktur. Bu nedenle bu çalışma bu konuda ilktir. Ayrıca, çalışmamızla birlikte IFN-gama protein seviyesi ve bu seviyeyi etkilediğ  düşünülen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri RRMS tanısı ve GA tedavi yanıtı açısından ilk kez birlikte değ rlendirilmi tir.

Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin, GA kullanan RRMS hastalarını kontrollerden ayıran “iyi”, naif RRMS hastalarını kontrollerden ayıran “orta” dereceli bir tanı testi olabileceğ  g r lm   t r. Üç parametre (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesi) birlikte tek bir parametre olarak incelendiğ nde, GA tedavisi alan RRMS hasta grubu ile naif RRMS hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. GA kullanan RRMS hastalarını kontrollerden ayıran “iyi”, naif RRMS hastalarını kontrollerden ayıran “orta” dereceli bir tanı testi olabileceğ  g r lm   t r. GA tedavisinin, tipik bir hastalığı modifiye edici tedaviye kıyasla periferik bağışıklık tepkisini bastırmak yerine, koruyucu etkisiyle hem periferik hem de merkezi immün yanıtları geli tirdiğ  gözlenmiştir. Ayrıca, immünojenik veya immünomodülatör etkisinin yanında nöroprotektif bir etki i erdiğ  de gösterilmiştir. GA ile indüklenen Th2 hücrelerinin sitokin profilleri ile sağlıklı kontrol bireylerin Th2 hücrelerinin sitokin profillerinin bire bir aynı olmaması, katıldıkları hücresel mekanizmaların ve fonksiyonların farklı olmasına sebep olabilir. Dolayısı ile, Th2 hücrelerinden salınan sitokin profillerindeki farklılıklar, henüz bilinmeyen mekanizmalar sonucunda bir

protein ve/veya mRNA ve/veya miRNA profilinin, GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla farklı seviyelerde ifade edilmesinde rol alabilir (Tsareva vd., 2011; Sheremata ve Campos, 2016; Ganji vd., 2020).

GA güdümlü antienflamatuar T hücreleri, yalnızca Th2 hücrelerini değil aynı zamanda Tr1 ve Treg hücrelerini de içerebilir (Stern vd., 2008; Tsareva vd., 2011; Sheremata ve Campos, 2016; Ganji vd., 2020). Ayrıca, GA'nın MHC sınıf 2'ye bağlanmak için miyelin antijenleriyle rekabet ettiği ve bağlandığında gerçekleşen mekanizmalar sonucunda, MBP'ye özgü T-hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği bu yarışmalı inhibisyon ortamında bulunan çeşitli bağışıklık hücreleri ve etkileri, sağlıklı kontrollerde olduğundan farklı olabilir. GA tedavisi alan RRMS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek hsa-miR-24-3p ($P<.001$) ve hsa-miR-181d-3p ($P=.045$) seviyelerinin görülmesi, GA tedavisi ile doğal, adaptif bağışıklık ve GA-spesifik T hücrelerinin kompozisyonundaki değişiklikler sonucunda birbirini izleyen mekanizmalara bağlı olabilir. Ek olarak, GA'nın karmaşık patofizyolojik ortama yarışmalı inhibisyon ile dâhil olması, kompleks MS doğasına yeni bir boyut kazandırmaktadır. GA'nın T hücrelerine sunumu ile gelişen, sağlıklı hücrelerde bulunmayan GA-spesifik T hücrelerinin ürettiği sitokinler ve katıldığı mekanizmalar hesaba katıldığında, tedavi ile plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyelerinde ve IFN-gama konsantrasyonunda geline noktanın sağlıklı kontrollere yakınsamaması normal bir durum olarak görülebilir. Ek olarak, GA terapisi boyunca ekspresyon seviyesi değişen genlerin incelendiği bir çalışmada, *CXCL-9*, *CXCL-10*, *VCAM1*, *POMC*, *OXC* ve *CD38* genlerinin yukarı düzenlenmiş; *CD34* ve *PTPRC* genlerinin ise aşağı düzenlenmiş majör genler olduğu gösterilmiştir (Benecke vd., 2014). Net cevaplar için, GA tedavisi ile ekspresyon seviyesi değişen gen havuzunun genişletilmesine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç giderildikten sonra, genlerin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile ilişkilerinin incelendiği, kontrol, naif ve GA tedavi gruplarını içeren boylamsal çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bu çalışmalar GA'nın farmakodinamik etkisinin gölgede kalan yanlarına ışık tutabilir.

GA kullanan RRMS ve naif RRMS hastalarının plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu, hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta ila yüksek düzey ($EDSS > 3$) EDSS grupları arasında; yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$)

MSSS grupları arasında karşılaştırılmış, anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hafif düzey ($EDSS \leq 3$) ve orta ila yüksek düzey ($EDSS > 3$) EDSS; yavaş progresyon ($MSSS \leq 5$) ve hızlı progresyon ($MSSS > 5$) MSSS puanlarına göre gruplandırılan RRMS hastalarının plazma hsa-miR-24-3p, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu, hasta grupları arasında karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır.

GA kullanan RRMS grubunda yapılan korelasyon analizlerinde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ile EDSS ($\rho = -.520$, $P = .008$); hastalık süresi ($\rho = -.596$, $P = .002$) ve tedavi süresi ($\rho = -.623$, $P = .001$) arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür. GA ve naif grubunda hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon görülmezken; kontrol grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, hsa-miR-24-3p ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ($\rho = .607$, $P = .001$) arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Kontrol bireylerde ve naif RRMS hastalarında hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p arasında pozitif bir korelasyon mevcutken, tedavi alan hastalarda bu iki miRNA arasında herhangi bir korelasyonun olmaması, GA'nın farmakodinamik etkisinin inceleneceği birçok çalışma için potansiyel araştırma konusu olabilir.

Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin ve *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin, hastalıkla ve tedavi ile ilişkileri istatistiksel analizlerle incelenmiştir. Naif grubunda bulunan TT genotipli bireylerin plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($\rho = .886$, $P = .02$) görülmüştür. Tüm grup, naif ve kontrol gruplarında bulunan TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında görülen pozitif korelasyonun (sırası ile, $\rho = .585$, $P < .001$; $\rho = .672$, $P = .006$; $\rho = .606$, $P = .004$) aksine, GA grubunda, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında korelasyon bulunmamıştır. Bu analiz sonucunda, çalışma grubundaki TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasındaki pozitif korelasyon, GA kullanımı ile birlikte anlamlılık değerini yitirmiştir.

Çalışmamızda, kontrol grubu, GA tedavisi alan ve naif RRMS hastalarında ayrı ayrı olmak üzere *IFNG* rs2069727 T/C polimorfizmi açısından farklı genotiplere sahip bireyler arasında yapılan yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırmalarında gruplar arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. ABD’li, Kuzey İrlandalı ve Belçikalı MS hastaları ve kontrollerden alınan örneklerle yapılan ve *IFNG* rs2069727 G haplotipi taşıyıcılarının, yüksek *IFNG* mRNA ifadesiyle ($P=.04$) ilişkilendirildiği (Kantarci vd., 2008) bir çalışmanın aksine; bizim çalışma popülasyonumuzda *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si ile IFN-gama ekspresyonu arasında bir ilişki olmadığı gösterilmiştir.

GA-kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, ilaç kullanımı ile hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 2.43 kat; lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 2.15 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir. GA tedavisi ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren modellerde yaklaşık 1.17 kat; lipit parametrelerini içermeyen resesif modelde yaklaşık 1.08 kat, dominant modelde yaklaşık 1.07 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Lojistik regresyon analizleri sonucunda, hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, RRMS ile, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 1.5 kat ilişkili olduğu; lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 1.3 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyeleri, hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde bu parametrenin, RRMS ile lipit parametrelerini içeren modellerde yaklaşık 1.13 kat; lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 1.10 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Lojistik regresyon analizleri sonucunda, total lezyon sayısının, GA tedavisi ile, lipit parametrelerini içeren modellerde, yaklaşık 1.12 kat; lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.12 kat; 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren modellerde yaklaşık 1.11 kat ; 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen modellerde yaklaşık 1.12 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu tezde hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin enjekte edilebilir immünomodülatör tedavilerden GA'nın hedefi olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Bu çalışma ışığında, yeni çalışmalarla birlikte gelecekte, hastalık riski, prognozu ve tedaviye verilen yanıt tahmininde verimli sonuçlar için, birden fazla biyobelirteci kapsayan, engellilik skorlarının ve MR lezyonlarının incelendiği yapay zekâ sistemini içeren makine öğrenme algoritmalarının oluşturduğu bir panel geliştirilebilir (Paty vd., 1988; Farina vd., 2017; Michaličková vd., 2022). Hastalığa yatkınlığa neden olan, hastalığın ilerleyişini etkileyen ve ilaçlara verilen farklı tepkilerin altında yatan faktörlerin aydınlatılması için yapılan çalışmalar ışığında (Ehya vd., 2017; Vistbakka vd., 2017; Vistbakka, 2022; Paul vd., 2023), MS patogenezinde ve/veya tedavi sürecinde, rolleri gölgede kalmış moleküller keşfedilebilir ve ihtiyaç duyulan, kolay erişilebilir ve kanda bakılan biyobelirteçlerin bulunmasına katkı sağlanabilir. İlerleyen dönemlerde, MS teşhisi için kullanılan EDSS, MSSS gibi puanların; tanı, prognoz veya tedaviye yanıt gibi klinik özellikleri tahmin edebilmemizi sağlayacak biyobelirteçlerle birlikte yapay zekâ ve makine öğrenimi için bir araç olarak kullanılmasıyla teşhiste ve hastalık seyrinin/tedavi gidişatının takibinde daha güvenilir stratejiler geliştirilebilir. Örneğin, Massachusetts General Hastanesi tarafından geliştirilen "Enlitic" adlı bir yapay zekâ sistemi, kanser hastalarının ilerlemesini izlemek için kandaki tümör belirteçlerini kullanmakta olup, derin öğrenme teknolojisiyle, radyoloji ve patoloji görüntüleri, kan testi ve elektrokardiyografi (EKG) sonuçları, hasta geçmişi ve elektronik sağlık kayıtları dâhil olmak üzere çok sayıda klinik bilgiyi tetkik edebilmektedir. Bu çeşitlilik, her hastaya daha fazla doğruluk ve daha derin bilgi imkânı sağlamaktadır (Aydemir vd., 2023).

Ayrıca, çalışmadaki miRNA'ların spesifik olarak hedeflenmesine yönelik tedavi ajanları ve bu miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanıldığı biyosensörler veya tanı kitleri geliştirilebilir. Ek olarak, tez çalışmamızda GA tedavisi alan hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla görülen yüksek seviyelerde hsa-miR-24-3p ($P<.001$) ve hsa-miR-181d-3p ($P=.045$) seviyeleri; düşük IFN-gama konsantrasyonu (yaşa göre düzenlenmiş) ($P=.001$), GA'nın farmakodinamik etkisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilerle birlikte yorumlanıp geniş bir perspektifte sunulabilir. Net cevaplar için, GA tedavisi ile ekspresyonu değişen *CXCL-9*, *CD34* ve *OXC* gibi genlerin bulunduğu gen havuzunun genişletilmesine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç

giderildikten sonra, genlerin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile ilişkilerinin incelendiği, kontrol, naif ve GA tedavi gruplarını içeren boylamsal çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bu tez çalışması ışığında yeni çalışmalarla birlikte GA'nın moleküler düzeydeki tedavi mekanizması ve farmakodinamik etkisi aydınlatılabilir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur:

- Genetik polimorfizm çalışma grubundaki 330 RRMS hastası içinde, erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS ($P=.01$) ve MSSS ($P=.02$) puanlarına, trigliserit ($P<.001$), LDL-kolesterol ($P=.04$) ve VLDL-kolesterol ($P<.001$) düzeylerine; daha düşük HDL-kolesterol ($P<.001$) seviyelerine sahip olduğu görülmüştür.
- Çalışmamızda, miRNA ve ELISA çalışma grubunda, 25 naif RRMS hastası ile 25 GA tedavisi alan RRMS hastası arasında MRG parametreleri karşılaştırıldığında, T1 lezyon sayılarının ($P=.004$) ve T2 lezyon sayılarının ($P=.004$) GA tedavisi alan RRMS hastalarında naif hastalara kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür.
- GA grubunda bulunan RRMS hastalarının kontrast tutan lezyon sayısı naif grubunda bulunan RRMS hastalarında olduğundan daha düşüktür ($P=.002$). Naif ile GA grubunda bulunan RRMS hastaları arasında kontrast tutan lezyon varlığı frekansı karşılaştırıldığında, naif RRMS hastalarında kontrast tutan lezyon görülme oranının (%68.0), GA tedavisi alan RRMS hastalarınınkine kıyasla (%24.0) anlamlı derecede daha fazla olduğu görülmüştür ($P=.002$).
- *IFNG* rs2069727 T/C SNP genotip ve alel frekanslarının analiz sonucuna göre, polimorfik CC genotipinin RRMS grubunda %21.21, kontrol grubunda %24.24 oranında olduğu görülmüştür. Polimorfik C alel frekansının RRMS hasta grubunda 0.456 ve kontrol grubunda 0.500 olduğu görülmüş ve gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir ($P=.11$).

