

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖTROFİL ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE APOPTOZ
YOLAKLARININ YİNELEYEN DÜZELEN MULTİPL SKLEROZDA
DİMETİL FUMARAT TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK KULLANIMININ
BOYLAMSAL ARAŞTIRMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse Aydın

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

NİSAN 2025

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Buse AYDIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÖTROFİLLERDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN VE APOPTOZ YOLAKLARININ YİNELEYEN DÜZELEN MULTİPL SKLEROZDA DİMETİL FUMARAT TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK KULLANIMININ BOYLAMSAL ARAŞTIRMASI

Buse AYDIN

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Tarih: Nisan 2025

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sistemini (MSS) etkileyen, otoimmün, nörodejeneratif ve nöroenflamatuar bir hastalık olup genellikle 20-40 yaş arası genç yetişkinlerde travma harici engelliliğin bir sebebi olarak görülür. Dimetil fumarat (DMF), MS'nin en sık görülen yineleyen-düzelen formunda (RRMS) birinci basamak tedavi olarak kullanılan immünmodülatör bir ilaçtır. MS'nin kesin bir tedavisi olmamakla birlikte hastalık seyrini değiştiren tedaviler, bireyler arası farklılıklar ve semptomların heterojen doğası nedeniyle her zaman etkili olmayabilir. Bu durumda, hastalık progresyonunu erken dönemde yansıtabilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

Nötrofiller, bağışıklık sisteminde fagositoz yapabilen, enflamatuar molekülleri düzenleyen ve antijen sunarak MS'nin otoimmün doğasına katkıda bulunabilen en yaygın lökositlerdir. Nörodejeneratif hastalıklarda görülen endoplazmik retikulum

(ER) stresi, artan protein yükünün tolere edilememesi sonucunda hücrede homeostaz



kaybına ve apoptoza neden olur. MS’de nötrofiller tarafından düzenlenen enflamatuar molekülde ve ayrıca MSS’de görülen lezyonlarda ER stres belirteçlerinde artış bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, RRMS hastalarının nötrofillerinde ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin ve proteinlerin rölatif ifade seviyeleri (REL) tedavi yanıtı kapsamında incelenmiştir. Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniğine başvuran RRMS hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplarda bu genlerin REL değerleri, gerçek zamanlı PCR sonuçlarından hesaplanmıştır. Analizler, 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde anlamlı artış göstermiştir. Ayrıca, bu genlere ait protein düzeylerindeki değişimler de incelenmiştir. 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan analizlerde, genişletilmiş engellilik durum ölçeği (EDSS) puanında anlamlı bir azalma, T2 lezyon sayılarında ise 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla düşüş saptanmıştır. *BCL2* geninin REL değerindeki değişim ile EDSS puanı ve T2 lezyon sayısı değişimi arasında negatif bir ilişki bulunurken; Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerin REL değerlerindeki değişimlerle T2 lezyon sayısında görülen değişim arasında pozitif, EDSS puanında görülen değişim arasında negatif bir ilişki belirlenmiştir.

Bu çalışma, *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerleri ile *BCL2* geni, Kaspaz-3 ve Bcl2 proteinlerinin klinik parametrelerle gösterdiği anlamlı ilişkinin önemine ve apoptoz belirteçlerinin tedavi yanıtını yansıtan potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilmesine işaret etmektedir. Ayrıca, bu tez çalışması RRMS’li hastaların nötrofillerinde ER stres ve apoptoz belirteci genlerin DMF tedavi yanıtı kapsamında incelendiği ilk çalışma olup, MS’de tedavi etkinliğinin erken dönemde belirlenmesinde biyobelirteç, tanı kiti ve biyosensör geliştirme stratejileri açısından Biyomedikal Mühendisliği alanına katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dimetil fumarat, ER stres, Gen ve protein ifadesi, Nötrofil, Tedavi yanıtı, Yineleyen-düzelen MS (RRMS).

ABSTRACT

Master of Science

A LONGITUDINAL STUDY ON THE USE OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND APOPTOTIC PATHWAYS IN NEUTROPHILS AS BIOMARKERS FOR EVALUATING THE EFFICACY OF DIMETHYL FUMARATE TREATMENT IN RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS

Buse AYDIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Date: April 2025

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, neurodegenerative, and neuroinflammatory disease affecting the central nervous system (CNS) and is usually a cause of non-traumatic disability in young adults aged 20-40 years. Dimethyl fumarate (DMF) is an immunomodulatory drug used as a first-line treatment for the most common relapsing-remitting form of MS (RRMS). While there is no definitive cure for MS, treatments that modify the disease course may not always be effective due to inter-individual differences and the heterogeneous nature of symptoms. In this case, biomarkers that can reflect disease progression at an early stage are needed.

Neutrophils are the most common leukocytes in the immune system that can phagocytose, regulate inflammatory molecules, and contribute to the autoimmune nature of MS by presenting antigens. The endoplasmic reticulum (ER) stress seen in neurodegenerative diseases leads to loss of cell homeostasis and apoptosis due to the inability to tolerate the increased protein load. Increased levels of inflammatory

molecules regulated by neutrophils and ER stress markers in CNS lesions have been reported in MS.

In this thesis, the relative expression levels (REL) of ER stress and apoptosis marker genes and proteins in neutrophils of RRMS patients were analyzed in the context of treatment response. REL values of these genes were calculated from real-time PCR results of RRMS patients admitted to the Neurology Outpatient Clinic of Ankara Bilkent City Hospital before DMF treatment (0A) and in groups formed at the 3rd month (3A) and 6th month (6A) of treatment. Analyses showed a significant increase in *BCL2* and *CASP3* genes' REL values in the 6A group compared to the 0A group. Changes in protein levels of these genes were also analyzed. Analyses among the 0A, 3A, and 6A groups revealed a significant decrease in expanded disability severity scores (EDSS) and a reduction in the number of T2 lesions in the 3A and 6A groups compared to the 0A group. While a negative correlation was found between the change in *BCL2* gene's REL values and the change in EDSS score and T2 lesion number, a positive correlation was found between the changes in REL values of Bcl2 and Caspase-3 proteins and the change in T2 lesion number, and a negative correlation was found between the change in EDSS score.

This study highlights the importance of the REL values of *BCL2* and *CASP3* genes, as well as the significant association of *BCL2* gene, Caspase-3 and Bcl2 proteins with clinical parameters. It also suggests the evaluation of apoptosis markers as potential biomarkers reflecting treatment response. Furthermore, this thesis is the first study to examine ER stress and apoptosis marker genes in neutrophils of patients with RRMS in the context of DMF treatment response. It contributes to the field of Biomedical Engineering by providing insights into the for the early determination of treatment efficacy in MS, as well as strategies for the development of biomarkers, diagnostic kits and biosensors.

Keywords: Dimethyl fumarate, ER stress, Gene and protein expression, Neutrophil, Relapsing remitting MS (RRMS), Treatment response.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bana ekibinde ve laboratuvarında yer vererek kendisiyle çalışma fırsatı sunan, tüm tez ve akademik çalışmalarında tecrübeleriyle ve katkılarıyla beni yönlendirerek hem hayata hem de akademik dünyaya karşı bakış açımın yeniden şekillenmesini sağlayan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Birsen Can Demirdöğen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tecrübeleri, bilgisi, sabrı ve bakış açısı bu çalışmayı sürdürmemdeki en büyük etmenlerdendir.

Çalıştığım 218S578 kodlu 1001 projesine ve yüksek lisans eğitimimde bana sağladığı maddi destek için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgi birikimlerini bizlerden esirgemeyen saygıdeğer TOBB ETÜ Biyomedikal Mühendisliği öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasındaki örnek gruplarının oluşturulmasında ve katılımcıların çalışmaya dahil edilmesinde şüphesiz en büyük katkıya sahip olan, engin bilgi birikimleriyle bizlere her zaman destek olan Prof. Dr. Şeref Demirkaya'ya, Prof. Dr. Semra Mungan'a, Prof. Dr. Gönül Vural'a ve Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniğine teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jüri üyelerim saygıdeğer Prof. Dr. Çağdaş Devrim Son ve Prof. Dr. Fatih Büyükserin'e değerli tavsiyeleri, eleştirileri ve rehberlikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca geçirdiğim iyi ve kötü her anda, her zaman destekleri ve bilgileriyle yol gösteren sevgili ekip arkadaşlarım Osman Oğuzhan Kılıç, Ata Ayhan Yılmaz ve Mekselina Kalmaz'a teşekkürlerimi sunarım. TOBB ETÜ'de geçirdiğim sürelerde arkadaşlıklarıyla her daim yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim Maral Karahan ve Çağlanaz Akın Gültaktı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen her daim telefonun bir ucunda olan biricik arkadaşlarım Batuhan Ünal, Oğuzhan Yaprak, Efe Mıhçı, Özgün Ertuğrul, Özgün Bilgisel ve Nisa Akın'a şükranlarımı sunarım. Akademik hayatım ve iş hayatımın çakıştığı anlarda her zaman beni destekleyen arkadaşlarım Ekin Aytekin, Ceyda Balçık ve Melek Şahin'e yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın tamamlanmasında benim için hem bir hoca hem de yol arkadaşı olan, birbirinden kıymetli pek çok anı biriktirdiğimiz, her güzel anımda yanımda olduğu kadar zor zamanlarımda da bana ortak olan, hem fiziksel hem de manevi desteği ve kıymetli dostluğu için Canan Akçin'e, kıymetli önerileri ve yardımlarıyla bir ağabey edasıyla desteğini asla esirgemeyen Selçuk Akçin'e ve Buçık olmamı sağlayan biricik kızları Asya Akçin'e en içten teşekkürlerimi iletirim.

Liseden itibaren attığım her adımda yanımda olan, iyi ve kötü günlerimin her daim bir paydaşı olan bir arkadaştan çok ailemin bir ferdi olan ve hem fiziksel hem de meşhur telefon konuşmalarımızda her zaman yanımda olup desteğini asla esirgemeyen Elif Naz Karagülle'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca kazandırdıkları ve kattıklarının karşılığı olmayan, tecrübeleri ve yorumlarıyla yüksek lisans hayatımın zorluklarını yaşanabilir kılan, destekleriyle kriz

anlarında sakinleşmemi ve vazgeçmeden her daim devam etmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini benden asla esirgemeyen annem Nuriye Aydın ve babam Hüseyin Aydın'a elimi tutmaktan hiç vazgeçmedikleri için teşekkürlerimin en büyüğünü sunarım.

Yaşadığım tüm zorlu süreçte yanımda olan, zorlandığım her anda bir hallederiz sözüyle tüm zorluğu aşacağımıza beni inandıran, birbirimizi temel bilimci-mühendis olmakla itham ettiğimiz tüm bilimsel tartışmalarımızda bambaşka fikirleriyle beni her zaman şaşırtan ve güldüren, sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan ömürlük oyun arkadaşım sevgili Barkan Kağan Durukan'a şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı canım annem Nuniş ve biricik babam Hüsoş'a ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xix
KISALTMALAR.....	xxiii
SEMBOL LİSTESİ.....	xxix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Multipl Skleroz ve Tanı.....	1
1.1.1 MS’de Tanı.....	2
1.1.2 MS’de Klinik Alt Tipler.....	5
1.1.3 MS’de Epidemiyoloji-Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	7
1.1.3.1 MS’de Genetik Risk Faktörleri.....	8
1.1.3.2 MS’de Çevresel Risk Faktörleri.....	9
1.2 MS’nin Patogenezi.....	13
1.3 MS’de T ve B Lenfositlerin Rolü.....	18
1.3.1 B Lenfositler.....	18
1.3.2 T Lenfositler.....	19
1.3.2.1 Antijen Sunumu.....	21
1.3.2.2 MS ve T Lenfositler.....	23
1.3.3 MS ve Nötrofiller.....	23
1.3.3.1 Nötrofiller ve Antijen Sunumu.....	28
1.3.4 MS ve ER.....	30
1.3.5 ER ve ER’de Gelişen Protein İşleme Süreçleri.....	31
1.3.5.1 ER’de Protein Katlanması.....	31
1.3.5.2 ER ve KPY.....	32
1.4 MS’de Tedavi.....	38
1.4.1 DMF ve Etki Mekanizması.....	40
1.4.1.1 DMF’nin Moleküler Etki Mekanizması.....	43

1.4.2	DMF ve Nötrofiller.....	45
1.4.3	DMF ve ER Stres.....	46
1.5	MS’de Tedaviye Karşı Gelişen Yanıtsızlık Değerlendirmesi.....	46
1.6	Çalışmanın Amacı.....	49
2.	MATERYALLER VE METOTLAR.....	53
2.1	Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	53
2.1.1	Laboratuvar Çalışmaları İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	55
2.2	Çalışma Gruplarından Biyolojik Materyal Elde Etmek İçin Kullanılan Metotlar.....	55
2.2.1	Tam Kandan Nötrofil İzolasyonu.....	55
2.2.1.1	Hücre Sayımı.....	58
2.2.2	Total RNA İzolasyonu.....	59
2.2.3	Total Protein İzolasyonu.....	63
2.3	ER Stres ve Apoptoz Belirteci Genlerin İfade Seviyesinin Belirlenmesi...65	
2.3.1	Total RNA’lardan cDNA Sentezi.....	65
2.3.2	Hedef Genlerin qRT-PCR Yöntemi ile Rölatif İfade Seviyesinin Belirlenmesi.....	67
2.4	ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Proteinlerin Rölatif İfade Seviyesinin Belirlenmesi.....	72
2.5	İstatistiksel ve <i>in silico</i> Analizler.....	79
3.	BULGULAR.....	83
3.1	Çalışma Grupları.....	83
3.2	M Grubu ve K Grubuna ait Demografik Veriler.....	84
3.3	M Grubunda Klinik Verilerin Değerlendirilmesi.....	85
3.3.1	M Grubunda Klinik Verilerin Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi.....	86
3.4	ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	88
3.4.1	Kontrol Grubu ve 0A Grubu Arasında Rölatif Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	89
3.4.2	ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin 0A, 3A ve 6A Gruplarında Rölatif Ekspresyon Seviyeleri.....	89
3.4.3	0A, 3A ve 6A Gruplarında ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Klinik Verilere Göre Değerlendirilmesi.....	93

3.5	Western Blot Yöntemiyle Bcl2 ve Kaspaz-3 Proteinlerinin Rölatif Ekspresyon Seviyesinin 0A, 3A ve 6A Gruplarında Belirlenmesi.....	104
3.6	M Grubunda Yapılan Korelasyon Analizleri.....	109
3.6.1	Basit Korelasyon Analizleri.....	109
3.6.2	Tekrarlı Ölçümler Korelasyonu.....	114
4.	TARTIŞMA.....	123
4.1	Çalışma Grupları ve Grupların Demografik Yapısı.....	128
4.2	M Grubunda Klinik Verilerinin Yorumlanması.....	129
4.2.1	M Grubunda Klinik Verilerin Cinsiyete Göre Yorumlanması.....	133
4.3	ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	133
4.3.1	M Grubunda ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Klinik Verilere Göre Değerlendirilmesi.....	143
4.4	Bcl2 ve Kaspaz-3 Proteinlerinin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Yorumlanması.....	148
4.5	M Grubunda Yapılan Korelasyon Analizleri.....	151
4.6	<i>In silico</i> Analizler.....	158
4.7	Sonuçların Değerlendirilmesi.....	164
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	167
	KAYNAKLAR.....	173
	EKLER.....	199
	ÖZGEÇMİŞ.....	243

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: MSS üzerinde MS'ye bağlı görülen temel olgular.....	1
Şekil 1.2: EDSS ölçeklendirmesi.....	3
Şekil 1.3: KİS ve RRMS alt tiplerinin ilerleme süreçlerinde görülen engellilik durumunun zamana göre yayılımı.....	6
Şekil 1.4: SPMS ve PPMS alt tiplerinin ilerleme süreçlerinde görülen engellilik durumunun zamana karşı yayılımı.....	7
Şekil 1.5: MS gelişimini tetikleyen çevresel ve genetik risk faktörleri.....	8
Şekil 1.6: MS'nin epidemiyolojisi.....	12
Şekil 1.7: Beyaz ve gri maddenin beynin içindeki konumları.....	14
Şekil 1.8: Doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerine ait hücreler ve iki sistem arasındaki iletişimin temsili gösterimi.....	15
Şekil 1.9: İmmün sistem içerisinde hafıza fonksiyonunun immün tepkiye yansıması.	16
Şekil 1.10: Oto-immün hastalıkların evreleri.....	17
Şekil 1.11: T ve B hücrelerinin üretimine dair temsili görüntü.....	18
Şekil 1.12: T hücresi ve antijen sunumu arasındaki ilişki.....	22
Şekil 1.13: Nötrofillerin olgunlaşması ve dolaşıma katılması.....	24
Şekil 1.14: Nötrofillerin MS patogeneze katkısının bulunduğu düşünülen olası mekanizmalar.....	26
Şekil 1.15: NDH'lerin temsili gösterimi.....	29
Şekil 1.16: KPY mekanizmasında görev alan sensör proteinler ve ilgili fonksiyonlarının temsili gösterimi.....	33
Şekil 1.17: IRE1 aracılı protein yükünün azaltılmasına dair şaperon ifadesi artışının temsili gösterimi.....	35
Şekil 1.18: ER stres belirteçleri ve tetikledikleri bazı önemli sinyal mekanizmaları	37
Şekil 1.19: Dimetil fumarat (DMF) ve monometil fumaratın (MMF) kimyasal yapısı.	42
Şekil 1.20: DMF ve MMF etki mekanizmasının temsili görünümü.....	44
Şekil 2.1: Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin oluşturdukları grupların şematik gösterimi.....	55