- *IFNG* rs2069727 T/C SNP genotip ve alel frekanslarının analiz sonucuna göre, resesif, dominant, kodominant, overdominant ve log-additive modellerinde gruplar arasında istatistiki değerdendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir.
- Plazma hsa-miR-24-3p rölafif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.751, $P=.01$ ve %95 CI=0.61-0.90).
- Plazma hsa-miR-24-3p rölafif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “iyi” olduğu görülmüştür (AUC=0.822, $P<.001$ ve %95 CI=0.70-0.95).
- Plazma hsa-miR-181d-3p rölafif ekspresyon seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.759, $P=.002$ ve %95 CI=0.62-0.90).
- Plazma hsa-miR-181d-3p rölafif ekspresyon seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.717, $P=.045$ ve %95 CI=0.57-0.86).
- Yaşı göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesinin naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” olduğu görülmüştür (AUC=0.726, $P=.03$ ve %95 CI=0.58-0.87).
- Plazma IFN-gama seviyesinin GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerdine göre bu parametrenin tanısal performansının “iyi” olduğu görülmüştür (AUC=0.797, $P=.001$ ve %95 CI=0.67-0.93).
- Yaşı göre düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesi ortalamasının, heterozigot genotipli (TC) kişiler arasında yapılan karşılaştırmasında, GA grubu RRMS

hastalarında 1.29 ± 0.05 pg/mL, naif grubu RRMS hastalarında 1.30 ± 0.07 pg/mL ve kontrol grubu bireylerde 1.34 ± 0.04 pg/mL olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P=.01$). Heterozigot genotipe (TC) sahip GA kullanan RRMS hastalarının düzenlenmiş IFN-gama plazma seviyesinin, kontrollere göre anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ($P=.01$).

- Tüm grupta yapılan analizde, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalaması, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311$ pg/mL) ile yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311$ pg/mL) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311$ pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi (3.30 ± 1.91) yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311$ pg/mL) grubunda bulunan bireylerin hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinden (2.42 ± 2.24) daha fazla çıkmıştır ($P=.02$).
- Plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, tüm grupta, GA, naif ve kontrol grupları içinde, düşük IFN-gama ($\text{IFN-gama} \leq 1.311$ pg/mL) ile yüksek IFN-gama ($\text{IFN-gama} > 1.311$ pg/mL) karşılaştırması sonucu anlamlı bir fark elde edilmemiştir.
- Yüksek IFN-gama konsantrasyonuna sahip bireylerin plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmış ve GA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri tespit edilmiştir (sırasıyla, üç grup arasında: $P=.009$, GA - kontrol: $P=.01$; üç grup arasında: $P=.01$, GA - kontrol: $P=.01$).
- Tüm grupta yapılan analizde, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyesi ortalaması, düşük hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} \leq 2.90$) ile yüksek hsa-miR-181d-3p ($\text{hsa-miR-181d-3p} > 2.90$) grupları arasında karşılaştırılmış, düşük hsa-miR-181d-3p (≤ 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalaması ($1.32 \pm .05$ pg/mL) yüksek hsa-miR-181d-3p (> 2.90) grubunda bulunan bireylerin ortalamasından ($1.29 \pm .07$ pg/mL) daha fazla çıkmıştır ($P=.02$) (Çizelge 3.32).
- plazma IFN-gama seviyesinin (yaşa göre düzenlenmiş), plazma hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin sınır değerlerine göre

incelenmesi sonucunda elde edilen yukarıdaki bulgular, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p'nin doğrudan veya dolaylı bir şekilde IFN-gama protein seviyesini negatif yönde etkilemekte olduğunu göstermektedir.

- Plazma miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin birlikte tek bir parametre olarak incelendiği karşılaştırmalarda, naif ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde, elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “orta” olduğu görülmüştür (AUC=0.779, $P=.001$ ve %95 CI=0.65-0.91).
- Plazma miRNA ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama seviyesinin birlikte tek bir parametre olarak incelendiği karşılaştırmalarda, GA ile kontrol grupları arasındaki ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre bu parametrenin tanısal performansının “iyi” olduğu görülmüştür (AUC=0.806, $P<.001$ ve %95 CI=0.69-0.93).
- Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ekspresyon seviyelerinin ve *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin, hastalıkla ve tedavi ile ilişkileri istatistiksel analizlerle incelenmiştir. Naif RRMS grubunda bulunan TT genotipli bireylerin plazma hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon ($\rho=.886$, $P=.02$) görülmüştür.
- Tüm grup, naif ve kontrol gruplarında bulunan TC genotipli bireylerin plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında görülen pozitif korelasyonun (sırası ile, $\rho=.585$, $P<.001$; $\rho=.672$, $P=.006$; $\rho=.606$, $P=.004$) aksine, GA grubunda, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi arasında korelasyon bulunmamıştır ($\rho=.346$, $P=.25$).
- Çalışmamızda, *IFNG* rs2069727 T/C genotiplerinin yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu üzerinde etkilerinin olup olmadığı incelenmek istenmiştir. Kontrol grubu, GA tedavisi alan ve naif RRMS hastalarında ayrı ayrı olmak üzere *IFNG* rs2069727 T/C polimorfizmi açısından farklı genotiplere sahip bireyler arasında yapılan yaşa göre

düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonu karşılaştırmalarında gruplar arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

- Naif RRMS hastaları ile kontrol grubu arasında yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, RRMS ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 1.5 kat ($OR=1.520$, $CI=1.091-2.116$ ve $P=.01$); parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.3 kat ($OR=1.348$, $CI=1.096-1.659$ ve $P=.005$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.13 kat ($OR=1.127$, $CI=1.021-1.245$ ve $P=.02$); lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.10 kat ($OR=1.072$, $CI=1.018-1.129$ ve $P=.008$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.
- GA - naif RRMS grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA tedavisi ile hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 0.80 kat ($OR=0.789$, $CI=0.628-0.992$ ve $P=.04$) ilişkili olduğu bulunmuştur.
- GA - naif RRMS grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, tedavi ile total lezyon sayısı, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.116$, $CI=1.028-1.213$ ve $P=.009$); parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.117$, $CI=1.031-1.211$, ve $P=.007$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.11 kat ($OR=1.110$, $CI=1.023-1.204$ ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.12 kat ($OR=1.118$, $CI=1.031-1.213$ ve $P=.007$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

- GA - naif RRMS grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, tedavi ile kontrast tutan lezyon sayısı, parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 0.39 kat (OR=0.392, CI=0.195-0.787 ve $P=.009$); parametrelerin ayrı ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.44 kat (OR=0.444, CI=0.239-0.827 ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.41 kat (OR=0.410, CI=0.205-0.819 ve $P=.01$); 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.45 kat (OR=0.453, CI=0.247-0.831 ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir.
- GA - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA tedavisi alma durumu ile hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesinin, parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde, yaklaşık 2.43 kat (OR=2.434, CI=1.352-4.382 ve $P=.003$); parametrelerin ayrı incelendiği, lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 2.15 kat (OR=2.148, CI=1.321-3.493 ve $P=.002$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hsa-miR-24-3p'nin GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.
- GA - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA tedavisi alma durumu ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin, tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.17 kat (OR=1.169, CI=1.037-1.318 ve $P=.01$); lipit parametrelerini içermeyen resesif modelde yaklaşık 1.08 kat (OR=1.077, CI=1.016-1.141 ve $P=.01$), dominant modelde yaklaşık 1.07 kat (OR=1.071, CI=1.015-1.129 ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, tek bir parametre olarak incelenen yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin

GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

- Özet olarak, yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri tek bir parametre olarak değerlendirildiğinde, RRMS ile bu parametrenin lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.13 kat (OR=1.127, CI=1.021-1.245 ve $P=.02$); GA tedavisi ile total lezyon sayısı, 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.12 kat (OR=1.118, CI=1.031-1.213 ve $P=.007$); GA tedavisi ile kontrast tutan lezyon sayısı, 3 parametrenin tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içermeyen resesif ve dominant modelde yaklaşık 0.45 kat (OR=0.453, CI=0.247-0.831 ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, GA - kontrol grubunda yapılan lojistik regresyon analizleri sonucunda, GA tedavisi alma durumu ile yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin, tek bir parametre olarak incelendiği lipit parametrelerini içeren resesif ve dominant modelde yaklaşık 1.17 kat (OR=1.169, CI=1.037-1.318 ve $P=.01$) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, tek bir parametre olarak incelenen yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama seviyeleri, plazma hsa-miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyeleri ve hsa-miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin GA'nın farmakodinamik etkisinin moleküler seviyede kontrol grubuna yakınsamaması durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, MS'teki ikili rolü bilinen IFN-gama'nın plazma seviyeleri ile bu seviyeyi etkilediği düşünülen *IFNG* rs2069727 T/C varyasyonu, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyeleri, MS riskine ve engellilik skorlarına etkileri yönünden incelenmiştir. Bu parametrelerin birbirleri ile ilişkileri de incelenmiş ve biyobelirteç olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Ek olarak, miRNA ve IFN-gama seviyeleri GA tedavisi alanlar ile tedavi almayanlar arasında karşılaştırılmış, *IFNG* genotipi, plazma IFN-gama seviyesi ve/veya miRNA

ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Bu parametrelerin birbiri ile olan ilişkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada *IFNG* rs2069727 T/C SNP'si, Türkiye'de ilk kez olmak üzere MS riski açısından incelenmiştir. Ayrıca, hsa-miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyeleri ile ilgili MS'te yapılmış başka bir çalışma literatürde yoktur. Bu nedenle bu çalışma bu konuda da bir ilktir. Ek olarak, çalışmamızla birlikte IFN-gama protein seviyesi ve bu seviyeyi etkilediği düşünülen hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p seviyeleri RRMS tanısı ve GA tedavi yanıtı açısından ilk kez birlikte değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında, MiRNET veri tabanı (2.0) kullanılarak, *IFNG* genini düzenleyen miRNA'lar ve TF'lerin ağı *in silico* analizlerle oluşturulmuştur. Dahası, *IFNG*, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile etkileşimi bulunan ve GA tedavisi ile ilişkilendirilen genler *in silico* analizlerle incelenmiştir. Nihayetinde, araştırdığımız parametreler içerisinde sadece hsa-miR-24-3p ile, GA tedavisiyle ilişkilendirilen genler içerisinde yalnızca *CTSS* ve *CLEC16A* arasında bir etkileşim bulunmuştur. Neticede, GA tedavisi ile ekspresyonu değişen gen havuzunun genişletilmesine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç giderildikten sonra, genlerin IFN-gama, hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p ile ilişkilerinin incelendiği, kontrol, naif ve GA tedavi gruplarını içeren boylamsal çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bu çalışmalar GA'nın farmakodinamik etkisinin gölgede kalan yanlarına ışık tutabilir.

Çalışmamızda, plazma IFN-gama konsantrasyonunun (yaşa göre düzenlenmiş), hsa-miR-24-3p ve hsa-miR-181d-3p rölatif ekspresyon seviyelerinin RRMS için kan tabanlı biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu çalışmada, plazma IFN-gama konsantrasyonuna bakılarak, hastaların GA ile tedaviye uyum durumu yorumlanmış: GA tedavisi alan RRMS hastalarında, IFN-gama'nın yükselmemesi, MSSS puanlarının düşmesi ve EDSS puanlarının iyiye gitmemesinin, RRMS hastalarının GA tedavisine yanıtınlığını gösterme potansiyeline değinilmiştir. Ek olarak, bu tez çalışmasının ortaya koyduğu biyobelirteç adayları, ilerleyen dönemlerde üretilecek olan biyosensör teknolojilerinin, yeni tedavi seçeneklerinin ve daha etkin tanı yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla, çalışmanın bulguları, gelecekteki biyomedikal ürün ve teknolojilerin tasarımına öncülük etme potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca bu çalışma ışığında, yeni çalışmalarla

birlikte gelecekte, hastalık riski, prognozu ve tedaviye verilen yanıt tahmininde verimli sonuçlar için, birden fazla biyobelirteci kapsayan, engellilik skorlarının ve MR lezyonlarının incelendiği yapay zekâ sistemini içeren makine öğrenme algoritmalarının oluşturduğu bir panel geliştirilebilir (Paty vd., 1988; Farina vd., 2017; Michaličková vd., 2022). Bu tez çalışması, ileride erken tanı, MS prognoz takibi ve tedavisi için kullanılabilecek yeni biyosensörler, terapötik ajanlar ve makine öğrenme algoritmalarının geliştirilmesine öncülük edecek potansiyele sahip sonuçlar ortaya koyması nedeniyle Biyomedikal Mühendisliği'ne katkı sağlamaktadır.





KAYNAKLAR

- Abb, J., Abb, H., & Deinhardt, F.** (1984). Age-related decline of human interferon alpha and interferon gamma production. *Blut*, 48(5), 285-289. <https://doi.org/10.1007/BF00320399>
- Abd-El-Basset, E. M., Rao, M. S., & Alsaqobi, A.** (2020). Interferon-Gamma and Interleukin-1Beta Enhance the Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Promotes the Survival of Cortical Neurons in Brain Injury. *Neuroscience Insights*, 15. <https://doi.org/10.1177/2633105520947081>
- Afsar R. Naqvi, J. B. F., & Nares, S.** (2015). miR-24 Regulates Macrophage Polarization and Plasticity. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 06(05). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000362>
- Ali Shokrgozar, M., Sarial, S., Amirzargar, A., Shokri, F., Rezaei, N., Arjang, Z., Radfar, J., Yousefi-Behzadi, M., Ali Sahraian, M., & Lotfi, J.** (2009). IL-2, IFN- γ , and IL-12 gene polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Journal of Clinical Immunology*, 29(6), 747-751. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9310-z>
- Alonso-Hearn, M., Ballesteros, A., Navarro, A., Badia-Bringué, G., & Casais, R.** (2023). Lateral-flow assays for bovine paratuberculosis diagnosis. İçinde *Frontiers in Veterinary Science* (C. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1257488>
- Aranami, T., & Yamamura, T.** (2008). Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergology International*, 57(2), 115-120. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-159>
- Arellano, G., Ottum, P. A., Reyes, L. I., Burgos, P. I., & Naves, R.** (2015). Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 6, Sayı SEP, s. 29). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00492>
- Arjmandi, D., Graeili, Z., Mohammadi, P., Arshadi, M., Jafari Tadi, M., Ardekani, A., Naeimi, R., Abbasi, F., Marhoommirzabak, E., Mahjour, S., Sartip, B., Prasa, H., Fallah Omrani, V., & Rostami, A.** (2023). Chlamydia pneumonia infection and risk of multiple sclerosis: A meta-analysis. İçinde *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (C. 77). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104862>
- Arvin, A. M., Wolinsky, J. S., Kappos, L., Morris, M. I., Reder, A. T., Tornatore, C., Gershon, A., Gershon, M., Levin, M. J., Bezuidenhoudt, M., & Putzki, N.** (2023). for Management. *American Medical Association*, 31-39. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3065>

- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., Donnelly, P., Eichler, E. E., Flicek, P., Gabriel, S. B., Gibbs, R. A., Green, E. D., Hurles, M. E., Knoppers, B. M., Korbel, J. O., Lander, E. S., Lee, C., Lehrach, H., & Schloss, J. A. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68-74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Aydemir O. (2023). *Yeni Nesil Tıpta Yapay Zeka: Teşhis ve Tanı Süreçlerinde Yenilikler* (O. Aydemir, Ed.). Tıp & Yapay Zeka.
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 9(1), 137. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>
- Bakshi R, Thompson A. J., & Rocca M. A. (2008). MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet Neurol*.
- Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T. S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'Alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., & McCauley, J. L. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 45(11), 1353-1362. <https://doi.org/10.1038/ng.2770>
- Betz, R. C., Petukhova, L., Ripke, S., Huang, H., Menelaou, A., Redler, S., Becker, T., Heilmann, S., Yamany, T., Duvic, M., Hordinsky, M., Norris, D., Price, V. H., MacKay-Wiggan, J., De Jong, A., DeStefano, G. M., Moebus, S., Böhm, M., Blume-Peytavi, U., & Christiano, A. M. (2015). Genome-wide meta-analysis in alopecia areata resolves HLA associations and reveals two new susceptibility loci. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms6966>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* (C. 375). <https://www.science.org>
- Bo Wang, S.-H. Hsu S. M., Huang, W., & Ghoshal, K. (2010). TGFB mediated upregulation of hepatic miR-181 hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 29(12), 1787-1797. <https://doi.org/10.1038/nc.2009.468>
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(17), 1945-1961. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7>
- Bölük, C., Börü, Ü. T., Taşdemir, M., & Gezer, T. (2021). Epidemiology of multiple sclerosis in turkey; a ten-year trend in rural cities. *Türk Noroloji Dergisi*, 27(1), 41-45. <https://doi.org/10.4274/tnd.2020.36418>
- Börü, Ü. T., Alp, R., Sur, H., & Gül, L. (2006). Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology*, 27(1), 17-21. <https://doi.org/10.1159/000093895>
- Börü, Ü. T., Duman, A., Kulualp, A. Ş., Güler, N., Taşdemir, M., Yılmaz, Ü., Alp, R., & Bölük, C. (2018). Multiple sclerosis prevalence study the comparison of 3

coastal cities, located in the black sea and mediterranean regions of Turkey.
Medicine (United States), 97(42).
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012856>

- Briggs, F. B. S., Acuna, B., Shen, L., Ramsay, P., Quach, H., Bernstein, A., Bellesis, K. H., Kockum, I. S., Hedström, A. K., Alfredsson, L., Olsson, T., Schaefer, C., & Barcellos, L. F.** (2014). Smoking and risk of multiple sclerosis: Evidence of modification by NAT1 variants. *Epidemiology*, 25(4), 605-614. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000089>
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., & Thompson, A. J.** (2014). Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* (C. 83, Sayı 11, ss. 1022-1024). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>
- Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., Shill, H., Adler, C., Sabbagh, M., Villa, S., Tembe, W., Craig, D., & Van Keuren-Jensen, K.** (2014). Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094839>
- Butterbach, K., Beckmann, L., de Sanjosé, S., Benavente, Y., Becker, N., Foretova, L., Maynadie, M., Cocco, P., Staines, A., Boffetta, P., Brennan, P., & Nieters, A.** (2011). Association of JAK-STAT pathway related genes with lymphoma risk: Results of a European case-control study (EpiLymph). *British Journal of Haematology*, 153(3), 318-333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08632.x>
- Cagliari M.** (2017). Altlas: multiple sclerosis resources in the world, 2008 and 2013. *Il carico della patologia in Sardegna* (ss. 18-18). <http://www.epicentro.iss.it/problemi/sclerosi/epid.asp>
- Cao, F., Liu, T., Sun, S., & Feng, S.** (2017). The role of the miR-99b-5p/mTOR signaling pathway in neuroregeneration in mice following spinal cord injury. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9355-9360. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7816>
- Capone, A., Bianco, M., Ruocco, G., De Bardi, M., Battistini, L., Ruggieri, S., Gasperini, C., Centonze, D., Sette, C., & Volpe, E.** (2019). Distinct expression of inflammatory features in t helper 17 cells from multiple sclerosis patients. *Cells*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/cells8060533>
- Chen, M. L., Yan, B. S., Kozoriz, D., & Weiner, H. L.** (2009). Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF- β - and IFN- γ -dependent mechanisms. *European Journal of Immunology*, 39(12), 3423-3435. <https://doi.org/10.1002/eji.200939441>
- Chen, Q., Xu, J., Li, L., Li, H., Mao, S., Zhang, F., Zen, K., Zhang, C. Y., & Zhang, Q.** (2014). MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death and Disease*, 5(3). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.92>

- Chen, Y. Y., Ho, H. L., Lin, S. C., Ho, T. D., & Hsu, C. Y.** (2018). Upregulation of miR-125b, miR-181d, and miR-221 Predicts Poor Prognosis in MGMT Promoter-Unmethylated Glioblastoma Patients. *American Journal of Clinical Pathology*, 149(5), 412-417. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy008>
- Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., & Dong, C.** (2009). Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity*, 30(4), 576-587. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>
- Clark, L. C., & Lyons, C.** (1962). Electrode Systems For Continuous Monitoring In Cardiovascular Surgery. *Içinde Ann N Y Acad Sci*.
- Comabella, M., & Houry, S. J.** (2012). Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Içinde Clinical Immunology* (C. 142, Sayı 1, ss. 2-8). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.004>
- Comi, G., Filippi, M., & Wolinsky, J. S.** (2001). European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 49(3), 290-297. <https://doi.org/10.1002/ana.64>
- Contini, C., Seraceni, S., Castellazzi, M., Granieri, E., & Fainardi, E.** (2008). Chlamydophila pneumoniae DNA and mRNA transcript levels in peripheral blood mononuclear cells and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neuroscience Research*, 62(1), 58-61. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.05.003>
- Cox, M. B., Cairns, M. J., Gandhi, K. S., Carroll, A. P., Moscovis, S., Stewart, G. J., Broadley, S., Scott, R. J., Booth, D. R., & Lechner-Scott, J.** (2010). MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012132>
- Cruickshank, T., Bartlett, D., Govus, A., Hannan, A., Teo, W. P., Mason, S., Lo, J., & Ziman, M.** (2020). The relationship between lifestyle and serum neurofilament light protein in Huntington's disease. *Brain and Behavior*, 10(5). <https://doi.org/10.1002/brb3.1578>
- Cuzzola, V. F., Palella, E., Celi, D., Barresi, M., Giacoppo, S., Bramanti, P., & Marino, S.** (2012). Pharmacogenomic update on multiple sclerosis: A focus on actual and new therapeutic strategies. *Içinde Pharmacogenomics Journal* (C. 12, Sayı 6, ss. 453-461). <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.41>
- Çelik, Y., Birgili, Ö., Kiyat, A., Güldiken, B., Özkan, H., Yilmaz, H., Saip, S., Kuşçu, D., Süttaş, N., Ağaoğlu, J., Utku, U., & Siva, A.** (2011). Prevalence of multiple sclerosis in the metropolitan area of Edirne city, Turkey. *Balkan Medical Journal*, 28(2), 193-196. <https://doi.org/10.5174/tutfd.2010.04089.0>
- Dawson, J. W.** (1916). The Histology of Disseminated Sclerosis. *Içinde Edinb Med J* (ss. 229-241).