Şekil 2.2: Nötrofil izolasyonu aşamalarında deneyler esnasında elde edilen görüntüler	57
Şekil 2.3: TB ile boyanan hücrelerin temsili görünümü.....	59
Şekil 2.4: BCA deneyi için çizdirilen standart eğri.....	64
Şekil 2.5: qRT-PCR sürecinin temsili gösterimi, A) qRT-PCR deneyinin şematik gösterimi, B) cihaz tarafından tespit edilen floresan sinyale ait grafiğin temsili görünümü.....	68
Şekil 2.6: β -aktin geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri.....	69
Şekil 2.7: qRT-PCR deneyi için cihazda kurulan programın ekran görüntüsü.....	71
Şekil 2.8: REL analizlerinde kullanılan $\Delta\Delta C_t$ hesaplamalarının gösterimi.....	72
Şekil 2.9: Ayırma jelinde yürüyen örnekler ve ladder'a ait deneysel görüntü.....	74
Şekil 2.10: A) WB deneyi için hazırlanan transfer sandviçinin temsili görünümü, B) sandviç aparatı içerisinde yer alan yapının karşıdan deneysel görünümü ve C) sandviç aparatının yandan görünümü.....	75
Şekil 2.11: A) Sandviç aparatlarının elektrik alana maruz bırakıldığı tank içerisindeki deneysel görünümü ve B) elektrik alanın iletilmesini sağlayan transfer tamponunu içeren transfer sistemine ait deneysel görünüm.....	76
Şekil 3.1: İzole edilen RNA'ların ve genomik DNA (gDNA) örneğinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda elde edilen görüntü.....	84
Şekil 3.2: ER stres genleri ve apoptotik genlerin REL değerlerinin DMF tedavisi öncesi RRMS'li hastaların (0A grubu) ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması	91
Şekil 3.3: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	93
Şekil 3.4: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>ATF4</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	94
Şekil 3.5: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>ATF6</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	95
Şekil 3.6: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>BAX</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	96
Şekil 3.7: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>BCL2</i> REL değerlerinin	

EDSS	
≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	97



Şekil 3.8: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CASP3</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	98
Şekil 3.9: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CHOP</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	99
Şekil 3.10: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CHOP</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	100
Şekil 3.11: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>eIF2α</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	101
Şekil 3.12: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>IRE1</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	102
Şekil 3.13: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>GRP78</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	104
Şekil 3.14: M grubu örneklerinin tamamı için Bcl2, Kaspaz-3 ve B-aktin proteinlerine ait Western blot (WB) yöntemiyle elde edilen membranlara ait görüntüler	107
Şekil 3.15: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) elde edilen total protein lizatlarının normalizasyon aşamasında kullanıldığı WB deneylerinden elde edilen Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait densitometrik analiz sonuçları	108
Şekil 3.16: Soldan sağa olmak üzere, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle <i>ATF4</i> , <i>BCL2</i> , <i>CHOP</i> ve <i>PERK</i> genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucu elde edilen grafikler.....	116
Şekil 3.17: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle Kaspaz-3 proteininin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik.....	117
Şekil 3.18: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle <i>BCL2</i> geninin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik.....	119

Şekil 3.19: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler



arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik	120
Şekil 3.20: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle Kaspaz-3 proteininin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafi.....	122
Şekil 4.1: STRING veri tabanı üzerinden ER stresi ve apoptoz belirteci olan proteinlerin birbirleriyle olan ilişkilerini gösteren harita.....	159
Şekil 4.2: STRING veri tabanı üzerinden oluşturulan ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin ortak ifadelenme durumlarını yansıtan ısı haritası.....	160
Şekil 4.3: STRING veri tabanı üzerinden elde edilen biyolojik süreç (GO) zenginleştirme analizlerinden elde edilen görsel.....	163

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: MS Tanısı İçin Kullanılan McDonald Kriterleri.....	4
Çizelge 1.2: DMT grubunda yer alan bazı ilaçlar, bu ilaçların kullanım yolu ve genel etki mekanizmaları.....	41
Çizelge 1.3: MS’de kullanılan biyobelirteçler, belirteçlerin tipleri ve elde edildikleri kaynaklar.....	48
Çizelge 2.1: Çalışmaya dahil edilen M (RRMS) grubu ve K (Kontrol) grubu için belirlenen uygunluk kriterleri.....	54
Çizelge 2.2: cDNA sentezinde bileşenlerin 1 örnek için kullanıldığı hacimsel değerler	66
Çizelge 2.3: RT-PCR için kullanılan program.....	67
Çizelge 2.4: qRT-PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere oluşturulan karışımın 1 kuyu için içerdiği malzeme miktarı ve 9 kuyuya uygun bir şekilde hazırlanan ana karışım hacmi.....	70
Çizelge 2.5: qRT-PCR deney döngüsü.....	71
Çizelge 2.6: SDS-PAGE jel solüsyonu içeriği.....	77
Çizelge 3.1: M (RRMS) grubu ve K (kontrol) grubu arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları.....	84
Çizelge 3.2: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanı, T2 lezyon ve total lezyon sayılarının karşılaştırılması.....	85
Çizelge 3.3: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarının uyumluluk ve fark değerlendirmeleri.....	86
Çizelge 3.4: M Grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanı, T2 lezyon ve total lezyon sayılarının cinsiyete göre karşılaştırılması.....	87
Çizelge 3.5: ER stres genleri ve apoptotik genlerin REL değerlerinin DMF tedavisi öncesi RRMS’li hastalar (0A grubu) ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması	90
Çizelge 3.6: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	92

Çizelge 3.7: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>ATF4</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	94
Çizelge 3.8: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>ATF6</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	95
Çizelge 3.9: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>BAX</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	96
Çizelge 3.10: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>BCL2</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	97
Çizelge 3.11: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CASP3</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	98
Çizelge 3.12: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CHOP</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	99
Çizelge 3.13: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>CHOP</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	100
Çizelge 3.14: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>eIF2α</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	101
Çizelge 3.15: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>IRE1</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	102
Çizelge 3.16: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen <i>GRP78</i> REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması.....	103
Çizelge 3.17: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında karşılaştırılması.....	105

Çizelge 3.18: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin atak öyküsüne bağlı olarak oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılması.....106

Çizelge 3.19: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) elde edilen total protein lizatlarının



normalizasyon aşamasında kullanıldığı WB deneylerinden elde edilen Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait densitometrik analiz sonuçları ..
108

- Çizelge 3.20: 0A (Naif RRMS Hastaları) grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo 110
- Çizelge 3.21: Naif RRMS hastalarının 3 ay boyunca DMF kullanımı sonucunda oluşturulan 3A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo.....112
- Çizelge 3.22: Naif RRMS hastalarının 6 ay boyunca DMF kullanımına bağlı oluşturulan 6A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo.....113
- Çizelge 3.23: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....115
- Çizelge 3.24: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....117
- Çizelge 3.25: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....118
- Çizelge 3.26: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....119
- Çizelge 3.27: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....121
- Çizelge 3.28: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri.....122

Çizelge 4.1: ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin STRING veri tabanından elde edilen ortak ifadelenme skoru.....	161
--	-----



KISALTMALAR

1,25VD	: 1,25-Dihydroxyvitamin D
25VD	: 25-Hydroxyvitamin D
ABA	: ATP Bağlayıcı Alan
AH	: Alzheimer Hastalığı
Akt	: Protein Kinase B
AMPK	: AMP-Aktifleştirilen Protein Kinaz
APC	: Antijen Sunan Hücre
APRIL	: A Proliferation-Inducing Ligand
APS	: Ammonium Persulfate
ARE	: Antioksidan Yanıt Elemanı
ASK1	: Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
ATF	: Activating Transcription Factor
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAFF	: B-cell Activating Factor of the TNF Family
BAX	: Bcl-2 Associated X Protein
BBB	: Kan-Beyin Bariyeri
BCA	: Bicinchoninic Acid Assay
BCL2	: B-Cell Lymphoma 2
BGOF	: Buffered Glycerol Oxidation Factor
BiP	: Binding Immunoglobulin Protein
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BSA	: Bovine Serum Albumin
C/EBP	: CCAAT/Enhancer Binding Protein
Ca	: Kalsiyum
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
CASP	: Kaspaz
CCL	: C–C Motif Chemokine Ligand
CCR	: C–C Motif Chemokine Receptor
cDNA	: Complementary DNA
CHOP	: C/EBP Homologous Protein

CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CO₂	: Karbondioksit
cTC	: Cytotoxic T Cell
CTLA	: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CXC	: CXC Motif Chemokine
CXCL12	: CXC Motif Chemokine Ligand 12
DDDT	: Dichlorodiphenyltrichloroethane
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
DH	: Dentritik Hücre
DMF	: Dimetil Fumarat
DMT	: Disease Modifying Therapy
EAE	: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBNA	: EBV Nuclear Antigen
EBP	: Epstein-Barr Virus Binding Protein
EBV	: Epstein-Barr Virus
ECH	: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
EDSS	: Expanded Disability Status Scale (Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği)
eIF2α	: Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER-Associated Degradation
gDNA	: Genomic DNA
G-KUF	: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GPCR	: G Protein-Coupled Receptor
GRP78	: Glucose-Regulated Protein 78
GSH	: Glutathione
GST	: Glutathione S-Transferase
GST-1	: Glutathione S-Transferase 1
GSTP	: Glutathione-S-transferase P
GTF	: Glucosyltransferase
HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution

HCAR2	: Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2
HKH	: Hematopoetik Kök Hücreler
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
HLA-DR	: Human Leukocyte Antigen DR
HO	: Heme Oxygenase
HO-1	: Heme Oxygenase-1
HRP	: Horseradish Peroxidase
HSPA	: Heat Shock Protein A
HYG	: Hücre yüzeyinde bulunan GRP78
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN-β	: Interferon Beta
IgG	: İmmüoglobulin G
İKU	: İyi Klinik Uygulamaları
IL	: Interleukin
IRE1	: Inositol-Requiring Enzyme 1
JAK	: Janus Kinase
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
KİS	: Klinik İzole Sendrom
KPY	: Katlanmamış Protein Yanıtı
LSM-A	: Laser Scanning Microscope-A
MAb	: Monoclonal Antibody
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MHC	: Ana Doku Uyumluluk Kompleksi
MMF	: Monometil Fumarat
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Multipl Skleroz
MSIF	: Multiple Sclerosis International Federation
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi

mtDNA	: Mitokondriyal DNA
MTM	: Monosit Türevi Makrofaj
Nab	: Neutralizing Antibody
NAD(P)H	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Reduced
Na-EDTA	: Sodium Ethylenediaminetetraacetic Acid
NDH	: Neutrophil-Dendritic Hybrid
NEDA	: No Evident Disease Activity
NEF	: Nötrofil ve eritrosit içeren faz
NFW	: Nuclease-Free Water
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
NHDT	: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları
NQO	: NAD(P)H Quinone Dehydrogenase
NQO-1	: NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
Nrf2	: Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2
OB	: Oligoklonal Bantlar
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PERK	: Protein Kinase R-Like Endoplasmic Reticulum Kinase
PH	: Parkinson Hastalığı
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
PKR	: Protein Kinase R
PML	: Progressive Multifocal Leukoencephalopathy
PPMS	: Primer Progresif MS
pro-GM	: Granulocyte-Monocyte Progenitor
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
qRT-PCR	: Quantitative Reverse Transcription PCR
RBC	: Red Blood Cell
RIDD	: Regulated IRE1-Dependent Decay
RIPA	: Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer
RNA	: Ribonucleic Acid
RNaz	: Ribonuclease

ROS	: Reactive Oxygen Species
RRMS	: Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis
RT-PCR	: Reverse Transcription PCR
SBA	: Substrate Binding Domain
SDS-PAGE	:Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIRT1	: Sirtuin 1
SPMS	: Secondary Progressive MS
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
STRING	:Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TB	: Tryphane Blue
TBST	: Tris-Buffered Saline with Tween-20
TC	: Thoma chamber
TCR	: T Cell Receptor
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TF	: Transcription Factor
TLR	: Toll-Like Receptor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TOBB ETÜ	: Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
TRAF2	: TNF Receptor–Associated Factor 2
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UPR	: Unfolded Protein Response
UV	: Ultraviolet
UVB	: Ultraviolet B
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VDR	: Vitamin D Receptor
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
WB	: Western Blot
XBP	: X-Box Binding Protein

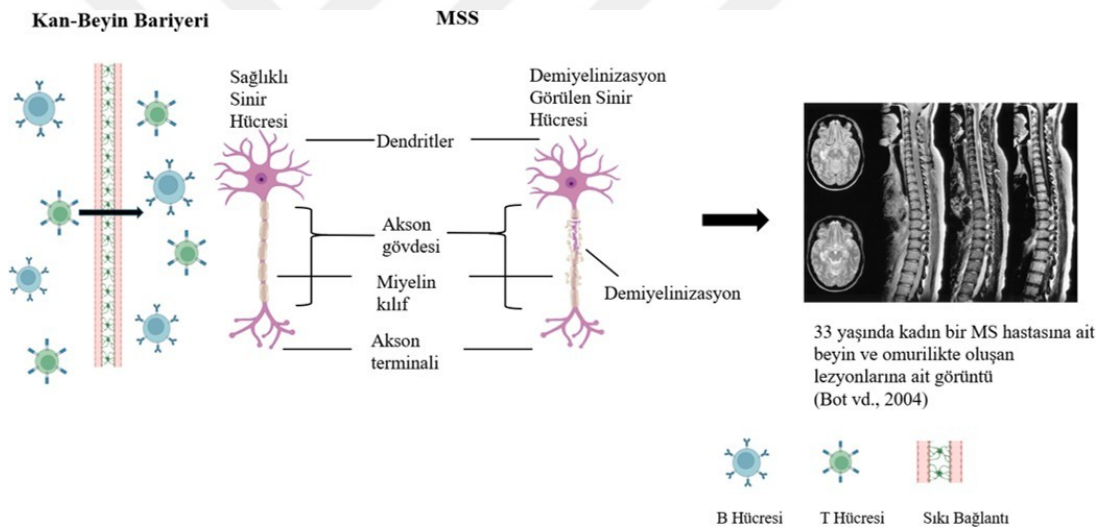
SEMBOL LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa 1
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
C_t	Threshold Cycle
ΔC_t	Delta C_t
$\Delta\Delta C_t$	Delta delta C_t
κ	Kappa
%	Yüzde
dk	Dakika
g	Gram
ng	Nanogram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
kb	Kilobaz
bç	Baz çifti
V	Volt
χ^2	Ki-kare
<	Küçüktür
>	Büyüktür
$\geq$	Büyük eşittir
$\leq$	Küçük eşittir
$\approx$	Yaklaşık
=	Eşittir
+	Artı
x	Çarpı
$\pm$	Artı-eksi

1. GİRİŞ

1.1 Multipl Skleroz ve Tanı

Multipl Skleroz (MS) otoimmün, miyelin kaybı (demyelinizasyon) ve nörodejenerasyon ile karakterize edilen ve merkezi sinir sistemini (MSS) etkileyen çok faktörlü bir hastalık olup travmatik olmayan ancak engelliliğe sebebiyet veren bir hastalıktır (Hurwitz, 2009). İmmün yanıtlar ile ilişkili bir şekilde gelişen miyelin kaybı ve akson hasarı sonucunda oluşan lezyonlar MSS’de beyin ve omurilikte ortaya çıkabilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: MSS üzerinde MS’ye bağlı görülen temel olgular (Hurwitz, 2009; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). MSS: merkezi sinir sistemi.

Yapılan son çalışmalara göre dünya çapında 2023 yılında 2,9 milyon kişinin MS ile yaşadığı bilinmektedir ve 2020 yılında yapılan bir çalışma sonucunda hastalık prevalansının %50 üzerinde artış gösterdiği bildirilmiştir (MSIF 2020; Walton vd., 2020). Lezyon oluşumu ve demiyelinizasyon sonucunda sinir sisteminde görülen sinyal iletim kayıpları; beyin, omurilik ve optik sinirleri etkileyecek şekilde fonksiyon kayıplarına neden olarak hastalık semptomlarını oluşturur. Bu duruma ek olarak MS’nin MSS üzerinde birden fazla bölgede etki alanı oluşturması,

lezyonların



bulunduğu bölgelerin farklılığı hastalık tanısı almış bireylerin heterojen semptomlar oluşturmalarını da etkilemektedir.