- de Faria, O., Moore, C. S., Kennedy, T. E., Antel, J. P., Bar-Or, A., & Dhaunchak, A. S. (2013).** MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Frontiers in Genetics*, 3(JAN), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00311>
- De Santis, G., Ferracin, M., Biondani, A., Caniatti, L., Rosaria Tola, M., Castellazzi, M., Zagatti, B., Battistini, L., Borsellino, G., Fainardi, E., Gavioli, R., Negrini, M., Furlan, R., & Granieri, E. (2010).** Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 226(1-2), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.06.009>
- Demir, S. (2022).** Expanded Disability Status Scale (EDSS) in Multiple Sclerosis. *Cam and Sakura Medical Journal*, 2(3), 82-89. <https://doi.org/10.4274/csmedj.galenos.2022.2022-11-11>
- Deussing, J., Roth, W., Rommerskirch, W., Wiederanders, B., Von Figura, K., & Peters, C. (1997).** The genes of the lysosomal cysteine proteinases cathepsin B, H, L, and S map to different mouse chromosomes. İçinde *Mammalian Genome* (C. 8).
- Dezfuli, N. K., Adcock, I. M., Alipoor, S. D., Seyfi, S., Salimi, B., Mafi Golchin, M., Dalil Roofchayee, N., Varhram, M., & Mortaz, E. (2020).** The miR-146a SNP Rs2910164 and miR-155 SNP rs767649 Are Risk Factors for Non-Small Cell Lung Cancer in the Iranian Population. *Canadian Respiratory Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8179415>
- Dhiman, K., Gupta, V. B., Villemagne, V. L., Eratne, D., Graham, P. L., Fowler, C., Bourgeat, P., Li, Q. X., Collins, S., Bush, A. I., Rowe, C. C., Masters, C. L., Ames, D., Hone, E., Blennow, K., Zetterberg, H., & Martins, R. N. (2020).** Cerebrospinal fluid neurofilament light concentration predicts brain atrophy and cognition in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/dad2.12005>
- DiSano, K. D., Royce, D. B., Gilli, F., & Pachner, A. R. (2019).** Central Nervous System Inflammatory Aggregates in the Theiler's Virus Model of Progressive Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 10, 1821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01821>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2018).** Multiple sclerosis – a review. İçinde *European Journal of Neurology* (C. 26, Sayı 1, ss. 27-40). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Donati, D. (2020).** Viral infections and multiple sclerosis. İçinde *Drug Discovery Today: Disease Models* (C. 32, ss. 27-33). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2020.02.003>
- Dos Passos, G. R., Sato, D. K., Becker, J., & Fujihara, K. (2016).** Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5314541>
- Du, W. W., Fang, L., Li, M., Yang, X., Liang, Y., Peng, C., Qian, W., O'Malley, Y. Q., Askeland, R. W., Sugg, S. L., Qian, J., Lin, J., Jiang, Z., Yee, A. J., Sefton, M., Deng, Z., Shan, S. W., Wang, C. H., & Yang, B. B. (2013).**

- Microrna mir-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling. *Journal of Cell Science*, 126(6), 1440-1453. <https://doi.org/10.1242/jcs.118299>
- Efendi, H., & Yandım Kuşçu, D.** (2018). *Multipl Skleroz Tani ve Tedavi Kılavuzu*. Galenos Yayınevi.
- Eftekharian, M. M., Komaki, A., Mazdeh, M., Arsang-Jang, S., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S.** (2019). Expression Profile of Selected MicroRNAs in the Peripheral Blood of Multiple Sclerosis Patients: a Multivariate Statistical Analysis with ROC Curve to Find New Biomarkers for Fingolimod. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01294-z>
- Eggert, M., Goertsches, R., Seeck, U., Dilk, S., Neeck, G., & Zettl, U. K.** (2008). Changes in the activation level of NF-kappa B in lymphocytes of MS patients during glucocorticoid pulse therapy. *Journal of the Neurological Sciences*, 264(1-2), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.026>
- Ehya, F., Tehrani, H. A., Garshasbi, M., & Nabavi, S. M.** (2017). Identification of miR-24 and miR-137 as novel candidate multiple sclerosis miRNA biomarkers using multi-staged data analysis protocol. *Molecular Biology Research Communications*, 6(3), 127-140. <https://doi.org/10.22099/mbrc.2017.24861.1256>
- Essa, E. S., Meshaal, S. S., Mounir, A. N., & Abouelatta, Z. M.** (2024). Study of TP53 Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients. *Menoufia Medical Journal*, 36(4). <https://doi.org/10.59204/2314-6788.1063>
- Farina, G., Magliozzi, R., Pitteri, M., Reynolds, R., Rossi, S., Gajofatto, A., Benedetti, M. D., Facchiano, F., Monaco, S., & Calabrese, M.** (2017). Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: A combined CSF and MRI study. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0812-y>
- Fayyad-Kazan, H., Hamade, E., Rouas, R., Najar, M., Fayyad-Kazan, M., El Zein, N., ElDirani, R., Hussein, N., Fakhry, M., Al-Akoum, C., Burny, A., Martiat, P., & Badran, B.** (2014). Downregulation of microRNA-24 and -181 parallels the upregulation of IFN- γ secreted by activated human CD4 lymphocytes. *Human Immunology*, 75(7), 677-685. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.01.007>
- Feinbaum, R., Ambros, V., & Lee, R.** (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 116(116), 843-854.
- Finkelsztejn, A.** (2014). Multiple sclerosis: Overview of Disease-Modifying agents. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 65-72. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13213>
- Furlan, R., Bergami, A., Lang, R., Brambilla, E., Franciotta, D., Martinelli, V., Comi, G., Panina, P., & Martino, G.** (2000). Interferon- β treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing

interferon- γ and interleukin-4. *Journal of Neuroimmunology*, 111(1-2), 86-92.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00377-5)

- Furlan, R., Brambilla, E., Ruffini, F., Poliani, P. L., Bergami, A., Marconi, P. C., Franciotta, D. M., Penna, G., Comi, G., Adorini, L., & Martino, G. (2001).** Intrathecal Delivery of IFN-Protects C57BL/6 Mice from Chronic-Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Apoptosis of Central Nervous System-Infiltrating Lymphocytes 1. İçinde *The Journal of Immunology* (C. 167). <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/167/3/1821/1141978/1821.pdf>
- Gandhi, R., Healy, B., Gholipour, T., Egorova, S., Musallam, A., Hussain, M. S., Nejad, P., Patel, B., Hei, H., Khoury, S., Quintana, F., Kivisakk, P., Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2013).** Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 73(6), 729-740.
<https://doi.org/10.1002/ana.23880>
- Ganji, A., Ebrahimi, M., Shapoori, S., Nourbakhsh, P., & Ghazavi, A. (2020).** Cytokine Effects of interferon and glatiramer acetate on cytokine patterns in multiple sclerosis patients. *Cytokine*, 126(October 2019), 154911.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154911>
- García Garzón, J. R., de Arcocha Torres, M., Delgado-Bolton, R., Ceci, F., Alvarez Ruiz, S., Orcajo Rincón, J., Caresia Aróztegui, A. P., García Velloso, M. J., & García Vicente, A. M. (2018).** 68Ga-PSMA PET/CT in prostate cancer. *Revista Espanola de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*, 37(2), 130-138.
<https://doi.org/10.1016/j.remnm.2017.07.004>
- Garg, N., & Smith, T. W. (2015).** An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*, 5(9), 1-13.
<https://doi.org/10.1002/brb3.362>
- Gatta, V., Mengod, G., Reale, M., & Tata, A. M. (2020).** Possible correlation between cholinergic system alterations and neuro/inflammation in multiple sclerosis. *Biomedicines*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8060153>
- Ge, F., Ding, J., Liu, Y., Lin, H., & Chang, T. (2018).** Cerebrospinal fluid NFL in the differential diagnosis of parkinsonian disorders: A meta-analysis. *Neuroscience Letters*, 685, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.030>
- Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E. (2016).** Multiple sclerosis: Pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *Cell Journal*, 19(1), 1-10.
- Graves, M. C., Benton, M., Lea, R. A., Boyle, M., Tajouri, L., Macartney-Coxson, D., Scott, R. J., & Lechner-Scott, J. (2014).** Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4+ T-Cells are associated with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(8), 1033-1041.
<https://doi.org/10.1177/1352458513516529>
- Greer, J. M. (2015).** The role of HLA in MS susceptibility and phenotype. İçinde *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (C. 26). Springer Verlag.
https://doi.org/10.1007/7854_2014_357
- Grossman, I., Avidan, N., Singer, C., Goldstaub, D., Hayardeny, L., Eyal, E., Ben-Asher, E., Paperna, T., Pe'er, I., Lancet, D., Beckmann, J. S., & Miller, A.**

- (2007). Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis reveals drug-response markers. İçinde *Pharmacogenetics and Genomics* (C. 17). Lippincott Williams & Wilkins.
- Grzegorski, T., & Losy, J.** (2019). Multiple sclerosis-the remarkable story of a baffling disease. *Reviews in the Neurosciences*, 30(5), 511-526. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0074>
- Hain, H. S., Pandey, R., Bakay, M., Strenkowski, B. P., Harrington, D., Romer, M., Motley, W. W., Li, J., Lancaster, E., Roth, L., Grinspan, J. B., Scherer, S. S., & Hakonarson, H.** (2021). Inducible knockout of Clec16a in mice results in sensory neurodegeneration. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88895-0>
- Hanak, B. W., Bonow, R. H., Harris, C. A., & Browd, S. R.** (2017). Cerebrospinal Fluid Shunting Complications in Children. İçinde *Pediatric Neurosurgery* (C. 52, Sayı 6, ss. 381-400). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000452840>
- Hankey, B. F., Ries, L. A., Kosary, C. L., Feuer, E. J., Merrill, R. M., Clegg, L. X., & Edwards, B. K.** (2000). Partitioning linear trends in age-adjusted rates. *Cancer Causes and Control*, 11(1), 31-35. <https://doi.org/10.1023/A:1008953201688>
- Hanton, A. J., Scott, F., Stenzel, K., Nausch, N., Zdesenko, G., Mduluz, T., & Mutapi, F.** (2022). Frequency distribution of cytokine and associated transcription factor single nucleotide polymorphisms in Zimbabweans: Impact on schistosome infection and cytokine levels. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(6), e0010536. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010536>
- He, S., Wang, B., Zhu, X., Chen, Z., Chen, J., Hua, D., Droma, D., Li, W., Yuan, D., & Jin, T.** (2017). Association of IFNGR1 and IFNG genetic polymorphisms with the risk for pulmonary tuberculosis in the Chinese Tibetan population. www.impactjournals.com/oncotarget
- Healy BC, Ali EN, & Guttmann C. R.** (2009). Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol*.
- Hennig, B. J., Fielding, K., Broxholme, J., Diatta, M., Mendy, M., Moore, C., Pollard, A. J., Rayco-Solon, P., Sirugo, G., van der Sande, M. A., Waight, P., Whittle, H. C., Zaman, S. M., Hill, A. V., & Hall, A. J.** (2008). Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection. *PLoS ONE*, 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001898>
- Hickey, W. F.** (1999). The pathology of multiple sclerosis: A historical perspective. *Journal of Neuroimmunology*, 98(1), 37-44. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00079-X)
- Hohol, M. J., Orav, E. J., & Weiner, H. L.** (1999). Disease steps in multiple sclerosis: A longitudinal study comparing Disease Steps and EDSS to evaluate disease progression. *Multiple Sclerosis*, 5(5), 349-354. <https://doi.org/10.1177/135245859900500508>
- Hong, J., Li, N., Zhang, X., Zheng, B., & Zhang, J. Z.** (2005). Induction of CD4 CD25 regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. <https://www.pnas.org>

- Huang, W. J., Chen, W. W., & Zhang, X.** (2017). Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3163-3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4410>
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H. J., Waisman, A., & Kuhlmann, C. R. W.** (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*, 24(4), 1023-1034. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>
- Ibrahim, S. H., El-Mehdawy, K. M., Seleem, M., El-Sawalhi, M. M., & Shaheen, A. A.** (2020). Serum ROCK2, miR-300 and miR-450b-5p levels in two different clinical phenotypes of multiple sclerosis: Relation to patient disability and disease progression. *Journal of Neuroimmunology*, 347(March), 577356. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577356>
- Igra, M. S., Paling, D., Wattjes, M. P., Connolly, D. J. A., & Hoggard, N.** (2017). Multiple sclerosis update: Use of MRI for early diagnosis, disease monitoring and assessment of treatment related complications. İçinde *British Journal of Radiology* (C. 90, Sayı 1074). British Institute of Radiology. <https://doi.org/10.1259/bjr.20160721>
- Iversen, L. L., & Glowinski, J.** (1966). Regional Studies of Catecholamines in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 13(8), 671-682. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb09874.x>
- Janet E., Richard B. Johnston, J.** (2002). Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future. İçinde *Brain* (C. 125, Sayı 8). <https://doi.org/10.1093/brain/awf170>
- Jernås, M., Malmeström, C., Axelsson, M., Nookaew, I., Wadenvik, H., Lycke, J., & Olsson, B.** (2013). MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS). *BMC Immunology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-32>
- Jezrom B. Fordham, Afsar R. Naqvi, & Salvador Nares.** (2015). miR-24 Regulates Macrophage Polarization and Plasticity. *J Clin Cell Immunology*, 176(3), 139-148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY>
- Jiang, T., Wang, J., Li, C., Cao, G., & Wang, X.** (2022). Prohibitins: A Key Link between Mitochondria and Nervous System Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7494863>
- Jing, P., Xie, N., Zhao, N., Zhu, X., Li, P., Gao, G., Dang, H., Gu, Z., & Teng, Z.** (2020). MiR-24-3p/KLF8 Signaling Axis Contributes to LUAD Metastasis by Regulating EMT. *Journal of Immunology Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4036047>
- Joshi, Y., Sória, M. G., Quadrato, G., Inak, G., Zhou, L., Hervera, A., Rathore, K. I., Elnaggar, M., Magali, C., Marine, J. C., Puttagunta, R., & Di Giovanni, S.** (2015). The MDM4/MDM2-p53-IGF1 axis controls axonal regeneration, sprouting and functional recovery after CNS injury. *Brain*, 138(7), 1843-1862. <https://doi.org/10.1093/brain/awv125>

- Joy, J. E., & Johnston, R. B.** (2001). Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future. *National Academies Press* (US). Institute of Medicine (US) Committee on Multiple Sclerosis. <https://doi.org/10.17226/10031>
- Kantarci, O. H., Hebrink, D. D., Schaefer-Klein, J., Sun, Y., Achenbach, S., Atkinson, E. J., Heggarty, S., Cotleur, A. C., De Andrade, M., Vandenbroeck, K., Pelfrey, C. M., & Weinshenker, B. G.** (2008). Interferon gamma allelic variants: Sex-biased multiple sclerosis susceptibility and gene expression. *Archives of Neurology*, 65(3), 349-357. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.66>
- Kappos, L., Freedman, M. S., Polman, C. H., Edan, G., Hartung, H. P., Miller, D. H., Montalbán, X., Barkhof, F., Radü, E. W., Bauer, L., Dahms, S., Lanius, V., Pohl, C., & Sandbrink, R.** (2007). Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*, 370(9585), 389-397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61194-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61194-5)
- Kausar, S. A.** (2020). *Multiple sclerosis*. Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.LET.20.5.7>
- Kavaliunas, A., Danylaite Karrenbauer, V., & Hillert, J.** (2021). Socioeconomic consequences of multiple sclerosis—A systematic literature review. İçinde *Acta Neurologica Scandinavica* (C. 143, Sayı 6, ss. 587-601). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ane.13411>
- Keller, A., Leidinger, P., Lange, J., Borries, A., Schroers, H., Scheffler, M., Lenhof, H. P., Ruprecht, K., & Meese, E.** (2009). Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007440>
- Keskin, M., & Arslan, F.** (2020). Biyosensörler. *Gazi Üni Fen Fak Dergisi*. <http://sci-fac-j.gazi.edu.tr/>
- Khademi, M., Kockum, I., Andersson, M. L., Iacobaeus, E., Brundin, L., Sellebjerg, F., Hillert, J., Piehl, F., & Olsson, T.** (2010). Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis : a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple Sclerosis Journal*. <https://doi.org/10.1177/1352458510389102>
- Kister, I., Bacon, T. E., Chamot, E., Salter, A. R., Cutter, G. R., Kalina, J. T., & Herbert, J.** (2013). Natural history of multiple sclerosis symptoms. *International Journal of MS Care*, 15(3), 146-158. <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2012-053>
- Kuhle, J., Barro, C., Disanto, G., Mathias, A., Sonesson, C., Bonnier, G., Yaldizli, Ö., Regeniter, A., Derfuss, T., Canales, M., Schlupe, M., Du Pasquier, R., Krueger, G., & Granziera, C.** (2016). Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Multiple Sclerosis*, 22(12), 1550-1559. <https://doi.org/10.1177/1352458515623365>
- Kulakova, O., Bashinskaya, V., Kiselev, I., Baulina, N., Tsareva, E., Nikolaev, R., Kozin, M., Shchur, S., Favorov, A., Boyko, A., & Favorova, O.** (2017).

- Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis: The impact of genome-wide association studies identified disease risk loci. *Pharmacogenomics*, 18(17), 1563-1574. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0058>
- Kumar, A., & Ghosh, B.** (2008). A single nucleotide polymorphism (A → G) in intron 3 of IFN γ gene is associated with asthma. *Genes and Immunity*, 9(4), 294-301. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.17>
- Kurtzke, J.** (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, Nov;33(11), 1444-52.
- Kurtzke, J. F.** (2015). On the origin of EDSS. İçinde *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (C. 4, Sayı 2, ss. 95-103). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.02.003>
- Lahiri, D. K., & Schnabel, B.** (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical Genetics*, 31(7-8), 321-328. <https://doi.org/10.1007/bf02401826>
- Lange, T., Stracke, S., Rettig, R., Lendeckel, U., Kuhn, J., Schlüter, R., Rippe, V., Endlich, K., & Endlich, N.** (2017). Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS ONE*, 12(8), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183435>
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J. S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G. S., Bartley, C. M., Schubert, R. D., Hawes, I. A., Vazquez, S. E., Iyer, M., Zuchero, J. B., Teegen, B., Dunn, J. E., Lock, C. B., Kipp, L. B., & Robinson, W. H.** (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900), 321-327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>
- Lees, J. R., & Cross, A. H.** (2007). IFN- γ demyelination and multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(2), 297-299. <https://doi.org/10.1172/JCI31254>.have
- Li, H., Liu, F., Zhu, H., Zhou, X., Lu, J., Chang, H., & Hu, J.** (2016). Interaction between polymorphisms of IFN- γ and MICA correlated with hepatocellular carcinoma. *Medical Science Monitor*, 22, 549-553. <https://doi.org/10.12659/MSM.895101>
- Lindberg, R. L. P., Hoffmann, F., Mehling, M., Kuhle, J., & Kappos, L.** (2010). Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *European Journal of Immunology*, 40(3), 888-898. <https://doi.org/10.1002/eji.200940032>
- Link, J., Söderström, M., Olsson, T., Höjeberg, B., Ljungdahl, Å., & Link, H.** (1994). Increased transforming growth factor- β , interleukin-4, and interferon- γ in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 36(3), 379-386. <https://doi.org/10.1002/ana.410360309>
- Liu, Y., Zhang, G., Guan, Y., Zhao, X., Wang, Q., Li, H., & Qi, J.** (2020). Association of IFN- γ polymorphisms with ankylosing spondylitis risk. *Journal of*

- Cellular and Molecular Medicine*, 24(18), 10615-10620.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15680>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loma, I., & Heyman, R.** (2011). Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Current Neuropharmacology*, 9(3), 409-416.
<https://doi.org/10.2174/157015911796557911>
- Lorenzi, J. C. C., Brum, D. G., Zanette, D. L., De Paula Alves Souza, A., Barbuzano, F. G., Dos Santos, A. C., Barreira, A. A., & Da Silva, W. A.** (2012). miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. *International Journal of Neuroscience*, 122(8), 466-471. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.678444>
- Lünemann, J. D., Jelčić, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., & Münz, C.** (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- γ and IL-2. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1763-1773.
<https://doi.org/10.1084/jem.20072397>
- Machowska, M., Galka-Marciniak, P., & Kozłowski, P.** (2022). Consequences of genetic variants in miRNA genes. İçinde *Computational and Structural Biotechnology Journal* (C. 20, ss. 6443-6457). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.036>
- Manna, I., Iaccino, E., Dattilo, V., Barone, S., Vecchio, E., Mimmi, S., Filippelli, E., Demonte, G., Polidoro, S., Granata, A., Scannapieco, S., Quinto, I., Valentino, P., & Quattrone, A.** (2018). Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients. *The FASEB Journal*, 32(8), 4241-4246. <https://doi.org/10.1096/fj.201701533R>
- Mansoor, S. R., Ghasemi-Kasman, M., & Yavarpour-Bali, H.** (2020). The role of microRNAs in multiple sclerosis. İçinde *International Reviews of Immunology*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1826474>
- Marques, T. M., Van Rumund, A., Oeckl, P., Kuiperij, H. B., Esselink, R. A. J., Bloem, B. R., Otto, M., & Verbeek, M. M.** (2019). Serum NFL discriminates Parkinson disease from atypical parkinsonisms. *Neurology*, 92(13), E1479-E1486. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007179>
- Martinelli-Boneschi, F., Fenoglio, C., Brambilla, P., Sorosina, M., Giacalone, G., Esposito, F., Serpente, M., Cantoni, C., Ridolfi, E., Rodegher, M., Moiola, L., Colombo, B., De Riz, M., Martinelli, V., Scarpini, E., Comi, G., & Galimberti, D.** (2012). MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neuroscience Letters*, 508(1), 4-8.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.006>
- Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. J., Mestre, L., Feliú, A., & Guaza, C.** (2013). Viral models of multiple sclerosis: Neurodegeneration and demyelination in mice

infected with Theiler's virus. İçinde *Progress in Neurobiology* (C. 101-102, Sayı 1, ss. 46-64). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.11.003>

- Melnikov, M., Sharanova, S., Sviridova, A., Rogovskii, V., Murugina, N., Nikolaeva, A., Dagil, Y., Murugin, V., Ospelnikova, T., Boyko, A., & Pashenkov, M.** (2020). The influence of glatiramer acetate on Th17-immune response in multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 15(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240305>
- Michaličková, D., Öztürk, H. K., Das, D., Bukhari, S. O., & Slanař, O.** (2022). Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 72(2), 127-148. <https://doi.org/10.5937/arhfarm72-36165>
- Mohamed, D. A. W., Selim, H. M., Elmazny, A., Genena, A., & Nabil, M. M.** (2022). Apoptotic protease activating factor-1 gene and MicroRNA-484: A possible interplay in relapsing remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103502>
- Montalvo Villalba, M. C., Valdés Ramírez, O., Muné Jiménez, M., Arencibia Garcia, A., Martínez Alfonso, J., González Baéz, G., Roque Arrieta, R., Rosell Simón, D., Álvarez Gainza, D., Sierra Vázquez, B., Resik Aguirre, S., & Guzmán Tirado, M. G.** (2020). Interferon gamma, TGF-β1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients. *Clinical Immunology*, 220, 108576. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108576>
- Moutsianas L, Jostins L, B. A.** (2015). Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*.
- Naves, R., Singh, S. P., Cashman, K. S., Rowse, A. L., Axtell, R. C., Steinman, L., Mountz, J. D., Steele, C., De Sarno, P., & Raman, C.** (2013). The Interdependent, Overlapping, and Differential Roles of Type I and II IFNs in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 191(6), 2967-2977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300419>
- Oladejo, A. O., Li, Y., Imam, B. H., Ma, X., Shen, W., Wu, X., Jiang, W., Yang, J., Lv, Y., Ding, X., Wang, S., & Yan, Z.** (2022). MicroRNA miR-24-3p Mediates the Negative Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Endometrial Inflammatory Response by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). *Journal of Inflammation Research*, 15(February), 807-825. <https://doi.org/10.2147/JIR.S347293>
- Otaegui, D., Baranzini, S. E., Armañanzas, R., Calvo, B., Muñoz-Culla, M., Khankhanian, P., Inza, I., Lozano, J. A., Castillo-Triviño, T., Asensio, A., Olaskoaga, J., & Lopez de Munain, A.** (2009). Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *Plos one*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006309>
- Öztürk, S., Aytaç, G., Kızılay, F., & Sindel, M.** (2016). Multiple Sclerosis. *Akdeniz Medical Journal*, 3(3), 137-147. <https://doi.org/10.17954/amj.2017.86>
- Pachner, A. R., & Steiner, I.** (2009). The multiple sclerosis severity score (MSSS) predicts disease severity over time. *Journal of the Neurological Sciences*, 278(1-2), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.11.020>

- Pandey, R., Bakay, M., Strenkowski, B. P., Hain, H. S., & Hakonarson, H.** (2021). JAK/STAT inhibitor therapy partially rescues the lipodystrophic autoimmune phenotype in Clec16a KO mice. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86493-8>
- Patsopoulos, N. A., Baranzini, S. E., Santaniello, A., Shoostari, P., Cotsapas, C., Wong, G., Beecham, A. H., James, T., Replogle, J., Vlachos, I. S., McCabe, C., Pers, T. H., Brandes, A., White, C., Keenan, B., Cimpean, M., Winn, P., Panteliadis, I. P., Robbins, A., & De Jager, P. L.** (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460). <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- Paul, A., Comabella, M., & Gandhi, R.** (2019). Biomarkers in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029058>
- Paul, W. E., & Zhu, J.** (2010). How are TH2-type immune responses initiated and amplified? İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 10, Sayı 4, ss. 225-235). <https://doi.org/10.1038/nri2735>
- Peng, Y., & Croce, C. M.** (2016). The role of microRNAs in human cancer. İçinde *Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Petrovic, D. M.** (2016). *Tuberculosis: Epidemiology And Host Susceptibility In North West England*.
- Philippe, C., Walusinski, O., & De, M.-élisabeth-antoinette B.** (1933). *Un manuscrit de 1903 ressuscité : « Des troubles cérébraux dans la sclérose en plaques » Raymond Cestan (1872-1933) et.* 1-11.
- Pike, S. C., Welsh, N., Linzey, M., & Gilli, F.** (2022). Theiler's virus-induced demyelinating disease as an infectious model of progressive multiple sclerosis. İçinde *Frontiers in Molecular Neuroscience* (C. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1019799>
- Plavina, T., Subramanyam, M., Bloomgren, G., Richman, S., Pace, A., Lee, S., Schlain, B., Campagnolo, D., & Belachew, S.** (2014). *Anti – JC Virus Antibody Levels in Serum or Plasma Further Define Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*. <https://doi.org/10.1002/ana.24286>
- Podshivalova, K., & Salomon, D. R.** (2013). MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: Modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development. *Critical Reviews in Immunology*, 33(5), 435-476. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2013006858>
- Prod'homme, T., & Zamvil, S. S.** (2019). The evolving mechanisms of action of glatiramer acetate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029249>
- Pua, H. H., Steiner, D. F., Patel, S., Gonzalez, J. R., Ortiz-Carpena, J. F., Kageyama, R., Chiou, N. T., Gallman, A., de Kouchkovsky, D., Jeker, L. T., McManus, M. T., Erle, D. J., & Ansel, K. M.** (2016). MicroRNAs 24 and 27 Suppress Allergic Inflammation and Target a Network of Regulators of T Helper