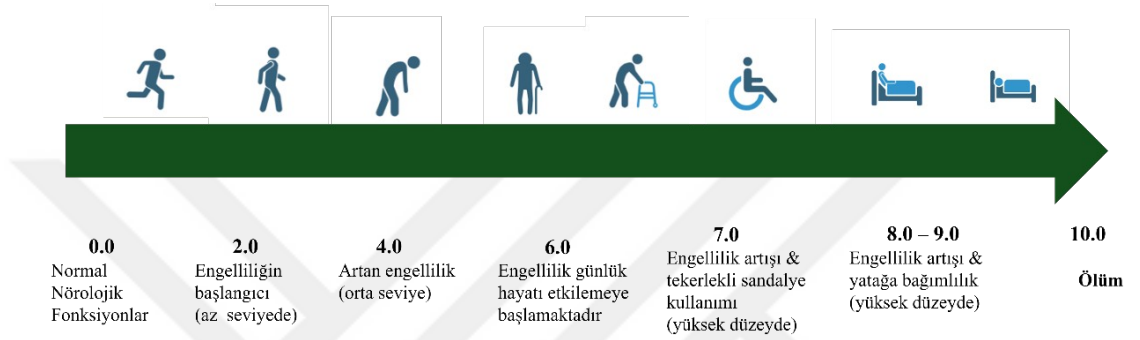
MS ile ilişkili bir şekilde görülen semptomlar yürüme güçlüğü, görme sorunları, bağırsak disfonksiyonu ve kuvvet kaybı olarak çeşitlendirilebilmektedir (Cosh & Carslaw, 2014). Bu semptomların 24 saatten uzun süre belirgin bir bulgu halinde herhangi bir iyileşme olmaksızın devam etmesi ise atak dönemi olarak adlandırılır (Polman vd., 2011). Atak döneminde görülen semptomlar, atak döneminin süresi, sıklığı ve şiddeti hastalığın tanısı ve progresyonu ile de ilişkilendirilmektedir. Bu ilişki atak sürecinde hastalığa bağlı gelişen enflamatuvar tepkinin ve nörodejenerasyonun artmasına bağlı bir şekilde kurulmuştur. Hastalığın temel karakterizasyonu enflamasyon ve nörodejenerasyon arasında görülen korelasyon ile bağlantılıdır. Nörodejenerasyon, en genel anlamı ile nöronlarda fonksiyon kaybı ve yapısal hasar meydana gelmesi olarak belirtilebilir. Fakat MS’de nörodejenerasyon ve enflamasyon parametreleri arasındaki döngüsel ilişkide öncelikli olarak hangi parametrenin birincil olarak hastalığı tetiklediğı henüz net olarak anlaşılamamıştır (Louapre & Lubetzki, 2015). MS’nin doğası gereğı oldukça heterojen bir hastalık olması hastalığın tanısında da birden çok parametrenin değerlendirilmesini gerektirir.

1.1.1 MS’de Tanı

Hastalığın heterojen doğası ve çok faktörlü olması sebebiyle bir kişinin MS tanısı alması için belirlenmiş olan, literatürde de kabul gören çeşitli değerlendirme ölçekleri bulunmaktadır.

Klinikte görülen MS atağı olarak belirlenen ilk atak sonrasında bir bireyin MS tanısı alması için çeşitli klinik tetkiklerin uygulanması gerekmektedir. Bu tetkikler arasında en temelde kan tetkikleri, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) analizleri yer almaktadır. MS ile ilişkili bir şekilde ortaya çıkan ilk atak sonrasında kesin MS tanısının belirlenmesi için MSS içerisinde yer alan lezyonların zaman ve mekânda yayılımının MRG ile gösterilmesi (Demir vd., 2015) ve bu lezyonların oluşumuna sebep olabilecek diğere hastalıkların da dışlanması gerekmektedir (Gelfand, 2014).

Hastalık içerisinde atak olarak tanımlanan süreç, enflamasyonun ve hastalık bulgularının zirvede olduğu ve tedavi edilmediği sürece engellilikte artışa yol açan ya da kalıcı engelliğe sebebiyet verebilen de bir olgudur (Polman vd., 2011). MS tanısı almış kişilerde görülen engellilik derecesi bir puanlama ölçütü ile değerlendirilmektedir. Bu puanlama ölçütü genişletilmiş engellilik durum ölçeği (expanded disability severity score-EDSS) ismi ile anılmaktadır ve 0-10 puan arasında değerlendirilmektedir. EDSS=0 değeri sağlıklı/normal bir durumu belirtirken EDSS=10 durumu MS'den temel alan ölümü ifade etmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: EDSS ölçeklendirmesi (Kurtzke, 2015). EDSS: genişletilmiş engellilik durum ölçeklendirmesi (expanded disability severity score)

EDSS değerinde görülen artışlar MS ile ilişkili semptomların görüldüğü tüm MSS fonksiyonlarının yanı sıra bilişsel ve zihinsel birtakım fonksiyonlar, bağırsak ve mesane fonksiyonlarını da içermektedir (Kurtzke, 2015). Gelişen bir atak oluşturduğu ilk semptomlarla beraber bir kişinin MS tanısı almasını sağlayabileceği gibi, hali hazırda MS tanısı almış bir kişinin hastalık progresyonunu da semptomlarda meydana getirdiği kötüleşme ile tetikleyebilir.

BOS analizlerinde ise sağlıklı koşullarda BOS'ta görülmesi beklenmeyen immünoglobulin G (IgG) proteininin yani oligoklonal bantların (OB) tespit edilmesi enflamatuvar tepkinin bir sonucu olarak görülür ve MS tanısı için bir belirteç olarak kabul edilir. Bu durum literatürde BOS'larında OB görülen hastaların %95'inin kesin MS tanısı alması ile gösterilmektedir (McClean vd., 1990). MRG ve BOS analizlerine ek olarak uyarılmış potansiyeller ve revize McDonald kriterlerinin kullanılması MS'nin daha doğru bir şekilde teşhis edilebilmesini de sağlar (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). İlk kez 2001 yılında belirlenen, ayırıcı MS tanısı için kılavuz olarak kabul edilen, McDonald kriterleri günümüzde yenilenmiş bir şekilde geçerliliğini

korumaktadır. 2017 yılında son halini aldığı kabul edilen McDonald kriterleri (Çizelge 1.1) çeşitli klinik parametreleri ve hastalık semptomlarından atak geçirme olgusunu kullanarak hastalığın tanısı hakkında bir yönerge görevi görürken aynı zamanda hastalığın progresyonu hakkında da çeşitli yorumlar yapılmasını sağlar.

Çizelge 1.1: MS Tanısı İçin Kullanılan McDonald Kriterleri (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018)

Atak Sayısı	Lezyon Sayısı	Tanı için Kullanılan Ek Parametreler
≥ 2	≥ 2	Gerek duyulmaz ^a
≥ 2	Lezyonlara ait atak görülmesi ^b	Gerek duyulmaz ^a
≥ 2	1	MSS'de görülen ek bir lezyondan kaynaklanan atak veya lezyonların mekânsal ^c yayılımı
1	≥ 2	Klinik olarak ek bir atak varlığı veya lezyonların zamansal ^d yayılımı ya da BOS'ta görülen OB ^e varlığı
1	≥ 2	MSS'de içerisinde farklı bir mekânda ^c bulunan lezyonla ilişkili yeni bir atak veya lezyonların mekânda yayılım göstermesi sonucu ek bir atak oluşması ya da lezyonların zamanda ^d yayılım göstermesi veya BOS'ta OB ^e görülmesi
Gizli İlerleme	Atak olgusundan bağımsız 1 yıl klinik progresyon	MS'ye spesifik bölgelerde (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) ≥ 1 lezyon, Omurilikte ≥ 2 lezyon, BOS'ta OB saptanması parametrelerinden herhangi birinin varlığı
a: MRG lezyonların zamansal ve mekânsal yayılımı için tüm hastalara uygulanmaktadır. Tanıyı destekleyecek oranda yeterli klinik bulgu olmayan hastalarda MRG yapılan alanlara omurilik de dahil edilmesi ve BOS analizi yapılmalıdır. b: Atak varlığı gözetilerek koyulan tanı en güvenilir ve en objektif olan tanıdır. Hastanın atak öyküsünde nörolojik bulguların değerlendirilmesinin yanı sıra atak sürecinde görülen enflamatuvar ve demiyelinizasyon ilişkili olaylara ait klinik semptomlar değerlendirilir. c: Lezyonların mekânsal yayılımı MRG ile tetkik edilir. MS'ye özgü periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal veya omurilik bölgelerinin ikiden fazlasında birden fazla lezyon görülmesi mekânsal yayılımı ifade etmektedir. d: Lezyonlarda görülen zamansal yayılım da MRG ile belirlenir. Herhangi bir zamanda elde edilen MR görüntüsünde kontrast tutan ya da tutmayan lezyonların bir arada görüntülenmesi ve takip MRG'lerinde ilk MRG'ye göre en az bir yeni lezyon varlığının saptanması zamansal yayılımı ifade eder. e: BOS'ta OB saptanması tanıda zamansal bir yayılımın göstergesi olarak kabul edilir.		

Günümüzde Çizelge 1.1'de verilen 2017 McDonald Kriterleri kullanılmaktadır. Kriterlerin takip edilmesi sayesinde MS tanısı hızlı ve güvenilir bir hal almıştır. Kriterler içerisinde de yer alan MRG incelemesi ve OB'lerin varlığının

değerlendirilmesi sonucunda hastaların klinik durumlarına dair daha net belirlemeler yapılabilir. Hastalık patogenezi için araştırmalar gelişmeye devam ettikçe ve tanıya dayalı yeni belirteçler oluştuğunda tıpkı geçmişte olduğu gibi günümüzde de kullanılan McDonald kriterlerinin güncelliği sürdürülecek ve kesinliği arttırılacaktır.

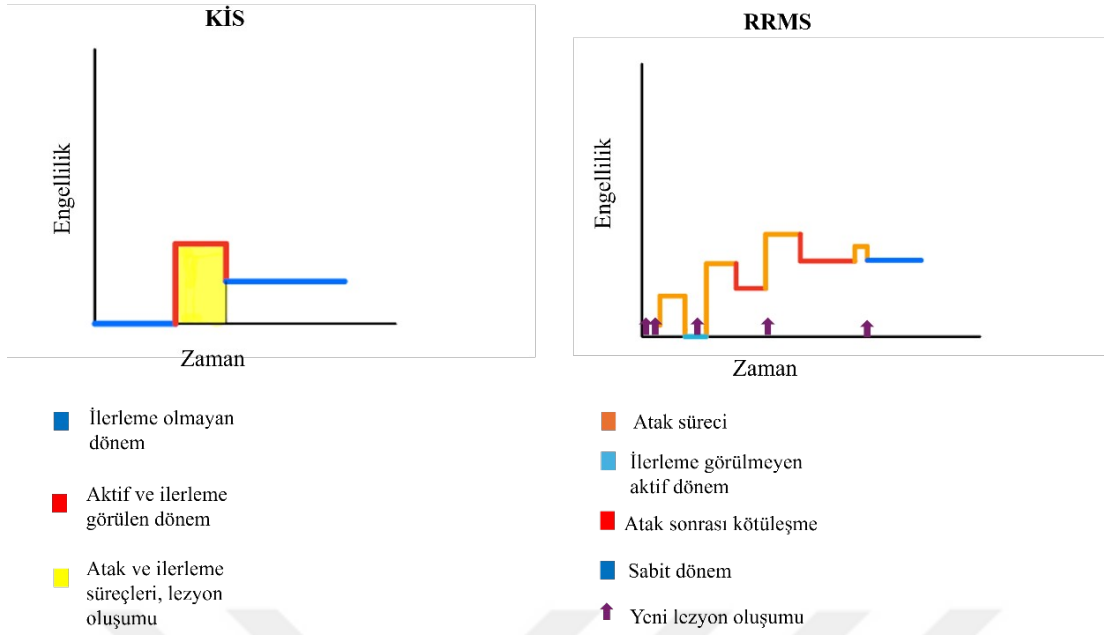
1.1.2 MS’de Klinik Alt Tipler

MS’nin görüldüğü popülasyonlarda birden çok ve homojen olmayan semptomlar göstermesi hastalığın seyrini etkileyen faktörleri de oluşturmaktadır. Bu nedenle MS, hastalık süresince görülen ataklar ve bu ataklarla ilişkili bir şekilde gelişen progresyona göre klinik olarak alt tiplere ayrılmaktadır.

Klinik izole sendrom (KİS) atakların, klinik bulguların ve nörolojik fonksiyon kayıplarının ilk kez görüldüğü, MS’nin başlangıç formu olarak kabul edilen bir alt gruptur (Şekil 1.3). İmmün tepkiyle beraber ilerleyen ataklar ve klinik bulguların artması ile KİS teşhisi almış bireylerin MS geliştirme riskinin de artmakta olduğu bilinmektedir (Brownlee & Miller, 2014; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). MS ile ilişkili ilk atak olarak belirlenen KİS sonrası bir bireyin MS tanısı alıp almayacağı yapılan klinik testler, değerlendirmeler ve MRG sonuçlarına göre değerlendirilmektedir. Yapılan bazı incelemelerde ise KİS tanılı bireylerin %30-70’inin ilerleyen yıllar içerisinde kesin MS tanısı aldığı da bilinmektedir (Hurwitz, 2009; Miller vd., 2005).

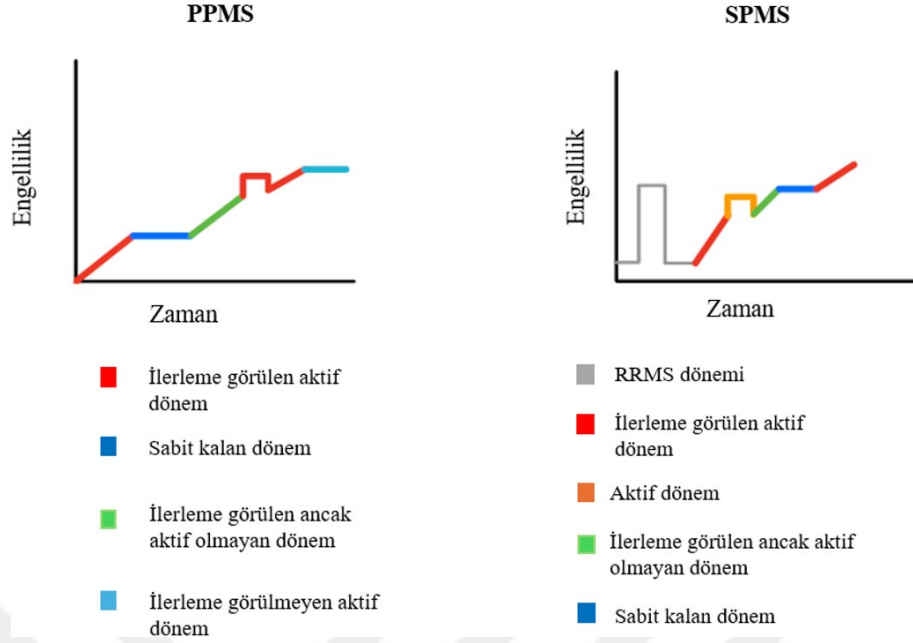
Yineleyen düzelen MS (relapsing-remitting MS-RRMS); MS’nin en yaygın formu olup, kesin MS tanısı almış hastaların %80’inde görülen bir MS alt tipidir (Weinshenker, 1998). MS’nin görece iyi huylu olan bu formu; hastalıkla ilişkili semptomların görüldüğü atak dönemleri ve bu atakların sonlandığı remisyon dönemlerini içermektedir (Şekil 1.3). Remisyon sürecinde atak döneminde görülen semptomların sebep olduğu fonksiyon kayıplarının uygun tedavi ile kalıcı bir etki meydana getirmemesi sağlanabilir.

RRMS formunda ataklar ve sonrasında görülen kısmi iyileşmelerin bulunmasına karşın hastalık progresyonu yıllar içerisinde, görece uzun bir süre olsa dahi, kümülatif bir şekilde artış gösterebilmektedir.



Şekil 1.3: KİS ve RRMS alt tiplerinin ilerleme süreçlerinde görülen engellilik durumunun zamana göre yayılımı (Lublin vd., 2014) KİS: klinik izole sendrom, RRMS: relapsing-remitting MS

MS tanısı almış kişilerin yüzde çok azında görülen primer progresif MS (PPMS); hastalığın başlangıcından itibaren sürekli ilerleyen semptomların görüldüğü ve çok az ya da geçici bir şekilde iyileşmelerin görüldüğü klinik bir alt tiptir (Loma & Heyman, 2011). PPMS’de diğer MS tiplerinden farklı olarak lezyonların omurilikte daha fazla görüldüğü bilinmektedir ve yine PPMS diğer MS türlerine kıyasla daha ilerlemiş yaşlardaki bireylerde görülmektedir (Thompson vd., 1997). RRMS sonrası kümülatif bir şekilde artan hastalık progresyonuna bağlı olarak gelişebilen sekonder progresif MS (SPMS); atak sıklığının az olduğu ancak hastalık semptomlarının arttığı ve iyileşme döneminin neredeyse hiç görülmediği bir klinik tiptir. RRMS hastalarının tanı sonrasındaki yaklaşık 15 yıl içerisinde SPMS geliştirdiği bilinmektedir (Şekil 1.4). RRMS grubunda değerlendirilmekte olan hastaların yaklaşık %80’i ilerleyen yıllarda, gelişen progresyona da bağlı olacak şekilde, SPMS tanısı almaktadır. MS’li hastaların yaklaşık %12’sinin tanıdan 5 sene sonra, %40’ının 10 sene sonra ve %66’sının 25 sene sonra sekonder alt tipe geçiş yaptığı görülmüştür (Weinshenker, 1998). Sürelerin birbirinden farklı olmasına karşın RRMS hastalarının SPMS geliştirme riskinin yüksek olduğu göze çarpmaktadır.



Şekil 1.4: SPMS ve PPMS alt tiplerinin ilerleme süreçlerinde görülen engellilik durumunun zamana karşı yayılımı (Lublin vd., 2014) PPMS: primer progresif MS, SPMS: sekonder progresif MS

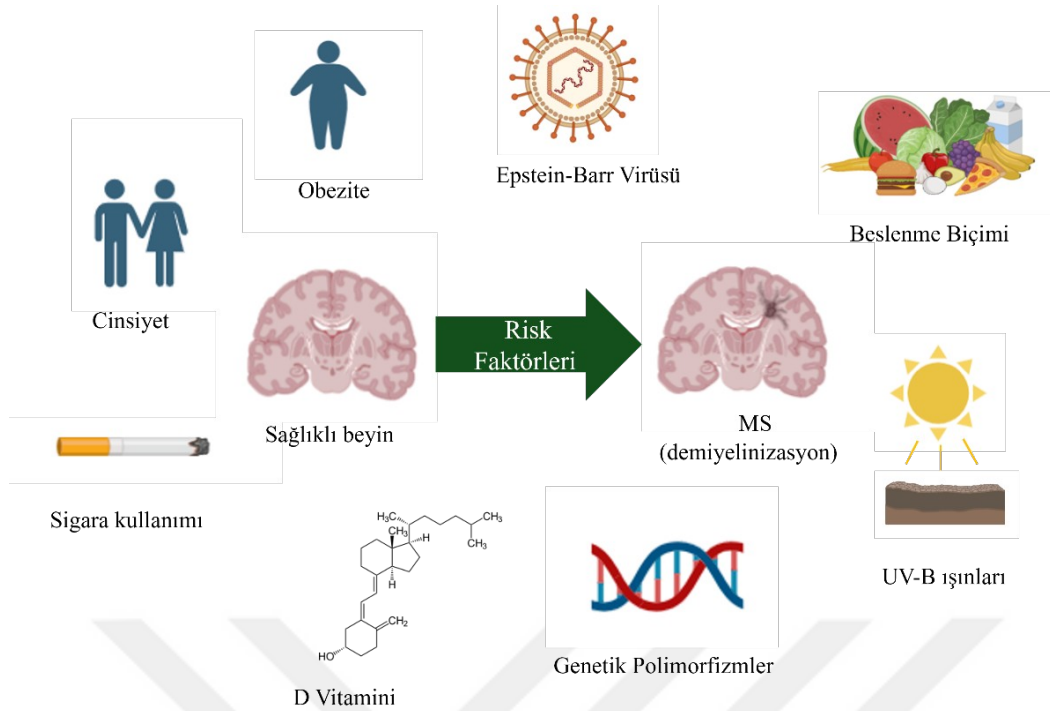
MS’de tedavi stratejileri en genel anlamda hastalığın doğası ile ilişkili olacak şekilde immün sistemi modüle etmeyi (immünmodülatör) ve immün sistemi baskılamayı hedefler. RRMS’nin immünmodülatör tedaviye en iyi yanıt veren klinik alt tip olma özelliğine sahip olduğu bilinirken, SPMS’nin immünmodülatör tedavilere karşı daha dirençli olduğu da görülmüştür (Rieckmann & Toyka, 1999).

1.1.3 MS’de Epidemiyoloji-Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Ayırıcı tanı haricinde hem hastalığın heterojen doğasını açıklayan hem de genetik ve çevresel faktörler ile MS’nin arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmayı hedefleyen etiyoloji ve epidemiyolojinin değerlendirilmesi MS’nin doğasının, nedenselliğinin ve yayılımının anlaşılması için oldukça gereklidir.

Epidemiyoloji toplumları ilgilendiren sağlık temelli olay ve durumların dağılımını ve sıklığını inceleyen bilim dalıdır. Etiyoloji veya neden bilimi ise gelişen bir olgu veya bir durumun ortaya çıkma nedenini araştırmakla yükümlü olan bilim dalıdır.

MS’de risk faktörleri hem genetik hem de çevresel etmenler açısından değerlendirilebilmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: MS gelişimini tetikleyen çevresel ve genetik risk faktörleri (Loma & Heyman 2011).

1.1.3.1 MS’de Genetik Risk Faktörleri

İnsan lökosit antijen geni (human leukocyte antigen-HLA) 6.kromozom üzerinde bulunan ve ana doku uyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex-MHC) içinde yer alan, insan ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. HLA tarafından kodlanan proteinler bağışıklık sistemi hücrelerinden T hücrelerine antijen sunan hücre yüzey proteinleridir. HLA kompleksi içerisinde yer alan HLA sınıf I ve sınıf II genleri genetik olarak MS için risk faktörleridir (Olerup & Hillert, 1991).

HLA sınıf I geni CD8⁺ lenfositlere antijen sunarken, sınıf II genleri ise CD4⁺ lenfositlere antijen sunumu yapmaktadır. Bu genlerde görülen varyantlar antijen sunumunu etkilemektedir. Örneğin HLA sınıf II varyantı (*HLA-DRB1*15:01*) MS geliştirme riskinde görülen artış ile ilişkilendirilmiş olup sınıf I varyantı ise (*HLA-A*02*) MS riskine karşı koruma ile ilişkilendirilmiştir (Brynedal vd., 2007).

İmmün sistem ile ilişkili genlere dair yapılan çalışmalarda, olası mekanizmaların değerlendirilmesine karşın bu genlerin MS ile ilişkilerinin henüz net olarak anlaşılamadığı durumlar da söz konusudur.

Bu nedenle immün sistemle ilişkili genlerin, MS yatkınlığı üzerinden değerlendirilmesi için yapılacak olan kalıtsal çalışmaların, kişiselleştirilmiş tedaviler için bireysel farklılıklar gözetilerek irdelenmesi ve araştırılması gelecek çalışmaların da odak noktasını oluşturacaktır.

1.1.3.2 MS’de Çevresel Risk Faktörleri

MS’nin karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık olmasında genetik faktörlerin yanında çevresel faktörler de yer almaktadır. Bu faktörler yaşam tarzı, beslenme biçimi ve çevresel etmenler üzerinden açıklanmaktadır. Özellikle sigara kullanımı, obezite, düşük D vitamini seviyesi, Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonu ve düşük güneş ışığı maruziyetinin MS riski ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Van Der Mei vd., 2016)

Sigara kullanımı (pasif ve/veya aktif) MS geliştirme riskinde görülen artış ile ilişkilendirilmiş (Simon vd., 2010) ve bu ilişkinin kullanım sıklığına bağlı olduğu belirlenmiştir (Handel vd., 2011). Sigara kullanımı yalnızca MS’nin gelişmesi ile ilgili olmayıp aynı zamanda hastalık sürecinde artan progresyon ile (Healy vd., 2009) ve bazı antikor temelli MS tedavilerinde yanıtızsızlık meydana getirmesi ile ilişkilendirilmiştir. İskandinav popülasyonu üzerinde HLA gen varyantları ve sigara içme üzerinde yapılan bir çalışmada; her iki parametrenin birleşiminin parametrelerin tek tek değerlendirilmesine kıyasla MS görülme sıklığındaki artışa daha büyük bir katkısının olduğu gösterilmiştir (Hedström vd., 2011).

Epstein-Barr Virüsü (EBV) bir DNA virüsüdür ve B hücrelerini etkilemektedir. B hücrelerini etkilemesi ile ilişkili olarak MS’ye ek olarak romatoid artrit, Sjögren sendromu gibi otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (Pender, 2012; Tracy vd., 2012). EBV ile MS arasındaki korelasyon MS hastalarında görülen EBV nükleer antijen 1 (EBNA) ve EBNA’ya karşı geliştirilen antikor seviyesinin yüksekliği ile kurulmuştur (Sundström vd., 2009). Nitekim, EBV ve otoimmünite üzerinde yapılan bir çalışmada enfeksiyonun ergenlik döneminde meydana gelmesinin MS riski ile ilişkilendirildiği görülmüştür. Ayrıca, yapılan birçok farklı çalışmada hem MSS hem de enflamasyon ile ilgili olacak şekilde EBV ve MS ilişkisinde görev aldığı düşünülen potansiyel moleküler mekanizmalar ortaya konmuştur (Sargsyan vd., 2010; Serafini vd., 2007). Bu potansiyel mekanizmalar içerisinde EBV’nin

enflamasyon üzerindeki



etkisinin biliniyor olmasına rağmen MS ve EBV arasındaki ilişki henüz net bir şekilde belirlenememiştir.

Obezite, kişinin ideal kilosunun %20 fazlasına sahip olması olarak tanımlanmaktadır. Obezite ve MS arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda ergenlik dönemi obezitesine sahip kadınlarda gelecek dönemde MS geliştirme riskinde artış olduğu görülürken, yetişkinlik döneminde görülen obezitenin kadın veya erkek olması fark etmeksizin MS teşhisini olumlu veya olumsuz etkilemediği raporlanmıştır (Hedström vd., 2014; Munger vd., 2013).

Ancak, obeziteden bağımsız bir şekilde değerlendirildiği takdirde kadınlarda erkeklere göre MS görülme sıklığının 3:1 oranını sağlayacak şekilde yüksek olduğu bilinmektedir (Dobson & Giovannoni, 2019). Obeziteyle beraber değerlendirilen bir diğer terim ise vücut kitle indeksi (VKİ) olup; bu değer bireyin ağırlığının boyunun karesine bölünmesi ile hesaplanmaktadır (Nuttall, 2015). Ergenlik döneminde yüksek VKİ değerine sahip olmanın yetişkinlik sürecinde MS riski açısından önemli olduğu ve hem obezite hem de VKİ'nin MS riski açısından etkinliğinin yaşam döneminin belirli bir kısmında başladığı bilinmektedir (Olsson vd., 2016).

MS ile ilişkili kabul edilebilecek bir diğer çevresel etmen ise kişinin beslenme biçimidir. Diyet ve MS ilişkisinde kesin bir kanıt bulunmamakla beraber diyet rejimleri ve beslenme biçimleri MS ile ilişkili birçok mekanizmayı etkileyebilmektedir (Sanchez vd., 2022). Örneğin MS'li hastaların beslenme biçimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, düşük antioksidan tüketiminin yüksek antioksidan tüketimine karşı hastalarda yüksek EDSS puanı ile korele olduğu ve antioksidanlar açısından zengin bir beslenme biçiminin hastalık prognozu ile ilişkili olabildiği gösterilmiştir (Mungan vd., 2023). Beslenme biçimi ve MS arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde önemli parametrelerden biri de mikrobiyotadır. Bağırsak mikrobiyotası tanımı bağırsak mukozasında bulunan mikroorganizmaları ve bu mikroorganizmaların seviyelerini içermektedir (Schepici vd., 2019). Yapılan araştırmalarda bağırsak mikrobiyotasının önemi; MSS'de yer alan bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını, olgunlaşmasını, çoğalmasını ve aktivasyonunu modüle etmesi nedeniyle nörolojik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Macpherson vd., 2017). Transgenik fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada T hücreleri aktifleştirilerek MS benzeri bir nöroenflamasyon meydana getirilmiş ve aynı transgenik fareler

mikrobiyotalarında yer alan bakteriler açısından



yoksun bırakıldıklarında MS benzeri nöroenflamasyonun gelişmediği görülmüştür (Berer vd., 2011). Yapılan bu çalışma sonucunda mikrobiyota içerisinde yer alan bazı bakterilerin immün hücreleri etkileyebileceği de gösterilmiştir.

D vitamini eksikliği ve güneş ışınlarına az seviyede ulaşım MS riski açısından bir arada değerlendirilen çevresel faktörlerdir. Bu durumun sebebi ise D vitamini biyosentezinde görev alan ultraviyole (UV) ışınlarının ana kaynağının güneş olmasıdır. D vitamini kalsiyum ve kemik yapım metabolizmasında görev almasının yanında enflamatuar sistemde de görev almaktadır. D vitamini, makrofajlar ve Toll benzeri reseptörler (toll like receptors-TLR) sayesinde doğal bağışıklık sisteminde görev alan sinyal mekanizmalarını düzenleyebilmektedir (Chen vd., 2013). Ek olarak D vitamini öncüllerinin, proenflamatuar bir sitokin olan interlökin 6 (IL-6) ifade seviyesini azaltırken; aktif T hücrelerinde çeşitli gen transkripsiyonlarını etkilediği ve enflamatuar sitokin ifadesini de baskıladığı literatüre sunulmuştur (White, 2012). Tüm bunlara ek olarak, yüksek D vitamini düzeyinin aksonal hasarı azalttığı bir çalışma (Sandberg vd., 2016) ve interferon beta (IFN- β) tedavi grubunda hastalık aktivitesinde düşüş meydana getirdiğini gösteren bir çalışma da (Fitzgerald vd., 2015) literatürde bulunmaktadır. Bu bağlamda D vitamini değerlendirildiğinde, düşük D vitamini seviyesinin MS geliştirme riskinde görülen artış ve enflamasyon ile ilişkili olduğu söylenebilmektedir.

D vitamini, antienflamatuar genlerin ifade seviyesini düzenlemek üzere hedef hücrelerde vitamin D reseptörlerine (VDR) bağlanır. Antijen sunumu yapabilen hücreler öncü 25-hidroksivitamin D (25VD) molekülünü aktif 1,25-dihidroksivitamin D'ye (1,25VD) metabolize eder. 1,25VD ise antijen sunumu yapan hücrelerde gelişen fazla aktif yanıtın azaltılmasını sağlar (Bishop vd., 2021; White, 2012).

Ayrıca hem nörodejenerasyon hem de oto-immünite ile ilişkisi olduğu bilinen endoplazmik retikulum (ER) stresinin D vitamini tarafından baskılanabildiği de bilinmektedir (Riek vd., 2012; Yuan vd., 2018). D vitamini, kalsiyum (Ca) emilimi ve plazma Ca seviyesini arttırmaktadır (Sozen vd., 2015). ER kendi fonksiyonları gereğince, hücre içi ikincil sinyal molekülü olmak üzere görev yapan Ca için adeta bir depo görevi görmektedir. ER ve D vitamini arasındaki ilişkinin irdelendiği, diyabet hastalarında yapılan bir çalışmada D vitaminin monosit ve makrofajlarda ER

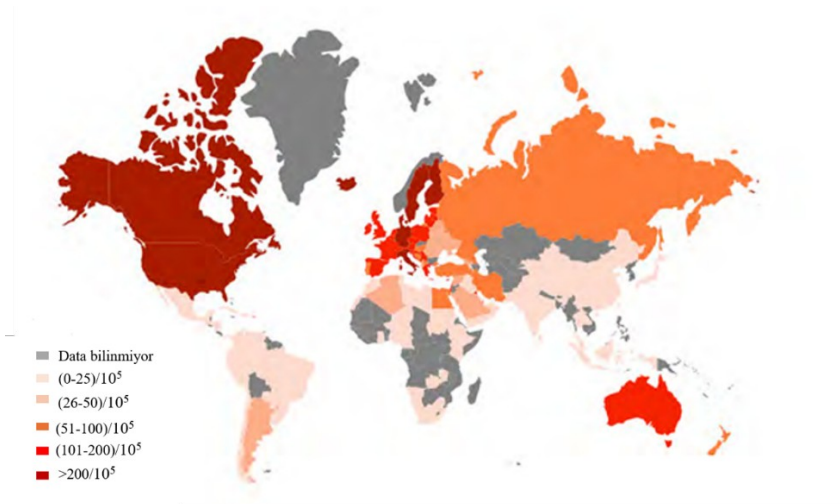
stresi baskılayabildiği gösterilmiştir ve serumda bulunan 25VD seviyesinin yükselmesinin



hastalığın gerilemesinde etkisi olduğu gösterilmiştir (Riek vd., 2012). Yine aynı çalışmada D vitamini takviyesinin monosit ve makrofajlarda ER stresini modüle ettiği ve enflamasyonu azalttığı da gösterilmiştir.

Güneş ışınlarına maruz kalma süresi ile MS görülme sıklığı arasında ise negatif bir korelasyon bulunmaktadır. Literatürde yer alan birçok çalışmanın taranması ve meta analizinin yapılması sonucunda yüksek miktarda UV ışınlarına maruziyet MS'nin görülme sıklığında azalma ile ilişkilendirilmiştir (Simpson vd., 2011). Enflamatuvar ve demiyelinizasyon görülen hastalıklardan özellikle MS'nin deneysel modellenmesinde kullanılan bir hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (experimental autoimmune encephalomyelitis-EAE) ile yapılan UV maruziyeti ilişkili bir çalışmada D vitamininden bağımsız olarak UV ışının EAE modelinde nöroenflamasyon gelişimini baskıladığı görülmüştür (Bäärnhielm vd., 2012; Becklund vd., 2010). Ayrıca UV ışınlarına maruziyetin antijen sunan dentritik hücreler (DH) ve T düzenleyici hücre (T regulatory cells -Treg) aktivasyonunun artması ile periferik enflamasyonu azalttığı da bilinmektedir (Rana vd., 2011).

MS'nin yayılımı coğrafi özellikler bakımından değerlendirildiğinde; UV ışınlarına maruziyet, D vitamini seviyesindeki değerler ve yıl içerisinde güneş ışınlarına maruziyet süresinin değerlendirilmesi sonucunda özellikle enlem dereceleri açısından bakıldığında ekvatora yaklaştıkça MS görülme sıklığının düştüğü bilinmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: MS'nin epidemiyolojisi (MSIF 2020).

MS’de görülen semptomların heterojen yayılımını etkileyen risk faktörlerinin, hastalığın epidemiyolojik ve etiyolojik değerlendirmelerinin bir arada incelenmesi hastalığın çok faktörlü karmaşık yapısının bir kez daha altını çizmektedir. Ancak her bir parametrenin çeşitli yönlerle hastalık üzerindeki etkisi belirlenmiş olsa dahi MSS’de MS fenotipinin gelişiminde, özellikle hastalığın erken evresinde, kesin ve net etkisi henüz açıklanamamıştır.