2 Cell-Associated Cytokine Production. *Immunity*, 44(4), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.003>

- Rahimirad, S., Navaderi, M., Alaei, S., & Sanati, M. H.** (2021). Identification of hsa-miR-106a-5p as an impact agent on promotion of multiple sclerosis using multi-step data analysis. *Neurological Sciences*, 42(9), 3791-3799. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04979-1>
- Rashighi, M., & Harris, J. E.** (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & behavior*, 176(3), 139-148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.014>.CagY
- Regev, K., Healy, B. C., Paul, A., Diaz-Cruz, C., Mazzola, M. A., Raheja, R., Glanz, B. I., Kivisäkk, P., Chitnis, T., Jagodic, M., Piehl, F., Olsson, T., Khademi, M., Hauser, S., Oksenberg, J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., & Gandhi, R.** (2018). Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 5(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000491>
- Reiner Benecke, Zettl, U. K., To, D., & Degree, A.** (2014). MicroRNA and MessengerRNA Expression Changes during Interferon-beta and Glatiramer Acetate Treatment in Peripheral Blood Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neuroimmunology*, .
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelli, A. E., Bettlinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G.** (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901-906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Revel, M., Chebath, J., Harroch, S., Mangelus, M., & Moviglia, G.** (1995). Mechanism of interferon-beta action in multiple sclerosis direct inhibition of interferon-gamma signal transduction and reduction of interferon-gamma serum levels in patients. *Journal of Neuroimmunology*, 56-63, 72-72. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(95\)99113-w](https://doi.org/10.1016/0165-5728(95)99113-w)
- Rijvers, L., Melief, M.-J., van Langelaar, J., van der Vuurst de Vries, R. M., Wierenga-Wolf, A. F., Koetzier, S. C., Priatel, J. J., Jorritsma, T., van Ham, S. M., Hintzen, R. Q., & van Luijn, M. M.** (2020). The Role of Autoimmunity-Related Gene CLEC16A in the B Cell Receptor–Mediated HLA Class II Pathway . *The Journal of Immunology*, 205(4), 945-956. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901409>
- Rovira, Á., Wattjes, M. P., Tintoré, M., Tur, C., Yousry, T. A., Sormani, M. P., De Stefano, N., Filippi, M., Auger, C., Rocca, M. A., Barkhof, F., Fazekas, F., Kappos, L., Polman, C., Miller, D., & Montalban, X.** (2015). Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis - Clinical implementation in the diagnostic process. *Nature Reviews Neurology*, 11(8), 471-482. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.106>
- Roxburgh, R. H. S. R., Seaman, S. R., Masterman, T., Hensiek, A. E., Sawcer, S. J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., Le Page, E., Edan, G., McDonnell, G. V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M. G., Tesser, F., Leone, M. A., & Compston, D. A. S.** (2005). Multiple sclerosis severity score: Using disability and disease duration to rate

- disease severity. *Neurology*, 64(7), 1144-1151. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8>
- Sarchielli, P., Trequattrini, A., Usai, F., Murasecco, D., & Gallai, V.** (1993). Role of viruses in the etiopathogenesis of multiple sclerosis. *Acta neurologica*, 15(5), 363-381.
- Sawcer, S.** (2008). The complex genetics of multiple sclerosis: Pitfalls and prospects. *Brain*, 131(12), 3118-3131. <https://doi.org/10.1093/brain/awn081>
- Saxe, D. F., Takahashi, N., Hood, L., & Simon1-, M. I.** (1985). Localization of the human myelin basic protein gene (MBP) to region 18q22->qter by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*.
- Schirmer L., Schafer, P., Bartels, T., & Calabresi P., A.** (2021). *Trends Immunol.* 42(3): 228–247. doi:10.1016/j.it.2021.01.005.
- Schleinitz, D., Distefano, J. K., & Kovacs, P.** (2011). Targeted SNP genotyping using the taqman® assay. *Methods in Molecular Biology*, 700(3), 77-87. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3_6
- Schuster, C., Gerold, K. D., Schober, K., Probst, L., Boerner, K., Kim, M. J., Ruckdeschel, A., Serwold, T., & Kissler, S.** (2015). The Autoimmunity-Associated Gene CLEC16A Modulates Thymic Epithelial Cell Autophagy and Alters T Cell Selection. *Immunity*, 42(5), 942-952. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.011>
- Service, M., & Chen, T.** (2008). Standard Data Analysis Report. *Analysis*.
- Sevim, S.** (2016). Multipl skleroz atakları üzerine güncelleme: Tanım, patofizyoloji, özellikler, taklitçiler ve tedavi. *Turk Noroloji Dergisi*, 22(3), 99-108. <https://doi.org/10.4274/tnd.75318>
- Shademan, B., Nourazarian, A., Nikanfar, M., Biray Avci, C., Hasanpour, M., & Isazadeh, A.** (2020). Investigation of the miRNA146a and miRNA155 gene expression levels in patients with multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 78, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.04.071>
- Sheremata, W., & Campos, Y.** (2016). Mechanisms of action of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis: A Mechanistic View*, 339-363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800763-1.00014-2>
- Siege, S. R., MacKenzie, J., Chaplin, G., Jablonski, N. G., & Griffiths, L.** (2012). Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 6219-6225. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1441-7>
- Sievers, C., Meira, M., Hoffmann, F., Fontoura, P., Kappos, L., & Lindberg, R. L. P.** (2012). Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis. Towards a better understanding of treatment effects. *Clinical Immunology*, 144(1), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.04.002>
- Simpson, S., Stewart, N., Van Der Mei, I., Otahal, P., Charlesworth, J., Ponsonby, A. L., Blizzard, L., Dwyer, T., Pittas, F., Gies, P., & Taylor, B.** (2015). Stimulated PBMC-produced IFN- γ and TNF- α are associated with altered relapse risk in multiple sclerosis: Results from a prospective cohort study. *Journal of*

Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 86(2), 200-207.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307336>

- Singh, J., Deshpande, M., Suhail, H., Rattan, R., & Giri, S.** (2016). Targeted Stage-Specific Inflammatory microRNA Profiling in Urine During Disease Progression in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Markers of Disease Progression and Drug Response. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 11(1), 84-97. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9630-0>
- Skurkovich, S., Boiko, A., Beliaeva, I., Buglak, A., Alekseeva, T., Smirnova, N., Kulakova, O., Tchechonin, V., Gurova, O., Deomina, T., Favorova, O. O., Skurkovich, B., & Gusev, E.** (2001). Randomized study of antibodies to IFN- γ and TNF- α in secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 7(5), 277-284. <https://doi.org/10.1191/135245801681137960>
- Smith, B. C., Smith, B. C., Sinyuk, M., Jenkins, J. E., Psenicka, M. W., Williams, J. L., & Williams, J. L.** (2020). The impact of regional astrocyte interferon- γ signaling during chronic autoimmunity: A novel role for the immunoproteasome. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01861-x>
- Smith, B., Treadwell, J., Zhang, D., Ly, D., Mckinnell, I., Roy Walker, P., & Sikorska, M.** (2010). Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011109>
- Sohan Forooshan Moghadam, A., Ataei, M., Arabzadeh, G., Falahati, K., Roshani, F., & Sanati, M. H.** (2020). Analysis of MicroRNA-18a Expression in Multiple Sclerosis Patients. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 8(4), 429-437.
- Soleimanpour, S. A., Gupta, A., Bakay, M., Ferrari, A. M., Groff, D. N., Fadista, J., Spruce, L. A., Kushner, J. A., Groop, L., Seeholzer, S. H., Kaufman, B. A., Hakonarson, H., & Stoffers, D. A.** (2014). The diabetes susceptibility gene Clec16a regulates mitophagy. *Cell*, 157(7), 1577-1590. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.016>
- Søndergaard, H. B., Hesse, D., Krakauer, M., Sørensen, P. S., & Sellebjerg, F.** (2013). Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(14), 1849-1857. <https://doi.org/10.1177/1352458513490542>
- Song, M. K., Park, Y. K., & Ryu, J. C.** (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1), 130-139. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.016>
- Soyocak, A.** (2018). MikroRNA Polimorfizmleri ve Kanser. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1(1), 1-18.
- Stadelmann, C., Wegner, C., & Brück, W.** (2011). Inflammation, demyelination, and degeneration - Recent insights from MS pathology. *Biochimica et Biophysica*

Acta - Molecular Basis of Disease, 1812(2), 275-282.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.007>

- Stern, J. N. H., Keskin, D. B., Zhang, H., Lv, H. J., Kato, Z., & Strominger, J. L.** (2008). Amino acid copolymer-specific IL-10-secreting regulatory T cells that ameliorate autoimmune diseases in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5172-5176.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0712131105>
- Stevenson-Hoare, J., Heslegrave, A., Leonenko, G., Fathalla, D., Bellou, E., Luckcuck, L., Marshall, R., Sims, R., Morgan, B. P., Hardy, J., de Strooper, B., Williams, J., Zetterberg, H., & Escott-Price, V.** (2023). Plasma biomarkers and genetics in the diagnosis and prediction of Alzheimer's disease. *Brain*, 146(2), 690-699. <https://doi.org/10.1093/brain/awac128>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A.** (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Su, J.-L., Chen, P.-S., Johansson, G., & Kuo, M.-L.** (2012). Function and Regulation of Let-7 Family microRNAs. *MicroRNA*, 1(1), 34-39.
<https://doi.org/10.2174/2211536611201010034>
- Su, X. W., Lu, G., Leung, C. K., Liu, Q., Li, Y., Tsang, K. S., Zhao, S. D., Chan, D. T. M., Kung, H. F., & Poon, W. S.** (2017). miR-181d regulates human dendritic cell maturation through NF- κ B pathway. *Cell Proliferation*, 50(5), 1-12. <https://doi.org/10.1111/cpr.12358>
- Su, X., Yu, Y., Zhong, Y., Giannopoulou, E. G., Hu, X., Liu, H., Cross, J. R., R  tsch, G., Rice, C. M., & Ivashkiv, L. B.** (2015). Interferon- γ regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nature Immunology*, 16(8), 838-849. <https://doi.org/10.1038/ni.3205>
- Subramanyam, M., Ph, D., Goelz, S., Ph, D., Natarajan, A., Lee, S., Ph, D., Plavina, T., Ph, D., Scanlon, J. V., Pharm, D., Sandroek, A., & Bozic, C.** (2023). Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *The new england journal of medicine*.
- Sun, Q., Zhang, Y., Yang, G., Chen, X., Zhang, Y., Cao, G., Wang, J., Sun, Y., Zhang, P., Fan, M., Shao, N., & Yang, X.** (2008). Transforming growth factor- β -regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Research*, 36(8), 2690-2699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn032>
- Sundqvist, E., B  ärnhelm, M., Alfredsson, L., Hillert, J., Olsson, T., & Kockum, I.** (2010). Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *European Journal of Human Genetics*, 18(12), 1349-1352.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.113>
- Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G., & Lavelle, E. C.** (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1685-1691. <https://doi.org/10.1084/jem.20060285>
- Tam, R. C. Y., Li, M. W. M., Gao, Y. P., Pang, Y. T., Yan, S., Ge, W., Lau, C. S., & Chan, V. S. F.** (2017). Human CLEC16A regulates autophagy through