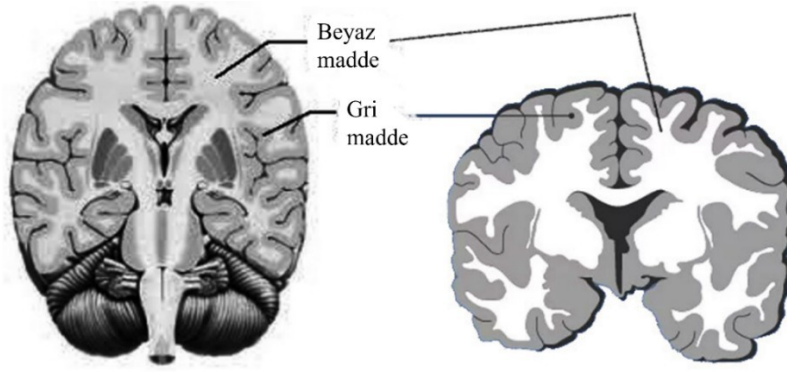
1.2 MS’nin Patogenezi

İlk kez Charcot tarafından 1868’de klinik ve patolojik tanımı ortaya konulan MS MSS’de beyaz ve gri maddede oluşan çoklu lezyonlar, demiyelinizasyon, akson hasarı ve oto-immünite ilişkili nörodejeneratif bir hastalıktır. Semptomları açısından bakıldığında ise MS; görme bozukluğu, güçsüzlük, koordinasyon bozukluğu, bağırsak ve mesane fonksiyonlarında değişim, bilişsel değişiklikler ve duyu durum bozuklukları gibi bireyin hayatını oldukça etkileyici ve birbirinden farklı semptomatik bulgular gelişmesine sebep olan bir hastalıktır (Loma & Heyman, 2011).

Beyaz ve gri madde en genel anlamı ile sinir sisteminin işlevini yerine getirmek amacıyla birlikte çalışan ve içerdikleri sinir hücresi bölümlerini bir arada tutan bölgelerdir (Şekil 1.7). Beyaz madde miyelin kılıf ile kaplanmış akson demetlerinden oluşan beyin ve omurilik bölgelerini içerirken gri madde ise sinir hücrelerinin gövdelerini, dendritleri ve miyelin içermeyen aksonları barındıran bir bölgedir (Pirko vd, 2007). Yapılan çalışmalar, beyaz ve gri maddede görülen lezyon oluşumu ve nörodejenerasyonun MS’de farklı hastalık semptomlarına sebep olduğunu göstermiştir (Mercadante & Tadi, 2020). Nörodejenerasyon, nöronların geri döndürülemez biçimde yapı ve fonksiyon kaybı olarak tanımlanmaktadır. Beyaz ve gri madde arasında görülen etkileşimde, beyaz maddede oluşan lezyonların gri maddede oluşan nörodejenerasyonu tetiklediği literatüre sunulmuştur (Charil & Filippi, 2007). Ayrıca, yapılan çalışmalarda KİS ve RRMS hastalarında gri maddede oluşan lezyonların hastalığın erken evresinde olduğu ve beyaz maddede oluşan lezyonlara oranla daha hızlı bir şekilde oluştukları gösterilmiştir. Bu duruma ek olarak, gri maddede oluşan lezyonlar bilişsel bozukluklar ve psikolojik süreçleri etkilerken beyaz madde lezyonları ise güçsüzlük, koordinasyon bozukluğu gibi daha

fiziksel fonksiyon kayıplarını tetiklemektedir (Chard vd., 2002; Dalton vd., 2004).





Şekil 1.7: Beyaz ve gri maddenin beynin içindeki konumları (Mercadante ve Tadi 2020).

MSS’de görülen lezyonlara ek olarak enflamatuvar tepki sonucunda hastaların BOS yapısında da bozulmalar meydana gelir. BOS MSS’de serebral ventriküllerden salgılanan, beyin ve omurilik arasında bulunan, çevrelediği organlara mekanik koruma sağlayan bir sıvıdır. BOS sağlıklı bireylerde yapı ve hacimce muhafaza edilirken nörodejeneratif hastalıklarda bu muhafaza durumu bozulur ve BOS fonksiyonlarında kayıp meydana gelir.

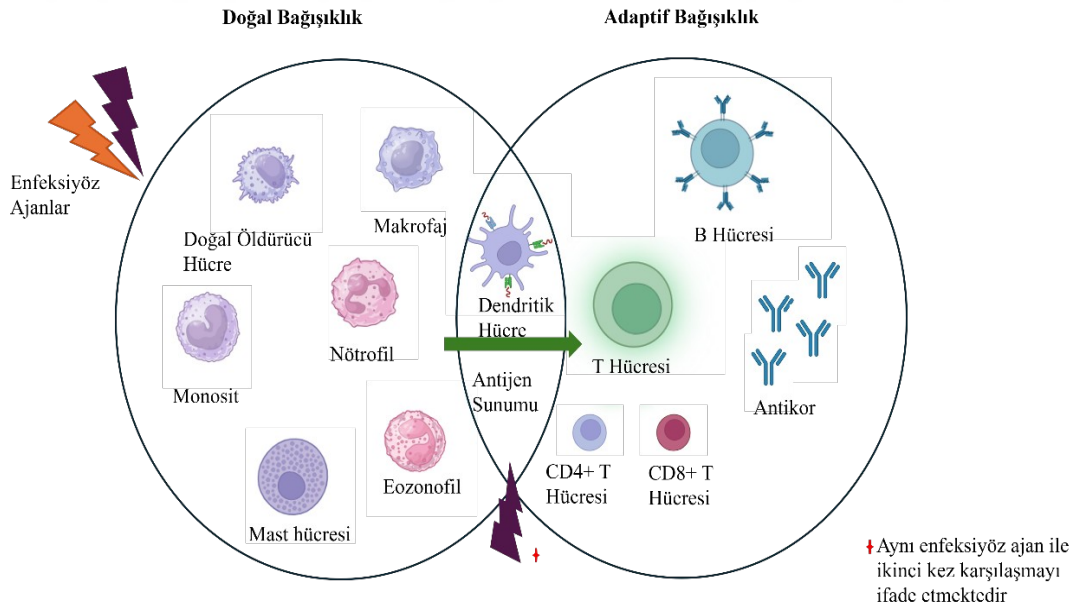
BOS, beynin kimyasal dengesinin ve pH dengesinin sağlanması, nörotropik faktörlerin dağıtımının dengelenmesi olmak üzere birçok düzenleyici fonksiyona sahiptir (Simon & Iliff, 2016). Bu fonksiyonların en önemlisi kan-beyin bariyerini (KBB) geçemeyen maddeler için bir boşaltım yolu sağlamaktır (Lehtinen et al., 2011).

KBB genel olarak H_2O , CO_2 , O_2 ve lipid yapı içerisinde eriyen alkollere ve anestetik maddelere karşı geçirgenlik sağlarken ksenobiyotiklerin, toksik metabolitlerin ve bağışıklık hücrelerinin MSS’ye geçişini engelleyen bir bariyer olarak tanımlanmaktadır (Ortiz vd., 2014). KBB bu madde geçişini kılcal damarların duvarlarında bulunan epitel hücreler ile oluşturduğu sıkı bağlantıları kullanarak denetler. KBB sayesinde dolaşımdaki kan ve beyin arasında bir arayüz oluşturulur (Benz & Liebner, 2020). Bu özellikleri sayesinde KBB beyni çeşitli enfeksiyon ve hastalıklardan koruyan bir yapı halini alır. Öyle ki, KBB’de görülen bozulma ve değişimler nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilir. Özellikle MS’de lenfositlerin MSS’ye geçişine KBB’de bulunan sıkı bağlantıların kaybı ve bu hücrelerde bulunan aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi neden olmaktadır (Ortiz vd., 2014).

KBB’de görülen bozulmayla beraber immünite aracılı demiyelinizasyon ve akson hasarının tetiklenmesi, KBB yıkımının da nöroenflamasyon ilişkili olarak MS patogeneziine dahil olduğunu göstermektedir (Cassan & Liblau, 2007).

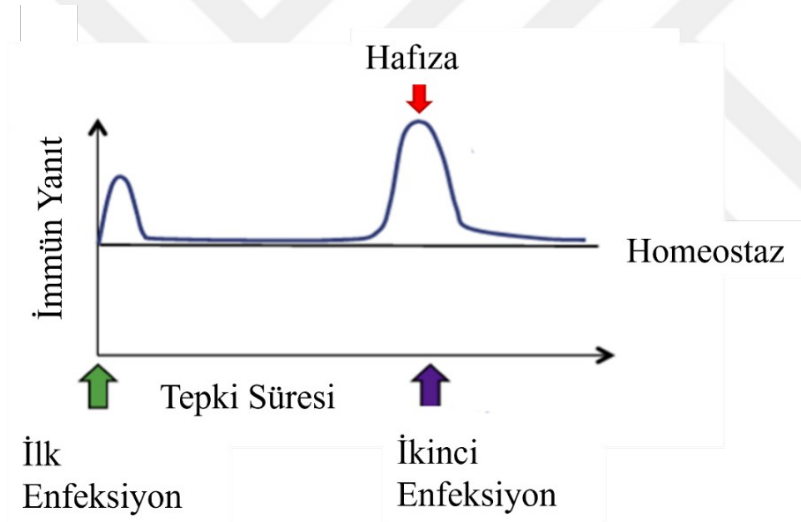
MS patogeneziini MSS’de oluşan lezyonlar, BOS ve KBB yapısında görülen değişimler ile açıklamak hastalığın gelişim mekanizmasını anlamak için yeterli olmayacaktır. Hastalık patogenezinin anlaşılması için nöroenflamasyonu oluşturan sistemlerin de irdelenmesi gerekmektedir. Nöroenflamasyon en genel hali ile immün sistem elemanlarının bir veya birkaçının MSS içerisinde beyin ve omurilikte enflamatuvar tepki oluşturması olarak tanımlanabilir.

Enflamatuvar tepki doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık tepkileri tarafından düzenlenmektedir. Doğal bağışıklık sistemi, fagositoz yapabilen hücrelerini (nötrofil, monosit ve makrofajlar) kullanarak ya da adaptif immün sistemi etkinleştirebilecek molekülleri salgılayabilen hücrelerini (bazofil, mast hücreleri ve eozinofiller) kullanarak enflamatuvar tepki oluşturabilir (Şekil 1.8). Bu özellikteki hücrelerin dışında doğrudan doğal öldürücü hücre adı verilen hücre grubu da kullanılabilir (McComb vd., 2019; Vivier vd., 2011). Adaptif bağışıklık sisteminde ise T hücresi, B hücresi (lenfositler) ve antikorlar görev almaktadır.



Şekil 1.8: Doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerine ait hücreler ve iki sistem arasındaki iletişimin temsili gösterimi (Abbas vd., 2015).

Doğal bağışıklık sisteminin spesifik özelliği immün sistem içerisinde ilk tepkiyi oluşturmaktır. Oluşturulan bu ilk tepki saatler içerisinde başlatılır ve enfeksiyöz ajan sistemden atılana kadar aynı tepki devam ettirilir. Çeşitli avantajlarının olmasının yanı sıra doğal bağışıklık sisteminin en büyük dezavantajı hafıza fonksiyonunun olmamasıdır. Hafıza özelliğine sahip olan adaptif bağışıklık sistemi ise antijen aracılığıyla spesifik bir tanıma gerçekleştirir. Antijenler, immün sistem tarafından antikor üretimini tetikleyen ve organizmanın kendisine yabancı olan moleküller olarak tanımlanır (Leng & Bentwich, 2002; Netea vd., 2019). Bu tanıma esnasında adaptif bağışıklık sisteminde lenfositler görev alır (Abbas vd., 2015). Lenfositlerin immün sistem içerisinde birden fazla kez karşılaştığı aynı antijene karşı, ilk karşılaşmaya oranla tekrar oluşturduğu yanıtın, daha kısa sürede daha yüksek seviyede oluşturmaları ise hafıza özelliğini tanımlamaktadır. Bu ekseninde oluşturulan bağışıklık tepkisi üzerindeki değişim Şekil 1.9’da gösterilmektedir.



Şekil 1.9: İmmün sistem içerisinde hafıza fonksiyonunun immün tepkiye yansıması (Netea vd., 2019).

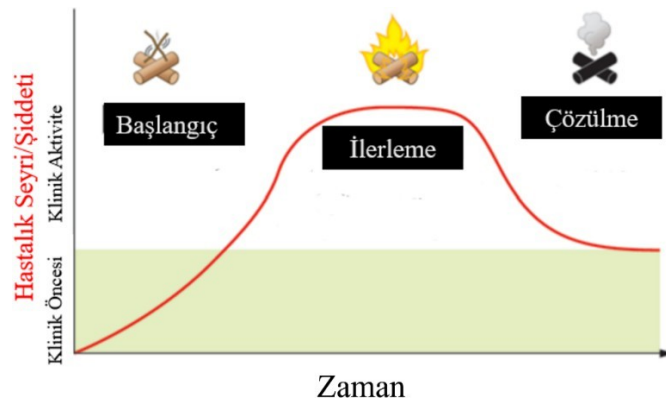
Arttırılmış bağışıklık tepkisi; ilk bağışıklık tepkisinden daha hızlı, daha büyük ve oluşturulan ilk tepkiden daha farklıdır. Bu farklılık hafıza fonksiyonu gereğince aynı antijene karşı her maruziyette bu antijene özgü uzun süreli hafıza hücreleri oluşturulması ile açıklanır. Bu bağlamda, hafıza B hücreleri ilk bağışıklık tepkisinde ürettikleri antikorlara göre daha hızlı bağlanma özelliğine sahip antikorlar üretirken hafıza T hücreleri ise antijenlere daha hızlı tepki verebilir hale gelir (Netea vd., 2019). Adaptif sistem içerisinde yer alan tüm bu düzen oldukça kontrollü bir şekilde

çalışır.



İmmün sistem kendi bileşenlerine karşı tanıma ve tolerans gösterme yeteneklerine sahiptir ve oto-antijenlere karşı savunma sistemini aktifleştirmekten iki farklı mekanizma aracılığı ile kaçınır. Bunlardan biri timüs ve kemik iliğindeki olgunlaşmamış T ve B hücrelerinin yüzey reseptörleri aracılı bir şekilde oto-antijenler ile etkileşerek apoptotik yollarla klonal silinme oluşturulmasıyken bir diğeri ise T ve B lenfositlerin büyüme ve çoğalma süreçlerinde oto-reaktif lenfosit gelişiminin engellenmesidir (Hogquist vd., 2005; Melchers & Rolink, 2006). Bu engellenmenin gerçekleşmediği durumlarda oto-reaktif hücreler, serbestçe bağışıklık tepkisi başlatarak oto-immünite görülmesine sebebiyet verirler.

Bu bağlamda oto-immünite, immün sistemin kendi içerisinde geliştirdiği toleransı kaybetmesi ile ilintili bir şekilde meydana gelen ve doğal süreçlerin bozulmasından kaynaklanan bir durum olarak tanımlanır (Nikbin vd., 2007). Oto-immün hastalıklar genel anlamda başlama, ilerleme ve çözülme olarak isimlendirilen üç başlık altında değerlendirilebilmektedir (Şekil 1.10). Bu başlıklar içinden ilki olan başlangıç aşamasında yok denilecek kadar az klinik semptom görülürken ilerleme aşamasında ise klinik semptomlar ortaya çıkar. Çözülme aşamasına gelindiğinde ise immün sistem kendi dengesini, düzenleyici ve inhibe edici yollarını aktive ederek yeniden sağlamaya, kurmaya çalışır (Rosenblum vd., 2015). Çözülme aşaması enflamatuar tepkinin sonlanması ve klinik aktivite öncesi dönemine geri dönüşü açıklar. Fakat belirli koşullarda çözülme aşamasında iyileşme görülmezsizin enflamatuar tepkide artış meydana gelebilir.



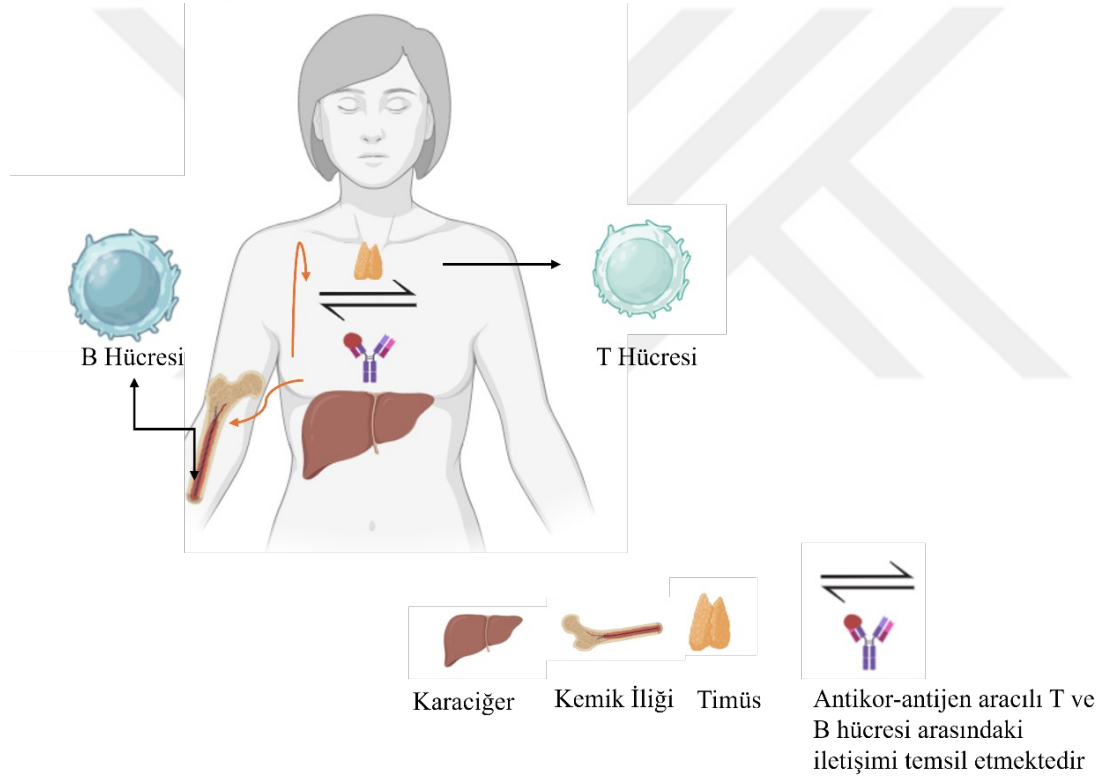
Şekil 1.10: Oto-immün hastalıkların evreleri (Rosenblum vd., 2015)

Bir bireyin oto-immün hastalık geliştirmeye olan yatkınlığı antijen sunan hücreler, T ve B lenfositlerde görülen fonksiyon bozuklukları, genetik duyarlılık ve enfeksiyöz ajanlar dahil olmak üzere bir dizi parametreye dayanmaktadır.

1.3 MS’de T ve B Lenfositlerin Rolü

Oto-immüniteye yatkınlık ve immün sistemin kontrol mekanizmalarında görülen bozulmaların en dikkat çekici ikilisi T ve B lenfositlerdir.

Lenfositler; karaciğer ve kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden (HKH) köken alarak oluşurlar. T lenfositler timüste olgunlaşırken; dolaşımdaki B hücreleri ise kemik iliğinde (Şekil 1.11) olgunlaşmaktadır (Abbas vd., 2015).



Şekil 1.11: T ve B hücrelerinin üretimine dair temsili görüntü (Abbas vd., 2015)

1.3.1 B Lenfositler

Olgunlaşan B hücreleri temelde oto-antikor üretme, sitokin salgılama, hafıza B hücrelerini oluşturma ve uzun süreli plazma hücresi halini alma özelliklerine sahiptir. B hücrelerinin bir alt türü olan ve aslen kısa ömürlü olan plazmablast hücreleri; CXC motifli kemokin ligand 12 (CXC motif chemokine ligand 12-CXCL12), TNF ailesi

ilişkili B hücresi aktive eden faktör (B cell activating factor of the TNF family-BAFF) ve proliferasyon indükleyen bir ligand (a proliferation inducing ligand-APRIL) öncül molekülleriyle uzun süre hayatta kalabilme özelliği kazanırlar. Bu özellikteki hücreler artık plazma hücreleri olarak kabul edilir ve yaşam sürelerini tamamlamak üzere kendilerine uygun bir ortam bulmaları gerekir (Krumbholz vd., 2012; Radbruch vd., 2006). Plazma hücreleri açısından dikkat çeken en önemli nokta plazma hücrelerinin, plazmada tespit edilebilen kalıcı IgG (immünoglobulin G) kaynağı olmasıdır (Obermeier vd., 2008).

Bir B hücresinin BOS'ta OB oluşturması için çeşitli mekanizmaların aktive olması gerekir. Enflamasyon sürecinde B hücreleri öncelikle dolaşımdan çıkarak KBB'yi geçer ve MSS'ye göç eder (Bankoti vd., 2014).

MSS'yi geçen B hücreleri, adezyon molekülleri ile düzenlenen sinyal mekanizmaları tarafından tekrar bir yönlendirilmeye tabi tutulur. KBB'de bulunan endotelial hücrelerin yüzeyinde ifade edilen vasküler hücre adezyon molekül-1 (vascular cell adhesion molecule-1-VCAM-1) bu sürece dahil olur ve bu sayede B hücreleri endotelial hücrelere tutunma yeteneği kazanmış olur (Alter vd., 2003). Endotelial hücrelere bağlanan B hücreleri, hücre içi adezyon molekül-1 (intercellular adhesion molecule-1-ICAM-1) etkisi ile endotelial hücrelerin bazal membranı kurduğu iletişim ile hücre-hücre etkileşimlerini daha da güçlü hale getirir. Kazandığı bu güçlü etkileşimler sayesinde MSS'ye göç eden B hücreleri kemokinler aracılığıyla MSS içerisinde spesifik bölgelere gidebilir (Comi vd., 2021). Bulunduğu bölgede lokal olarak aktive olabilen B hücreleri antikor üretir ve bu antikorlar yalnızca MSS'de değil BOS'da da görülebilir.

Genel olarak bakıldığında B hücreleri KBB geçişi ve OB oluşumuna sebep olmaları nedeniyle MS'de oldukça önemlidir ancak B hücrelerinin enflamasyona olan katkısı yalnızca bu iki parametre ile sınırlı değildir. B hücreleri T hücrelerine antijen sunarak da enflamasyona katkı sağlamaktadır (Nikbin vd., 2007).

1.3.2 T Lenfositler

T hücreleri antikor üretmeyen, antijenleri tanıyan ve tanıdığı antijenler sayesinde zararlı mikroorganizmaları ya kendisi öldüren ya da fagositoz işleminin gerçekleşmesi için sinyal yollarının ve/veya fagositlerin aktifleşmesini sağlayan

immün sistem



hücreleri olarak tanımlanmaktadır. T hücreleri fonksiyonel olarak birçok farklı alt kümeye sahiptir. Bu alt kümeler içerisinde yardımcı T hücreleri (T helper cells-Th), sitotoksik T hücreleri (cytotoxic T cells-cTC) ve Treg hücreleri görülmektedir. Bu alt kümelerde yer alan her bir T hücresi, dahil olduğu sinyal yollarında gelişen enflamatuvar yanıt süresince homeostazı sağlamaya yönelik bir şekilde çalışır (Kumar vd., 2018). Bu homeostaz hem Th'ler tarafından salgılanan proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinler hem de Treg'lerin bağışıklık sisteminin etkinliğini baskılaması aracılığı ile korunur.

Antijen sunumu ile aktifleşen T hücreleri farklılaşarak immün sistemi modüle edebilecek olan sitokinleri salgılamaya başlar. Sitokinler, immün sistem içerisinde hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rol oynayan protein yapıda küçük sinyal molekülleridir (Briukhovetska vd., 2021). Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan sitokinler hücre-hücre etkileşimi gerçekleştirir ve sonrasında birbiri aracılığıyla devam eden sinyal basamaklarını aktifleştirir. Örneğin IL-6; sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından etkilenen hücre aktivasyonu, çoğalması ve farklılaşmasını tetikleyen janus kinazı/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (Janus kinases/signal transducers and Activators of Transcription-JAK/STAT) sinyal yolağını aktifleştirerek lenfoidlerin farklılaşmasını tetikler (Morris vd., 2018).

Sitokinler, T hücrelerinin alt kümelerinde yer alan hücreler tarafından düzenlenebilir ve sahip oldukları proenflamatuvar-antienflamatuvar özelliklerle beraber immün sistemin homeostazının oluşturulmasında görev alırlar. Örneğin Th1 hücreleri IFN-Gamma, Th17 hücreleri ise proenflamatuvar sitokinleri (IL-17, IL-21, IL-22 ve IL-26) salgımlarken, Th2 hücreleri antienflamatuvar sitokinleri (IL-4 ve IL-13) salgılar (Raphael vd., 2015; Zhang & An, 2007). Sitokinler aracılığı ile korunan homeostazın bozulması ise oto-immüniteyi destekler. Örneğin, MS hastalarında Th1 ve Th17 ekspresyon seviyeleri yüksekken, Th2 ekspresyon seviyesi düşüktür ve dolayısıyla bu hücrelerin salgıladıkları sitokin seviyelerinde de değişim görülür. Böylece Th'ler ve sitokinler aracılığıyla oto-immünite desteklenmiş olur. Ayrıca değişen Th ekspresyon seviyelerine ek olarak, MS'de sistemdeki homeostazı koruyan Treg'lerin fonksiyonlarında da bir azalma görülür (Loma & Heyman, 2011).

Her ne kadar immün sistemin denetlenmesi ve düzenlenmesi açısından sitokinler ile

T hücreleri arasındaki ilişkinin oldukça önemli olduğu görülmüş olsa dahi gelişen



enflamasyon yalnızca bu ilişki kapsamında değerlendirilemeyecektir. Zira T hücrelerinin bu denli enflamatuvar bir tepki oluşturmalarını sağlayan yegâne olgu T hücrelerinin aktifleşmesidir ve bu aktifleşme T hücrelerine antijen sunulması ile gerçekleşir.

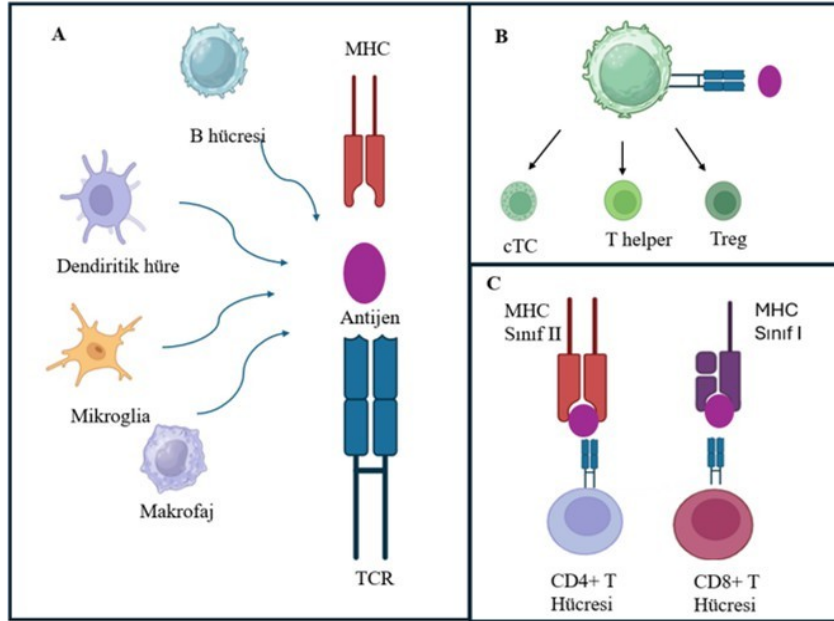
1.3.2.1 Antijen Sunumu

Adaptif bağışıklık yanıtın başlatılması için T hücrelerine; B hücreleri, DH'ler, mikroglialar ve makrofajlardan biri veya birkaçı tarafından antijen sunulması gerekmektedir. Birbirinden farklı bu hücre tipleri, sahip oldukları ortak fonksiyon gereğince antijen sunan hücreler (antigen presenting cells-APC) olarak tanımlanırlar. Antijen sunumu; yabancı antijenin yakalanması/tutulması, işlenmesi ve sunulması olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Bu aşamalarda T hücreleri ile APC'lerin yüzeyinde bulunan MHC molekülüleri bir arada hareket eder. Çoğu T hücresi yalnızca küçük peptit dizilerini tanıyabildiği için yardımcı bir eleman olarak MHC molekülünü kullanır (Abbas vd., 2015; De Bondt vd., 2020). MHC molekülünün sınıf I ve sınıf II alt grupları T hücrelerinin antijen tanınmasında önemli bir role sahip olan immün sistem elemanlarıdır. Hangi alt sınıfa sahip olduğu fark etmeksizin MHC molekülüleri, T hücreleri tarafından antijenlerin tanınmasını sağlamak amacıyla, peptit dizilerine bağlanarak uygun T hücrelerinin tanıma yapmasını sağlar. MHC sınıf I proteinleri sitotoksik CD8⁺ T hücreleri tarafından tanınırken MHC sınıf II proteinleri ise CD4⁺ T hücreleri tarafından tanınır (Wieczorek vd., 2017). MHC molekülüleri, T hücrelerinin aktifleşmesi ve antijen sunumunda hücre-hücre etkileşimin kurulabilmesi için görevli olan yolaklarda, moleküler mekanizmaların düzenli ve stabil bir şekilde çalışması için gereklidir. (Abbas vd., 2015; Garcia vd., 1998; Van Bleek & Nathenson, 1991). MHC'ler aracılığı ile antijen sunumu yapılan naif T hücrelerinde farklılaşma görülür. Antijenin kendisi ilk sinyal molekülü olarak kabul edilirse APC'lerin MHC molekülüleri ile oluşturduğu kompleks ve ikincil sinyal moleküllerinin sayesinde T hücrelerine ek bir uyarı gönderir. Kostimülatörler antijen sunum yoluğ içerisinde ikincil bir sinyal oluşturarak; T hücrelerinin antijene yanıt vermesi, bu yanıtın stabil kalmasını ve alt yolaqlara aktarılmasını sağlar. Öyle ki, kostimülatörlerin yokluğunda T hücreleri antijenlerle karşılaştığında yanıt veremez hale gelir ve bu yanıtsızlık durumu da uzun süreli tepkisizliğe yol açar. Tepkisizlik durumunun devam etmesi bir süre sonra T hücrelerinde apoptoz yolaqlarını

tetiklenmeye başlar (Zheng vd., 2004).



T hücrelerinin aktivasyonunda görev alan en önemli kostimulatörler; CD28, CD80 ve CD86 molekülleridir. CD28, T hücrelerin yüzeyinde bulunurken CD80 ve CD86 APC'lerde ifade edilir. CD28 ve CD80/CD86 arasında görülen bağlanmalar sayesinde APC ve T hücreleri arasında bir iletişim kurulabilir ve ilerleyen sinyal yolları (T hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve hücresel döngülerinin tamamlanması) aktiveleştirilebilir hale gelir. CD28 ve ilişkili diğer kostimulatör proteinlerin yer aldığı mekanizmalar yalnızca antijen sunumunu düzenlemekle sınırlı kalmaz. Örneğin CD28, fosfotidilinositol 3-kinaz-Akt (phosphoinositide 3-kinases-protein kinases B- PI3K-Akt) ve nükleer faktör kappa B (nuclear factor kappa B-NF- κ B) sinyal yolları üzerinde etkilidir. Bu yollar T hücrelerinin metabolik aktivitesi, proliferasyonu ve T hücrelerinde farklılaşmayı sağlayan sitokinlerin üretiminin artırılması ile ilişkilidir (Appleman vd., 2002; Boise vd., 1995; Halliday vd., 2020). Kostimulatörler, sitokinler ve APC'ler aracılı bir şekilde aktiveleşen T hücreleri; immün sistem içerisinde fonksiyonlarını yerine getirebilmek üzere farklılaşarak alt hücre gruplarını oluşturur. Antijen sunumu ve sonrasında T hücrelerinde görülen değişimler Şekil 1.12'de özetlenmiştir.



Şekil 1.12: T hücresi ve antijen sunumu arasındaki ilişki (Abbas vd., 2015; Garcia vd., 1998; Van Bleek & Nathenson, 1991). MHC: Ana doku uyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex), cTC: sitotoksik T hücresi (cytotoxic T cell), yardımcı T hücresi (T helper), Treg: regülatör T hücresi (regulatory T cells), TCR: T hücresi reseptörleri (T cell receptors)

1.3.2.2 MS ve T Lenfositler

MS'nin oto-immün karakterinin anlaşılması için yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde bu karakterin T hücreleri ile ilişkisi ön plana çıkmaktadır. Özellikle proenflamatuar sitokin salgılayan Th'lerde görülen sayıca artışının yanı sıra Treg'lerin Th'leri baskılayamaması da enflamatuar tepkinin sürekli olarak devam etmesine sebep olur. Sürekli devam eden enflamatuar tepkiye ek olarak, Treg fonksiyonlarında görülen azalma Th1 ve Th17 hücrelerinin MSS'ye göç etmesine sebep olur (Loma & Heyman, 2011). T lenfositlerinin MS içerisinde sinir hasarına aracılık etmesi birbirinden farklı mekanizmaların tetiklenmesi sonucunda gerçekleşir. Bu mekanizmalar içerisinde birçok farklılaşmış T hücresi görev alır ve bu T hücreleri KBB'yi geçerek MSS'ye geçiş yapar.

CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesi olan Th'ler ise KBB geçişini sağlamak üzere dolaşımda ilerler. Th1 ve Th17 hücrelerinin göçü sonucunda KBB içerisinde görülen sıkı bağlantılar matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından destabilize edilir ve KBB bazal membranı bozulmuş olur. Bu şekilde, MSS'ye geçen Th1 ve Th17 hücreleri, sitokinler yardımıyla tekrar aktifleşerek DH'leri, mikrogliaları ve makrofajları aktifleştirir. Th aracılı bir şekilde aktifleşen makrofajlar ve mikroglialar sitotoksik molekülleri salgılayarak oligodendrositlerde hasar oluşumuna veya ölüme sebebiyet verirler (Bretscher, 1999; Chastain vd., 2011; Chitnis & Prat, 2020; De Bondt vd., 2020).

Genel olarak bakıldığında T hücrelerinin aktif hale gelmesinden ziyade bu aktifliğin uzun süre son bulmaması ve bu durumu düzenleyecek Treg hücre grubunun fonksiyonlarında görülen azalmanın MS'de patogenezi doğrudan besleyen parametrelerden biri olduğu görülmektedir. Antijen sunumu yapan hücrelerin yalnızca B hücreleri, DH'ler, mikroglialar ve makrofajlarla sınırlı olmayıp nötrofillerin de antijen sunumu yapabildiği veya bu sunuma destek olabildiği görülmüştür (Radsak vd., 2000; Vono vd., 2017).