- modulating mTOR activity. *Experimental Cell Research*, 352(2), 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.017>
- Teunissen, C. E., & Khalil, M.** (2012). Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. İçinde *Multiple Sclerosis Journal* (C. 18, Sayı 5, ss. 552-556). <https://doi.org/10.1177/1352458512443092>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., Cohen, J. A.** (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Tran, E. H., Prince, E. N., & Owens, T.** (2000). IFN-Shapes Immune Invasion of the Central Nervous System Via Regulation of Chemokines 1. İçinde *The Journal of Immunology* (C. 164). <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/164/5/2759/1317817/2759.pdf>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G.** (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. İçinde *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 20, Sayı 1, ss. 5-20). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Tsareva, E. Y., Kulakova, O. G., Makarycheva, O. Y., Boyko, A. N., Shchur, S. G., Lashch, N. Y., Popova, N. F., Gusev, E. I., Bashinskaya, V. V., Lvov, D. V., Favorov, A. V., Ochs, M. F., & Favorova, O. O.** (2011). Pharmacogenomics of multiple sclerosis: Association of immune response gene polymorphisms with copaxone treatment efficacy. *Molecular Biology*, 45(6), 886-893. <https://doi.org/10.1134/S0026893311060185>
- Tyler, A. F., Mendoza, J. P., Firan, M., & Karandikar, N. J.** (2013). CD8+ T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066772>
- Vandenbroeck, K., Opdenakker, G., Goris, A., Murru, R., Billiu, A., & Marrosu, M. G.** (1998). Interferon- γ gene polymorphism-associated risk for multiple sclerosis in Sardinia [3]. İçinde *Annals of Neurology* (C. 44, Sayı 5, ss. 841-842). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1002/ana.410440525>
- Vass, K., Heininger, K., Schäfer, B., Linington, C., & Lassmann, H.** (1992). Interferon- γ potentiates antibody-mediated demyelination in vivo. *Annals of Neurology*, 32(2), 198-206. <https://doi.org/10.1002/ana.410320212>
- Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.-L., & Stinissen, P.** (2008). Natural Naive CD4+CD25+CD127low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. *The Journal of Immunology*, 180(9), 6411-6420. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6411>
- Vennegoor, A., Rispen, T., Strijbis, E. M. M., Seewann, A., Uitdehaag, B. M. J., Balk, L. J., Barkhof, F., Polman, C. H., & Wolbink, G.** (2012). Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in

multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*.
<https://doi.org/10.1177/1352458512460604>

- Vinther-Jensen, T., Börnsen, L., Budtz-Jørgensen, E., Ammitzbøll, C., Larsen, I. U., Hjerminde, L. E., Sellebjerg, F., & Nielsen, J. E. (2016).** Selected CSF biomarkers indicate no evidence of early neuroinflammation in Huntington disease. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 3(6). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000287>
- Vistbacka, J. (2022).** Circulating microRNAs as Biomarkers for Multiple Sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*. <https://trepo.tuni.fi/handle/10024/141742>
- Vistbakka, J., Elovaara, I., Lehtimäki, T., & Hagman, S. (2017).** Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 23(3), 403-412. <https://doi.org/10.1177/1352458516651141>
- Vistbakka, J., Sumelahti, M. L., Lehtimäki, T., Elovaara, I., & Hagman, S. (2018).** Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, 138(2), 130-136. <https://doi.org/10.1111/ane.12921>
- Vistbakka, J., Sumelahti, M. L., Lehtimäki, T., & Hagman, S. (2022).** Temporal variability of serum miR-191, miR-223, miR-128, and miR-24 in multiple sclerosis: A 4-year follow-up study. *Journal of the Neurological Sciences*, 442(February). <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120395>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. (2020).** Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), 1-10. https://doi.org/10.1084/jem_20190460
- Wansen, K., Pastinen, T., Kuokkanen, S., Wikström, J., Palo, J., Peltonen, L., & Tienari, P. J. (1997).** Immune system genes in multiple sclerosis: Genetic association and linkage analyses on TCR β , IGH, IFN- γ and IL-1 α /IL-1 β loci. *Journal of Neuroimmunology*, 79(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00104-5)
- Waschbisch, A., Atiya, M., Linker, R. A., Potapov, S., Schwab, S., & Derfuss, T. (2011).** Glatiramer Acetate Treatment Normalizes Deregulated microRNA Expression in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *PLoS ONE*, 6(9), e24604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024604>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010).** The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Molecular Diagnostics and Genetics*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Weber, M. S., Prod'homme, T., Youssef, S., Dunn, S. E., Rundle, C. D., Lee, L., Patarroyo, J. C., Stüve, O., Sobel, R. A., Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2007).** Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nature Medicine*, 13(8), 935-943. <https://doi.org/10.1038/nm1620>
- Weinshenker, B. G. (1996).** Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurologic Clinics*, 14(2), 291-308. [https://doi.org/10.1016/S0733-8619\(05\)70257-7](https://doi.org/10.1016/S0733-8619(05)70257-7)

- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety.** (2001). Biomarkers in risk assessment: validity and validation. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/42363>
- Xu, C., Dai, Y., Lorentzen, J. C., Dahlman, I., Olsson, T., & Hillert, J.** (2001). Linkage analysis in multiple sclerosis of chromosomal regions syntenic to experimental autoimmune disease loci. *European Journal of Human Genetics*, 9(6), 458-463. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200653>
- Xue, Q., Guo, Z. Y., Li, W., Wen, W. H., Meng, Y. L., Jia, L. T., Wang, J., Yao, L. B., Jin, B. Q., Wang, T., & Yang, A. G.** (2011). Human activated CD4+ T lymphocytes increase IL-2 expression by downregulating microRNA-181c. *Molecular Immunology*, 48(4), 592-599. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.10.021>
- Yang, J., Yu, Y., Su, B., Zheng, Y., & Liu, Y.** (2022). MiRNA-181d Is Involved in CREB1 Expression in PC12 Cells. *Yangtze Medicine*, 06(02), 13-23. <https://doi.org/10.4236/ym.2022.62002>
- Yaşar, E., Balkan, E., & Bilge, N.** (2022). Determination of miRNA Expression Levels Involved in WNT Signaling Pathway in Multiple Sclerosis Patients. *New Trend Med Sci*, 3(1), 43.
- Yen, C. J., Lin, S. L., Huang, K. T., & Lin, R. H.** (2000). Age-associated changes in interferon- γ and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of Biomedical Science*, 7(4), 317-321. <https://doi.org/10.1007/bf02253251>
- Yi, R., Chen, B., Zhao, J., Zhan, X., Zhang, L., Liu, X., & Dong, Q.** (2014). Krüppel-like factor 8 ameliorates alzheimer's disease by activating β -catenin. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(2), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0131-4>
- Yin, Y., Zhong, J., Li, S. W., Li, J. Z., Zhou, M., Chen, Y., Sang, Y., & Liu, L.** (2016). TRIM11, a direct target of miR-24-3p, promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer. *Oncotarget*, 7(52), 86755-86765. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13550>
- Young, H. A., & Hodge, D. L.** (2003). Interferon- γ . İçinde *Encyclopedia of Hormones* (ss. 391-397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-3411103-3/00151-0>
- Yousefi, M., Peymani, M., Ghaedi, K., Irani, S., & Etemadifar, M.** (2022). Significant modulations of linc001128 and linc0938 with miR-24-3p and miR-30c-5p in Parkinson disease. *Scientific Reports*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06539-3>
- Zabalza, A., Vera, A., Alari-Pahissa, E., Munteis, E., Moreira, A., Yélamos, J., Llop, M., López-Botet, M., & Martínez-Rodríguez, J. E.** (2020). Impact of cytomegalovirus infection on B cell differentiation and cytokine production in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01840-2>
- Zanoni, M., Orlandi, E., Rossetti, G., Turatti, M., Calabrese, M., Gomez Lira, M., & Gajofatto, A.** (2020). Upregulated serum miR-128-3p in progressive and

relapse-free multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, 142(5), 511-516. <https://doi.org/10.1111/ane.13288>

Zhang, C., Cheng, N., Qiao, B., Zhang, F., Wu, J., Liu, C., Li, Y., & Du, J. (2020). Age-related decline of interferon-gamma responses in macrophage impairs satellite cell proliferation and regeneration. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(5), 1291-1305. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12584>

Zhang, W., Wang, Y. E., Zhang, Y., Leleu, X., Reagan, M., Zhang, Y., Mishima, Y., Glavey, S., Manier, S., Sacco, A., Jiang, B., Rocco, A. M., & Ghobrial, I. M. (2014). Global epigenetic regulation of MicroRNAs in multiple myeloma. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110973>

Zhang, W., Zhang, J., Hoadley, K., Kushwaha, D., Ramakrishnan, V., Li, S., Kang, C., You, Y., Jiang, C., Song, S. W., Jiang, T., & Chen, C. C. (2012). MiR-181d: Predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro-Oncology*, 14(6), 712-719. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos089>

Zhang, Y., Wang, Z., Lan, D., Zhao, J., Wang, L., Shao, X., Wang, D., Wu, K., Sun, M., Huang, X., Yan, M., Liang, H., Rong, X., Diao, H., & Guo, J. (2022). MicroRNA-24-3p alleviates cardiac fibrosis by suppressing cardiac fibroblasts mitophagy via downregulating PHB2. *Pharmacological Research*, 177, 106124. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106124>

Zhou, M., Yin, X., Zheng, L., Fu, Y., Wang, Y., Cui, Z., Gao, Z., Wang, X., Huang, T., Jia, J., & Chen, C. (2021). miR-181d/RBP2/NF- κ B p65 Feedback Regulation Promotes Chronic Myeloid Leukemia Blast Crisis. *Frontiers in Oncology*, 11(March), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.654411>

Zu, L. D., Peng, X. C., Zeng, Z., Wang, J. L., Meng, L. L., Shen, W. W., Hu, C. T., Yang, Y., & Fu, G. H. (2018). Gastrin inhibits gastric cancer progression through activating the ERK-P65-miR23a/27a/24 axis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0782-7>

URL-1:

<https://www.braincenter.com.tr/noroplastisite-nedir/>. Erişim Tarihi: 22.10.2023

URL-2:

<https://www.molekulce.com/sinir-sistemi-hastaliklari/>. Erişim Tarihi: 9.06.2023

URL-3:

<https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>.

Erişim Tarihi: 8.06.2023

URL-4:

<https://www.msif.org/wp-content/uploads/2020/10/Atlas-3rd-Edition-Epidemiology-report-EN-updated-30-9-20.pdf>. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-5:

<https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>).

Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-6:

<https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS>. Erişim Tarihi: 22.06.2023

URL-7:

<https://msguncel.com/ms-tipleri/ataklarla-seyreden-ms-rrms/>. Erişim Tarihi: 02.07.2023

URL-8:

<https://msguncel.com/ms-tipleri/birincil-ilerleyici-ms-ppms/>. Erişim Tarihi: 02.07.2023

URL-9:

<https://msguncel.com/ms-tipleri/ikincil-ilerleyici-ms-spms/>. Erişim Tarihi: 02.07.2023

URL-10:

<https://encyclopedia.pub/entry/27675>. Erişim Tarihi: 06.09.2023

URL-11:

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG>. Erişim Tarihi: 9.06.2023

URL-12:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=IFNG+rs2069727>. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-13:

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR24-1>. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-14:

https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000080. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-15:

<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-24-3p&organism=hsa>.

Erişim Tarihi: 10.06.2023

URL-16:

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/human/gene/12194/?page=2>. Erişim Tarihi: 08.06.2023

URL-17:

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR181D>. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-18:

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/human/gene/12194/?page=2>. Erişim Tarihi: 08.06.2023

URL-19:

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR181D>. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-20:

https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003139. Erişim Tarihi: 09.06.2023

URL-21:

<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-24-3p&organism=hsa>. Erişim Tarihi: 08.06.2023

URL-22:

<https://hotcore.info/act/kareff-011579.html>. Erişim tarihi: 05.11.2023.

URL-23:

<https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>. Erişim tarihi: 01.12.2023.

URL-24:

<https://www.mirnet.ca/miRNet/Secure/MirNetView.xhtml>. Erişim tarihi: 11.12.2023.

URL-25:

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>. Erişim tarihi: 19.12.2023.

URL-26:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2069727>. Erişim tarihi: 22.12.2023.

EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Onayı.

EK-2: Kullanılan Malzemelerin Üretici Firmaları ve Katalog Numaraları.

EK-3: Kullanılan Cihazların Markaları, Modelleri ve Üretim Yerleri.