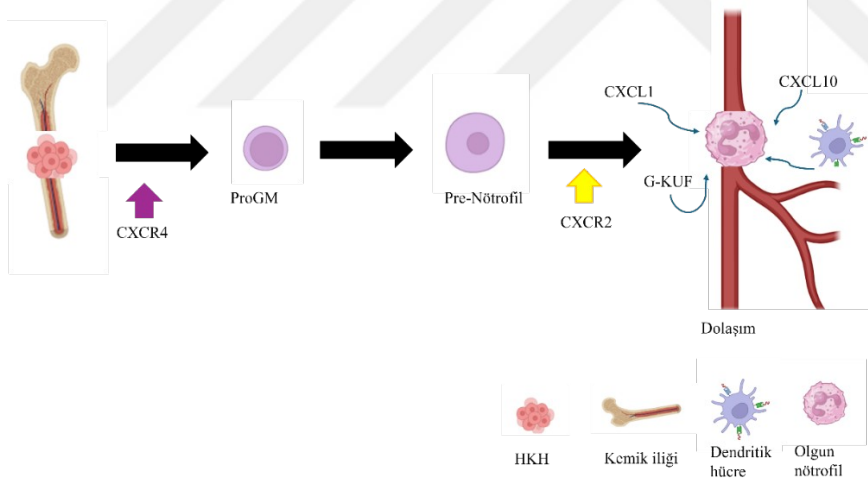
1.3.3 MS ve Nötrofiller

Nötrofiller; kanda en bol bulunan, granül içeren beyaz kan hücreleridir ve vücut savunmasında immün sistemin ilk bariyeri olarak görev alıp akut inflamasyon sürecinde ilk tepkiyi verirler. Nötrofiller de tıpkı lenfositler gibi kemik iliğinde

HKH'lerden köken alarak üretilir ve olgunlaşmadan önce dolaşıma salınmazlar (Bugl vd., 2012).

HKH'ler, CXCL12 ve CXC motifli kemokin reseptör tip 4 (CXC chemokine receptor type 4-CXCR4) kemokinlerine ait bir sinyal mekanizmasına dahil olarak kemik iliği nişlerine yerleşir ve granülosit-monosit öncülü (pro-GM) olan hücreleri oluşturmak üzere farklılaşır. Pro-GM hücreleri farklılaşmanın ilerleyen safhalarında önce erken nötrofil öncüllerine, ardından ise önce proliferasyon özelliğine sahip olan nötrofil öncüllerine (pre-nötrofil) sonra ise çeşitli faktörlerin etkisi ile olgunlaşmış nötrofillere dönüşür (Şekil 1.14).

CXCR2 ise hücrelerin kemik iliğinden çıkıp dolaşıma dahil olmasını sağlayacak bir sinyal yolağını aktive eder (Nauseef & Borregaard, 2014; Qu vd., 2023). Bu kemokin sinyalleşmesine ek olarak; DH'ler nötrofillerin kemik iliği, dolaşım ve periferik organlar arasındaki dağılımını, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-KUF), CXCL1 ve CXCL10 gibi moleküllerin üretimini kontrol ederek düzenler (Bugl vd., 2012; Nauseef & Borregaard, 2014).

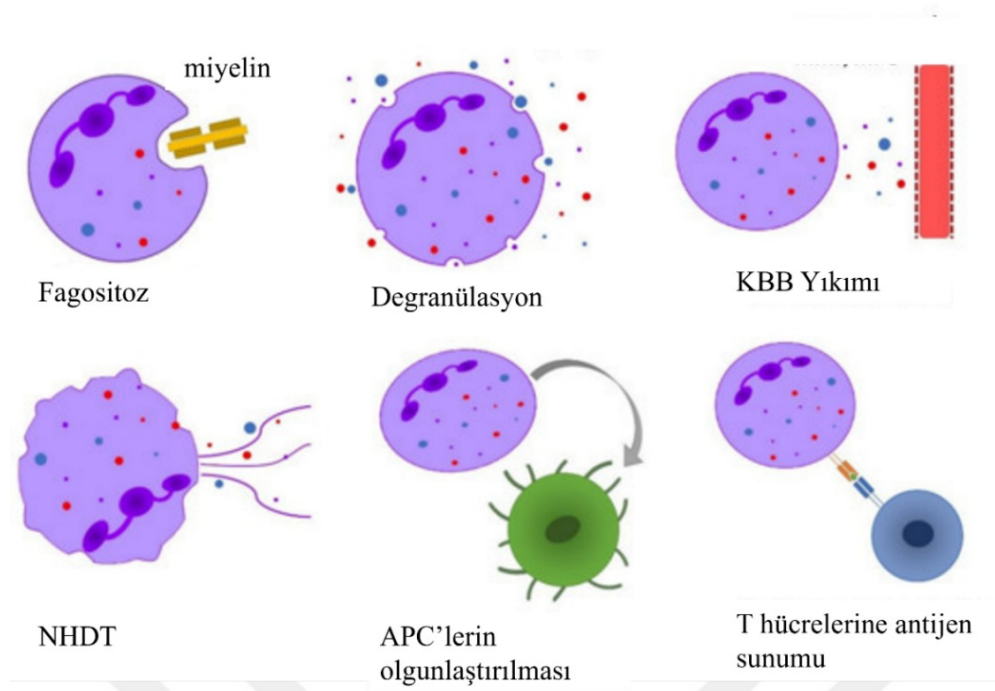


Şekil 1.13: Nötrofillerin olgunlaşması ve dolaşıma katılması (Nauseef & Borregaard, 2014). HKH: hematopoetik kök hücreler (hematopoietic stem cells), CXCR4: CXC kemokin reseptör tip 4 (CXC chemokine receptor type 4), ProGM: granülosit-monosit öncülü (granulocyte-monocyte progenitor), CXCR2: CXC kemokin reseptör tip 2 (CXC chemokine receptor type 2), CXCL1: CXC kemokin ligand 1 (CXC motif chemokine ligand 1), CXCL10: CXC kemokin ligand 10 (CXC motif chemokine ligand 10), G-KUF: granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte-colony stimulating factor)

Olgunlaşan nötrofiller, fagositoz, immün-modülasyon ve APC'lerin hazırlanmasını sağlamak üzere enflamasyon görülen bölgelere doğru hareket ederek aktifleşirler. Nötrofil aktivasyonu; bakteriyel ürünler, sitokinler veya kemokinler tarafından ve aktive edici sinyallerin G protein-bağlı reseptörler (G protein coupled receptors-GPCR) tarafından tanınması ile sağlanır. Aktifleşen nötrofiller yaralanma veya enflamasyon görülen bölgeye göç eder (Van Damme vd., 1988).

Nötrofillerin normal şartlar altında immün sistem içerisinde aktifleşmesi ve görev alması nedeniyle bu hücrelerin MS fenotipindeki değişimleri incelenmektedir. Yapılan bir çalışmada, MS hastalarının kanında nötrofilleri aktifleştiren kemokinlerin ve aktifleşen nötrofillerin alt sinyal yollarını tetiklemede kullandığı moleküllerde konsantrasyon artışı tespit edilmiş olup bu artışın hastalık aktivitesini arttırıcı yönde yeni lezyon oluşumuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Naegle vd., 2012). Yine MS hastaları ile yapılan bir çalışmada sağlıklı kontrollere kıyasla MS'li bireylerin nötrofillerinin aktifliğinin daha yüksek olduğu, daha fazla enflamatuvar belirteç eksprese ettiği ve apoptoza karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Hertwig vd., 2016). Ayrıca nötrofillerin dolaylı yoldan MS patogenezi sürecinde birtakım değişimlere maruz kaldığı da bilinmektedir. Örneğin MS'de sayısı ve aktifliği artan Th17 hücrelerinin, nötrofillerin aktifliğinin artmasını sağlayan bir geri bildirim mekanizmasını tetiklediği bilinmektedir (Abdallah vd., 2011). Bu geri bildirim mekanizması sayesinde aktifliği artan nötrofiller, enflamasyonu normalden daha yüksek oranda tetiklerken, sayıca daha çok DH'nin antijen sunumuna hazırlanmasını sağlayarak daha fazla T hücrelerinin aktif bir form kazandığı bir döngü meydana getirmektedir.

Nötrofillerin birtakım uyaranlara maruz kalmadan da hastalık patogenezinde yer almasını sağlayan çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Bunlar başlıca; miyelin yıkımı ve fagositozu, nötrofil hücre dışı tuzakları (NHDT), enflamatuvar öncüllerin salınımı (IL-1 β , miyeloperoksidaz (MPO) ve çeşitli proteinazlar), KBB yıkımı ve APC'lerin olgunlaştırılması olarak belirlenmiştir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14: Nötrofillerin MS patogeneze katkısının bulunduğu düşünülen olası mekanizmalar (De Bondt vd., 2020) KBB: kan-beyin bariyeri, NHDT: nötrofil hücre dışı tuzakları, APC: antijen sunan hücreler (antigen presenting cells)

MSS içerisinde görülen enflamasyon sonucunda ortaya çıkan demiyelinizasyon; oligodendrositler ve miyelinlerin, mikroglia ve miyeloid hücreler tarafından fagositoza uğraması ile tamamlanır (De Bondt vd., 2020). Normal şartlarda fagositoz işlemi makrofajlar ve mikroglialar ile ilişkili olarak kabul edilirken MS ile ilişkili bir şekilde yapılan hayvan deneylerinde miyelinlerin fagositoza uğramasında nötrofillerin makrofajların rolünü tamamlayıcı yönde etki gösterdiği olasılığı üzerinde durulmaktadır (Yamasaki vd., 2014).

NHDT, hücre içerisindeki materyallerin dış ortama salınması açısından nekroza benzeyen ancak programlı olan bir tür hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu hücre dışı tuzakları oluşturmak için nötrofiller içerdikleri mitokondriyal DNA'yı (mtDNA) dışarı bırakırlar. Bu sayede dış ortama salınan mtDNA'lar patojenlere karşı ek bir fiziksel bariyer şeklinde davranır. Ayrıca mtDNA'lar, nükleer DNA'ya benzer bir şekilde proteinlere, enzimlere ve histon proteinlerine bağlanabilirken, DNA bağlama özelliği olan reseptörler için ligand görevi de görür. Oluşan bu reseptör-ligand etkileşimi sayesinde mtDNA, MMP ve MPO'ya bağlanarak immün tepkinin güçlendirilmesini sağlar.

NHDT aracılı bir şekilde güçlendirilen immün tepki ise DH'lerin aktivasyonuna ve T hücrelerin hazırlanmasına da ek bir katkıda bulunur (Yousefi vd., 2009).

Nötrofillerin bu NHDT özelliğinin MS üzerinde spesifik etkisinin incelenmesi amacıyla bir dizi klinik araştırma yapılmıştır. Bu amaçla MS hastaları ve sağlıklı kontrollerin serumlarında bulunan NHDT belirteçlerinin seviyesi karşılaştırılmış ve belirteçlerin MS hastalarının serumunda daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (Naegle vd., 2012). Ayrıca, NHDT'ler ile ilgili yapılan farklı bir çalışmada, dolaşımdaki NHDT'lerin kadın hastalar ile karşılaştırıldığında erkek hastalarda daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. NHDT seviyesinin yüksekliğine ek olarak bu erkek hastalarda hastalığın daha ağır seyrettiği de görülmüştür (Tillack vd., 2013). Bu bağlamda cinsiyet bazlı farklılıkların hastalık patogenezinde farklı moleküler mekanizmaları etkilediği veya farklı moleküler mekanizmalardan etkilendiği yorumu yapılabilmektedir.

Genel olarak nötrofiller KBB yıkımına doğrudan bir etki göstermez. Nötrofil aracılı KBB yıkımı ya da KBB bütünlüğünün bozulması daha çok MMP ve MPO enzimleri aracılığıyla açıklanmaktadır. KBB yıkımında nötrofiller tarafından aktive edilen MMP-9 ve MMP-2 proteazlarının etkisi görülmektedir. Özellikle MS'de MMP-9 aktivitesinin daha yüksek olduğu ve hastalıkta ataklar arasındaki iyileşme süresini azaltıcı yönde etki ettiği de bilinmektedir (Gerwien vd., 2016). MPO'lar ise nötrofillerin granüllerinde bulunan ve patojenleri öldürmek üzere toksik radikaller üretebilen peroksidaz enzimleri olarak tanımlanır. MPO'lar; nötrofillerin aktive edilmesi, MSS'deki mevcudiyetlerine destek olunması ve apoptotik faza geçişlerini önlemek üzere etki gösterir (Aratani, 2018). MS patogenezi ve MPO'ların direkt bağlantısı henüz belirlenememiştir ancak nötrofiller üzerindeki etkisi MPO'ların dolaylı yoldan patogeneze katkı sağladığı düşüncesini oluşturmaktadır.

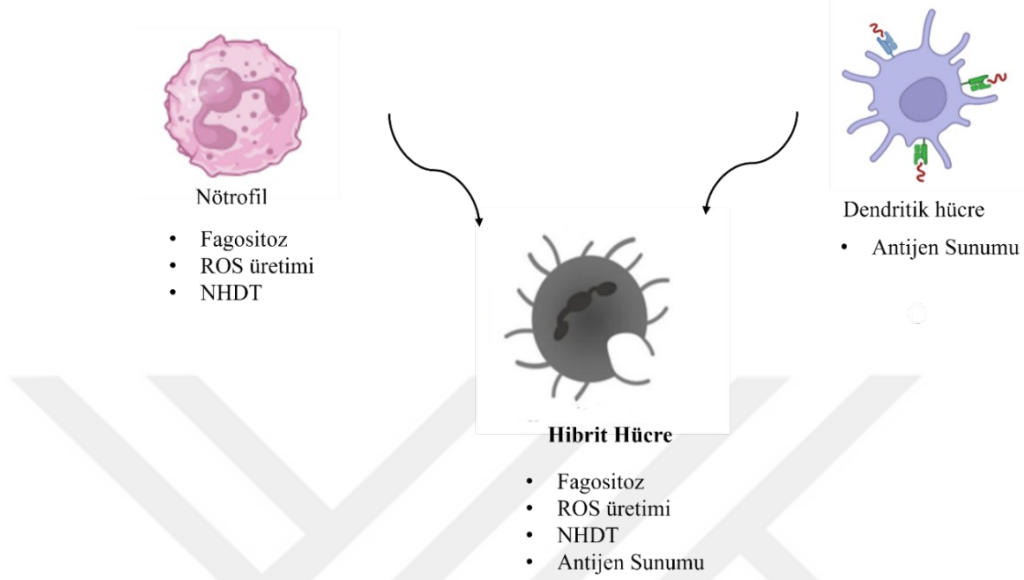
MMP ve MPO'lara ek olarak EAE modeli ile yapılan bir çalışmada KBB göçü esnasında nötrofillerin, IL-1 β ürettikleri tespit edilmiştir (Paré vd., 2017). Üretilen bu IL-1 β ise KBB'de yer alan endotelial hücreler ile reseptör-ligand etkileşimi kurarak nötrofiller aracılığıyla proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanmasına yol açarak zaten gelişmiş enflamasyonun artmasına sebep olur. IL-1 β temelde nötrofiller ve monosit türevli makrofajlar (MTM) tarafından üretilir.

IL-1 β ve nötrofiller arasında belirlenen bu ilişkiye ek olarak yapılan *in vivo* bir çalışmada, KBB endoteli boyunca göç eden nötrofillerin nörotoksik bir fenotip oluşturduğu görülmüştür (Allen vd., 2012). Ayrıca, artan IL-1 β seviyeleri sayesinde MTM'ler APC olmak üzere farklılaşarak T hücrelerini aktifleştirir ve enflamasyonun devamlılığına katkı sağlar (Croxford vd., 2015). IL-1 β 'nın enflamasyonun sürdürülmesindeki bir diğer etkisi ise Th17 hücreleri aracılığıyla proenflamatuvar bir sitokin olan IL-17A'nın salgılanmasını uyarmasıdır (Miossec, 2009). IL-17A; immün sistem hücrelerini tetikleyen farklı sitokin, kemokin ve MMP'lerin salınmasını indükleyerek birçok proenflamatuvar sitokin ile bir etkileşim ağı oluşturur. Bu etkileşim ağı sayesinde yalnızca immün tepkinin sürekli devam etmesi değil, MSS'de bulunan hücrelerin fonksiyonlarında da bozulmaların görülmesi söz konusu olur.