EK 4: Eş Zamanlı PCR ile Genotipleme Çalışmasında Kullanılan Alel Spesifik Probların TaqMan Analiz Numarası ve Prob Dizisi.

EK-5: Tüm Gruplarda miR-24-3p ve miR-181d-3p Plazma Rölatif Ekspresyon Seviyesi ve Yaşa Göre Düzenlenmiş Plazma IFN-gama Konsantrasyonunun Bazı Klinik Bilgiler ile Korelasyonu.

EK-6: GA Grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p Plazma Rölatif Ekspresyon Seviyesi ve Yaşa Göre Düzenlenmiş Plazma IFN-Gama Konsantrasyonunun Bazı Klinik Bilgiler İle Korelasyonu.

EK-7: Naif Grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p Plazma Rölatif Ekspresyon Seviyesi ve Yaşa Göre Düzenlenmiş IFN-Gama Konsantrasyonunun Bazı Klinik Bilgiler İle Korelasyonu.

EK-8: Kontrol Grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p Plazma Rölatif Ekspresyon Seviyesi ve Yaşa Göre Düzenlenmiş Plazma IFN-gama Konsantrasyonunun Yaş İle Korelasyonu.

EK-1



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Şehir Hastanesi
1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul –E1-21-1805

1805-no’lu çalışma

Ankara Şehir Hastanesi Nöroloji Kliniği’nde yapılması planlanan, sorumlu araştırmacı Doç. Dr. Semra Mungan’ın ve koordinatörü Doç. Dr. Birsan Can Demirdöğen’in olduğu “İnterferon-Gama Plazma Düzeyleri ve Bunu Etkileyen MikroRNA-24-3p ve MikroRNA-181d-3p Ekspresyon Seviyesi İle IFNG rs2069727 Genetik Polimorfizminin Multipl Sklereoz Riski, Engellilik Skorları ve Glatiramer Asetat Tedavisi İle İlişkisinin İncelenmesi” konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliğiyle uygun görülmüştür.

26/05/2021

Prof. Dr. Hürrem Bodur
Etik Kurul Başkanı

Not: Islak imzalar silinmiştir.

Çizelge Ek. 1: Kullanılan malzemelerin listesi.

Kullanılan malzemeler	Üretici firma	Katalog numarası
Tris amino metan (hidroksimetil)	Sigma Aldrich-ABD	252859
Trizma hidroklorür (Tris HCl)	Sigma Aldrich-ABD	T5941
Tween-20	Sigma Aldrich-ABD	9005-64-5
Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA)	Sigma Aldrich-ABD	E5134
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich-ABD	07102
Potasyum klorür (KCl)	Santa Cruz Biotechnology-ABD	sc-203207
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	Sigma Aldrich-Çin	M8266
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich-Japonya	L3771
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma Aldrich-ABD	31434
Triton X-100	Sigma Aldrich-ABD	T8787
Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Litvanya	SM0372
Borik asit	Sigma Aldrich-ABD	10043-35-3
Etanol	ISOLAB-Almanya	920.026.2500
TaqMan® SNP genotyping assays	Applied Biosystems-ABD	4351379
TaqMan® genotyping master mix	Applied Biosystems-Avustralya	4371355
RNase AWAY™ Surface Decontaminant	Thermo Fischer Scientific-ABD	MBP-7000
Kloroform	Sigma Aldrich-ABD	34854
Qiazol Liziz Reajeni	Qiagen-Almanya	79306
miRNEasy Serum/Plasma Kit	Qiagen-Almanya	217184
Carrier RNA	Qiagen-Almanya	1068337
miRCURY LNA RT Kit	Qiagen-Almanya	339340
miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit	Qiagen-Almanya	339346
AMPIGENE qPCR Probe Mix Hi-ROX	Enzo Life Science -ABD	ENZ-NUC-106-1000
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems-ABD	4346906
IFN Gamma Human ELISA Kit	Invitrogen-ABD	BMS228

Çizelge Ek.2: Kullanılan cihazların listesi ve üretim yerleri.

Kullanılan cihazlar	Marka	Model	Üretici ülke
+4°C Buzdolabı	Liebherr	LKv 3913 Index 20B/001	Almanya
-20°C Buzdolabı	Liebherr	LGex 3410 Index 22A/001	Almanya
-86°C Buzdolabı	Panasonic	MDF-U55V-PE	Japonya
Otoklav	Panasonic	MLS-3751L	Japonya
Vorteks	ISOLAB	622.01.001	Almanya
Çalkalamalı inkübatör	New Brunswick Scientific	Innova	ABD
Multispin	BioSan	MSC-6000	Letonya
Saf su cihazı	MES Medikal	Minipure	Türkiye
Soğutmalı santrifüj	Hettich	Universal 320R	Almanya
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica	ArecX	İtalya
Mikrosantrifüj	Eppendorf	MiniSpin®	Almanya
Hassas tartı	Kern	PLJ 300	Almanya
pH metre	VWR	pH 1100 L	ABD
Kuru blok ısıtıcı	Biosan	Bio TDB-100	Letonya
UV-Vis spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop™ One/OneC	ABD
Laminar akış kabini	MetiSafe	LAF-90	Türkiye
Biyogüvenlik kabini	Thermo Scientific™	S2020 1.2	Almanya
PCR cihazı	Eppendorf	Mastercycler® Nexus	Almanya
Eş zamanlı PCR cihazı	Applied Biosystems	StepOne Plus	ABD
Microplate spektrofotometresi	Thermo Scientific™	MultiSkan GO	ABD

EK-4

Çizelge Ek.3: Eş zamanlı PCR ile genotipleme çalışmasında kullanılan kitin bilgileri.

SNP	TaqMan analiz numarası	Prob dizisi	Üretici
rs2069727	C__2683475_10	GATGAGGGAGAGGAAGATTCTGAAA[C/T]GAAGGAGGAAATAGGAAGGTGGAGA	Thermo Fisher, ABD

EK-5

Çizelge Ek.4: Tüm gruplarda miR-24-3p ve miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun bazı klinik bilgiler ile korelasyonu.

		Yaş (yıl)	EDSS	MSSS	Hastalık süresi	Tedavi süresi	miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu
Yaş (yıl)	Spearman's rho Korelasyonu	1	.370**	.192	.480**	.643**	.080	.129	-.877**
	<i>P</i>	.	.008	.183	.000	.001	.493	.268	.000
EDSS	Spearman's rho Korelasyonu	.370**	1	.590**	.399**	.699**	-.101	.079	-.317*
	<i>P</i>	.008	.	.000	.004	.000	.487	.585	.025
MSSS	Spearman's rho Korelasyonu	.192	.590**	1	.640**	.217	.023	-.075	-.116
	<i>P</i>	.183	.000	.	.000	.319	.874	.606	.424
Hastalık süresi	Spearman's rho Korelasyonu	.480**	.399**	.640**	1	.862**	.060	-.113	-.396**
	<i>P</i>	.000	.004	.000	.	.000	.681	.435	.004
Tedavi süresi	Spearman's rho Korelasyonu	.643**	.699**	.217	.862**	1	.018	.301	-.623**
	<i>P</i>	.001	.000	.319	.000	.	.936	.163	.001
miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	.080	-.101	.023	.060	.018	1	.474**	-.164
	<i>P</i>	.493	.487	.874	.681	.936	.	.000	.161
miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	.129	.079	-.075	-.113	.301	.474**	1	-.154
	<i>P</i>	.268	.585	.606	.435	.163	.000	.	.186
Yaşa göre düzenlenmiş IFN- gama konsantrasyonu	Spearman's rho Korelasyonu	-.877**	-.317*	-.116	-.396**	-.623**	-.164	-.154	1
	<i>P</i>	.000	.025	.424	.004	.001	.161	.186	.

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). ** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). Parametreler normal dağılım göstermediği için Spearman korelasyon yöntemi kullanılmıştır. EDSS. Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS. Multipl Skleroz Şiddet Skoru.

EK-6

Çizelge Ek.5: GA grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun bazı klinik bilgiler ile korelasyonu.

		Yaş (yıl)	EDSS	MSSS	Hastalık süresi	Tedavi süresi	miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu
Yaş (yıl)	Spearman's rho Korelasyonu	1	.511**	.254	.642**	.643**	-.191	.215	-.952**
	<i>P</i>	.	.009	.220	.001	.001	.359	.303	.000
EDSS	Spearman's rho Korelasyonu	.511**	1	.788**	.598**	.699**	-.029	.302	-.520**
	<i>P</i>	.009	.	.000	.002	.000	.891	.143	.008
MSSS	Spearman's rho Korelasyonu	.254	.788**	1	.077	.217	.010	.247	-.316
	<i>P</i>	.220	.000	.	.714	.319	.963	.235	.124
Hastalık süresi	Spearman's rho Korelasyonu	.642**	.598**	.077	1	.862**	.063	.336	-.596**
	<i>P</i>	.001	.002	.714	.	.000	.764	.101	.002
Tedavi süresi	Spearman's rho Korelasyonu	.643**	.699**	.217	.862**	1	.018	.301	-.623**
	<i>P</i>	.001	.000	.319	.000	.	.936	.163	.001
miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	-.191	-.029	.010	.063	.018	1	.225	.101
	<i>P</i>	.359	.891	.963	.764	.936	.	.279	.630
miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	.215	.302	.247	.336	.301	.225	1	-.213
	<i>P</i>	.303	.143	.235	.101	.163	.279	.	.306
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu	Spearman's rho Korelasyonu	-.952**	-.520**	-.316	-.596**	-.623**	.101	-.213	1
	<i>P</i>	.000	.008	.124	.002	.001	.630	.306	.

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). Parametreler normal dağılım göstermediği için Spearman korelasyon yöntemi kullanılmıştır. EDSS. Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS. Multipl Skleroz Şiddet Skoru.

EK-7

Çizelge Ek.6: Naif grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonunun bazı klinik bilgiler ile korelasyonu.

		Yaş (yıl)	EDSS	MSSS	Hastalık süresi	miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Yaşa göre düzenlenmiş IFN- gama konsantrasyonu
Yaş (yıl)	Spearman's rho Korelasyonu	1	.181	.094	.225	-.132	-.200	-.833**
	<i>P</i>	.	.388	.656	.279	.530	.337	.000
EDSS	Spearman's rho Korelasyonu	.181	1	.395	.263	-.303	-.058	-.032
	<i>P</i>	.388	.	.05	.204	.141	.783	.880
MSSS	Spearman's rho Korelasyonu	.094	.395	1	.895**	-.156	-.098	.064
	<i>P</i>	.656	.05	.	.000	.457	.641	.762
Hastalık süresi	Spearman's rho Korelasyonu	.225	.263	.895**	1	-.112	-.105	-.081
	<i>P</i>	.279	.204	.000	.	.595	.618	.699
miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	-.132	-.303	-.156	-.112	1	.458*	-.005
	<i>P</i>	.530	.141	.457	.595	.	.021	.983
miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	-.200	-.058	-.098	-.105	.458*	1	.329
	<i>P</i>	.337	.783	.641	.618	.021	.	.108
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu	Spearman's rho Korelasyonu	-.833**	-.032	.064	-.081	-.005	.329	1
	<i>P</i>	.000	.880	.762	.699	.983	.108	.
* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). ** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). Parametreler normal dağılım göstermediği için Spearman korelasyon yöntemi kullanılmıştır. EDSS. Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği; MSSS. Multipl Skleroz Şiddet Skoru.								

EK-8

Çizelge Ek.7: Kontrol grubunda miR-24-3p ve miR-181d-3p plazma rölatif ekspresyon seviyesi ve yaşa göre düzenlenmiş plazma IFN-gama konsantrasyonunun yaş ile korelasyonu.

		Yaş (yıl)	miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu
Yaş (yıl)	Spearman's rho Korelasyonu	1	-.278	-.047	-.851**
	<i>P</i>	.	.178	.824	.000
miR-24-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	-.278	1	.607**	.188
	<i>P</i>	.178	.	.001	.368
miR181d-3p rölatif ekspresyon seviyesi	Spearman's rho Korelasyonu	-.047	.607**	1	-.035
	<i>P</i>	.824	.001	.	.867
Yaşa göre düzenlenmiş IFN-gama konsantrasyonu	Spearman's rho Korelasyonu	-.851**	.188	-.035	1
	<i>P</i>	.000	.368	.867	.
** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). Parametreler normal dağılım göstermediği için Spearman korelasyon yöntemi kullanılmıştır.					