1.3.3.1 Nötrofiller ve Antijen Sunumu

Nötrofiller antijen sunumu işlemine APC'ler ile bir iletişim kurarak katılmaktadır. Bu iletişim sürecinde nötrofiller, lenfoid organlara ulaşır ve antijenleri DH'lere veya diğer APC'lere taşıyabilir, T hücrelerinin lenf nodlarında çoğalmasını engelleyebilir ve aynı zamanda B hücrelerinin olgunlaşmasını uyarabilir. Fakat, ilk olarak nötrofillerin bu fonksiyonları yerine getirmek için kemik iliğinden lenf düğümlerine göç etmesi gerekmektedir. Bu göç için lenf düğümlerinde C-C motifli kemokin ligand (CCL) 19 ve CCL21 ifadesinde artış görülür. CCL19 ve CCL21 ligandları nötrofillerde bulunan C-C motif kemokin reseptörü (CCR)-7'ye bağlanır. Artan reseptör-ligand etkileşimi sayesinde nötrofillerin lenf düğümlerine göç ettiği görülürken aynı zamanda artan CCR7 ifadesi sayesinde DH'ler de lenf düğümlerine göç eder (Beauvillain vd., 2011). Gelişen sinyalleşme ve reseptör-ligand etkileşimi sonucunda nötrofiller ve DH'ler lenf düğümlerinde bir arada bulunarak bir etkileşim meydana getirirler. Bu etkileşimin anlaşılması amacıyla yapılan *in vitro* bir çalışmada beraber kültürlenmiş nötrofil ve DH hücreleri arasında hücre-hücre temelli bir etkileşimin görüldüğü belirlenmiştir. Gerçekleşen etkileşim sonrasında hücrelerde CD40, CD86 ve HLA-DR izotipinin artan ifadesi ile karşılaşılmıştır (Megiovanni vd., 2006). Nötrofiller ve DH'ler arasında gelişen bu durumun sonrasında her iki hücre tipinin özelliklerini taşıyan yeni bir nötrofil-DH hibridi şeklinde hücre oluştuğu tespit edilmiştir. Oluşan yeni nötrofil-DH hibrit (NDH) hücreleri hem nötrofillerin hem de DH'lerin özelliklerini taşır.

Nötrofillerden fagositoz, ROS üretimi ve NHDT özelliklerini alan NDH; DH'lerden de antijen sunum özelliğini almıştır (Şekil 1.15). Bu duruma ek olarak NDH'ler, morfolojik anlamda DH'lere benzerken çekirdek yapıları açısından nötrofilleri andırmaktadır (Fites vd., 2018).



Şekil 1.15: NDH'lerin temsili gösterimi (De Bondt vd., 2020) NDH: nötrofil-DH hibrit hücre, DH: dendritik hücre, NHDT: nötrofil hücre dışı tuzakları, ROS: reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species)

NDH'lerin köken aldığı hücreler ile ortak özelliklerine karşın bu hücreler ile zıtlaşan birtakım özellikleri de bulunmaktadır. Örneğin NDH'lerin nötrofillere zıt bir şekilde yaşam sürelerinin uzun olduğu görülmüştür (Takashima & Yao, 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise NDH'lerin MHC sınıf II proteinlerini ve ko-stimülatörleri nötrofillere kıyasla daha çok bulundurduğu ve ifadelendirdiği görülmüştür. Ayrıca nötrofiller tek başına CD4⁺ T hücrelerini uyarmada yetersiz kalırken NDH hücrelerinin CD4⁺ hücrelerini uyarmada yeterli olabildiği fark edilmiştir (Vono vd., 2017).

Sonuç itibarıyla nötrofillerin ve NDH'lerin MS patogenezi dahil oldukları yapılan birçok çalışma ile literatüre sunulmuştur (Guarnieri vd., 1985; Parker Harp vd., 2019). Bu noktada her iki hücre tipi için de önemli olan bu hücrelerin aktifleşirken veya enflamatuvar tepkiye dahil olurken maruz kaldıkları sinyal yollarıdır. Öyle ki, interlökinler, sitokinler ve kemokinler tarafından düzenlenen ya da etkilenen sinyal yollarında, bu immün sistem elemanlarından herhangi birinin yokluğunda, sağlıklı

veya patolojik bir durum içerisinde olmak fark etmeksizin düzen ve denge kontrolünde çok büyük bir kayıp yaşanacaktır. Dolayısıyla immün sistemin özellikle homeostazını korumada görev alan protein yapıdaki bu elemanlarının işlevsel bir şekilde varlıklarının sürdürülmesi en kritik noktalardan biridir.

1.3.4 MS ve ER

Bir hücrede sentezlenen proteinlerin fonksiyonel bir yapı kazanmaları için boyutsal ya da işlevsel bir katlanmaya tabi tutulmaları gerekmektedir. Hücre içerisinde bu süreçler ana fonksiyonu proteinlerin katlanması olan ER’de gerçekleşmektedir. Bu noktada bir diğer önemli parametre ise ER’nin homeostazının korunmasıdır çünkü hali hazırda bozulan ER homeostazının MS gibi birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cunnea vd., 2011; Sprengle vd., 2017). Örneğin Alzheimer hastalığında (AH) görülen bilişsel bozukluklar ER fonksiyonlarında görülen bozulma ile ilişkilendirilmiş ve farklı bir çalışmada AH ilişkili bir şekilde ER’de protein kinaz-R benzeri ER kinazı (PERK) ifadesinin seçici olarak azaltıldığı ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa’nın (eIF2 α) fosforilasyonunu önlediği belirtilmiştir (Lourenco vd., 2013; Ma vd., 2013). MS ve AH gibi nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalığı (PH) ise dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimciği adı verilen inklüzyon cisimlerinin varlığı ile karakterize olan ilerleyici bir hareket bozukluğu olarak tanımlanır. PH ve ER stres arasındaki ilişkinin belirlendiği bir çalışmada Parkinson hastalarının otopsi sonuçlarına göre kontrollere kıyasla dopaminerjik nöronlarda daha fazla fosforile PERK (p-PERK) ve eIF2 α ifadesi görülmüştür (Hoozemans vd., 2007).

MS’nin oto-immünite ilişkili nörodejeneratif bir hastalık olduğu düşünüldüğünde, tıpkı AH ve PH’de olduğu gibi MS’nin de ER stres ile ilişkisinin araştırılması kaçınılmaz olmuştur. Bu amaçla MS hastalarının MSS dokuları incelenmiş ve bu dokularda ER stres belirteçlerinden aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4), glukoz-düzenleyici protein/bağlayıcı immünoglobulin proteini (GRP78/BiP) ve C/EBP homolog proteininin (CHOP), MS hastalarının beyaz maddesinde kontrollere oranla ifadelerinin arttırıldığı görülmüştür (Cunnea vd., 2011). Ek olarak yine MS hastalarında GRP78 ve CHOP’un astrositler, mikrogliya ve oligodendrositlerde yüksek oranda ifadelerinin arttırıldığı bulunmuştur (Mháiille vd., 2008).

Genel olarak nörodejeneratif hastalıklar ve ER stres arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir ve bu duruma ait çeşitli örnekler literatürde gösterilmiştir (Hoozemans vd., 2007; Ma vd., 2013; Sprenkle vd., 2017) . Nörodejeneratif hastalıklarda ER stres ilişkili yapılan çalışmalar daha çok artan veya azalan ER stres belirteç miktarlarının belirlenmesini içermektedir. Ancak bu hastalıkların ER stres tarafından tetiklendiği mi ya da hastalık patogenezinin mi ER stresi tetiklediği henüz net bir şekilde belirlenmemiştir.

1.3.5 ER ve ER’de Gelişen Protein İşleme Süreçleri

Bir proteinin, gerekli fonksiyonlarını yerine getirmesi yalnızca amino asitlerin bir araya getirilerek proteini oluşturması ile değil; katlanması, paketlenmesi ve gerekirse hücre dışına çıkarılması ile gerçekleşir. Bir hücrede sentezlenen proteinlerden hücre dışına salgılanacak ve transmembran özellik gösterecek olanların katlanmasında veya olgunlaşmasında ER görev alır (Schwarz & Blower, 2016).

Proteinlerin sentezi yalnızca sitozolde serbest halde bulunan ribozomlarda gerçekleşmez. Bir hücrede granüllü ve granülsüz olmak üzere iki tip ER bulunur. Granülsüz ER’lerin ribozomu bulunmazken, granüllü ER yapısında ise ribozom bulunur ve bu sayede protein sentezi gerçekleştirilebilir (Alberts vd., 2006). ER aslında üst üste katlanmış zar yapılarının oluşturduğu bir organeldir ve her iki zar yapısı arasında oluşan boşluğa lümen adı verilir. ER’de proteinler hem lümende hem de organelin sitozole bakan tarafında sentezlenir.

Sentez esnasında proteinler lümen içerisine itilir, paketlenir ve fonksiyon kazanacakları bölgeye ulaşmak üzere taşınırlar (Alberts vd., 2006; Schwarz & Blower, 2016).

1.3.5.1 ER’de Protein Katlanması

Katlanmak üzere ER’de bulunan bir polipeptit üzerine öncül bir oligosakkarit yapı eklenir. Öncül oligosakkarit yapıyı tanıyan kalneksin isimli bir şaperon proteinlerin katlanma işlemlerinin başlatılmasını sağlar.

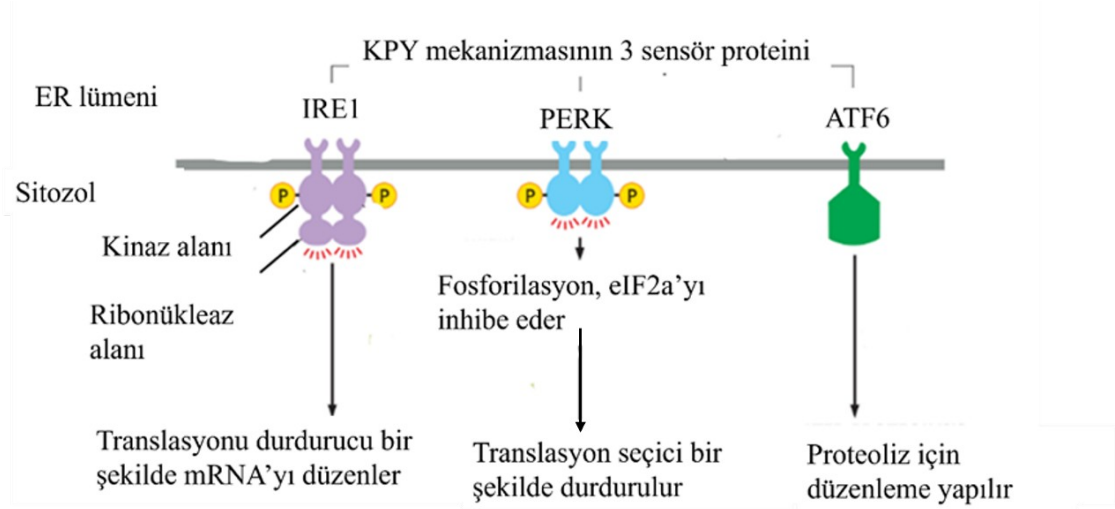
Şaperonlar; proteinlerin ribozomlarda sentezlenmesi, ER’ye yönlendirilmesi ve yanlış katlanmış ya da katlanmamış bir proteinin yıkılması için hücre içerisinde ilgili bölümlere gitmesi için proteinleri yönlendiren veya onlara öncülük eden

moleküllerdir. Protein bu noktada doğru katlanırsa ER'den çıkabilir. Ancak eğer protein doğru katlanmadıysa bir kontrol mekanizması devreye girer. Kontrol mekanizmasına giren protein, glukoziltransferaz (GTF) isimli bir enzim tarafından kontrol edilir. Katlanmamış ya da yanlış katlanmış bir protein ortamda duruyorsa GTF enzimi sayesinde tanınır ve protein katlanma döngüsünde kalneksin aracılı gerçekleşen adıma yeniden yönlendirilir. Nitekim, proteinlerin katlanması doğru bir hal alana kadar bu döngü devam eder (Alberts vd., 2006). Bu döngü ER'de bulunan proteinler ve bu proteinlerin işlenmesi sürecinde görülen bir dengenin oluşmasını sağlar. ER'de oluşan bu denge durumuna ER homeostazı adı verilir ve homeostaz ER içerisinde bulunan protein yükünün artması ile kaybolur. Kaybolan homeostaz ER'de bir tür stres gelişimini tetiklerken homeostazın yeniden kurulması için bir tür yanıt mekanizması devreye sokulur. Gelişen yanıt mekanizması aracılığı ile ER'de protein sentezi yavaşlatılmaya ya da durdurulmaya çalışılır (Caramelo vd., 2004; Danilczyk vd., 2000). Katlanmamış protein yanıtı (KPY) ismi verilen bu mekanizma homeostazı sağlayamadığı takdirde hücrenin kontrollü bir şekilde apoptoza götürülmesini de sağlar.

1.3.5.2 ER ve KPY

ER içerisinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler sitozolde şiddetli bir tepkiye sebep olur. ER üzerinde KPY mekanizmasını çalıştırmak üzere inositol-gerektiren enzim tip 1 (IRE1), PERK ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) isimli üç sensör protein bulunur. Homeostaz süresince GRP78, bu üç sensör proteine bağlı bir şekilde bulunurken KPY'nin çalışması ile bulunduğu bölgeden uzaklaşarak IRE1, PERK ve ATF6 proteinlerinin aynı anda KPY tepkisi oluşturmalarını sağlar (Şekil 1.16).

GRP78 aslen bir şaperon olarak görev alan bir proteindir ve *HSPA-5* geni tarafından kodlanır. GRP78, yeni sentezlenen proteinlerin ER zarı boyunca translokasyonunu, proteinlerin katlanmasını, KPY mekanizması ve ER aracılı degradasyonu (ERAD) başlatmak, düzenlemek üzere görev alır (Wang vd., 2009). ER stres için sinyal dönüştürücü özellik göstermesi sebebiyle, GRP78 hem KPY mekanizmasının hem de ER stresin ana düzenleyicisi konumundadır. GRP78 proteini, ATP bağlayıcı alan (ABA) ve substrat bağlayıcı alan (SBA) olmak üzere iki adet özelleşmiş alana sahiptir ve aslen bir şaperon gibi davranmaktadır.



Şekil 1.16: KPY mekanizmasında görev alan sensör proteinler ve ilgili fonksiyonlarının temsili gösterimi (Alberts vd., 2006). KPY: katlanmamış protein yanıtı, ER: endoplazmik retikulum, IRE1: inositol gerektiren enzim tip 1 (inositol requiring enzyme type 1), PERK: protein kinaz-R benzeri ER kinazı (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6: aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (activating transcription factor 6), eIF2α: ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa (eukaryotic initiation factor 2 alpha)

ER'de katlanmamış protein varlığı görüldüğünde ilk olarak GRP78 bu proteini SBA bölgesine bağlar ve ardından ABA bölgesi sayesinde ATP harcayarak proteinin hücre içerisinde çökmesini engellemeye çalışır (İbrahim vd., 2019). Fakat ER içerisinde bulunan katlanmamış protein miktarı arttığında bu süreç işlevini kaybetmeye başlar. Katlanmamış proteinlerin artması ile GRP78, IRE1, PERK ve ATF6'dan ayrılarak bu KPY sensörü proteinleri serbest bırakmış olur.

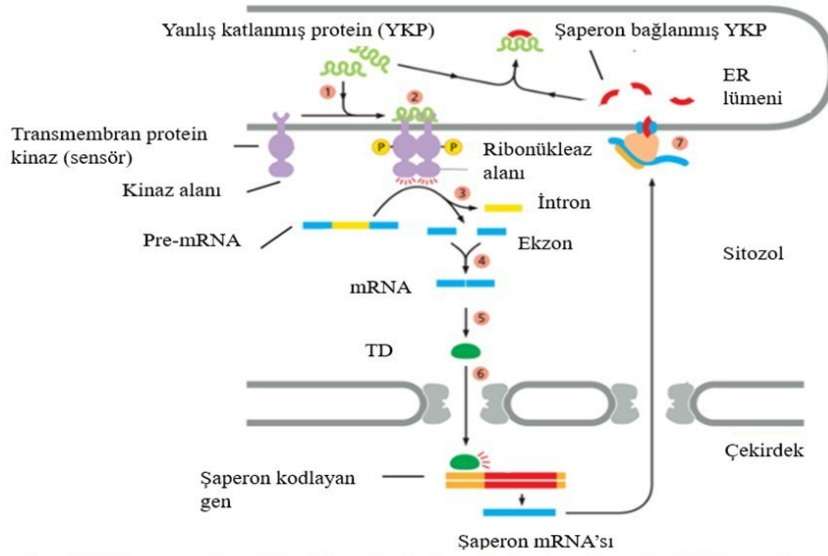
Bu özelliklerine ek olarak, GRP78 hücre yüzeyinde de bulunabilir. ER stres ilişkili bir şekilde GRP78 ifadesi çok fazla olduğunda GRP78'e ait olan bir motif adeta tutularak hücre yüzeyine transloke edilir. Hücre yüzeyinde bulunan GRP78 (HYG); hücre sinyalleşmesi, proliferasyon, hücre göçü, enflamasyonu içeren birçok alt sinyal yolağını tetikleyecek bir reseptör gibi çalışmaya başlar. Örneğin HGY oluştuğunda PI3K, MAPK, Akt ilişkili alt sinyal yolları tetiklenir ve hücrede proliferasyon, göç ya da apoptoz süreçleri başlatılabilir (Gonzalez-Gronow vd., 2009).

IRE1, kinaz ve endoribonükleaz olmak üzere ikili enzim aktivitesine sahip, ER membranında bulunan bir proteindir (Bashir vd., 2021). ER lümeninde bulunan yanlış

katlanmış veya katlanmamış proteinlerin IRE1'in N-terminaline bağlanarak konformasyonel bir değişim oluşturmasıyla aktivasyona sebep olduğu düşünülmektedir (Karagöz vd., 2017). Bu mekanizmada katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin IRE1'de bulunan bir bağlanma oluğu/boşluğu için substrat görevi gördüğü ve IRE1'de dimerizasyona sebep olduğu da bilinmektedir. IRE1'de gerçekleşen dimerizasyon ile kinaz alanları aktifleşerek trans-oto fosforilasyon görülür ve RNaz alanı aktifleşir.

Transkripsiyon sonrasında oluşturulan pre-mRNA'lar kesilerek translasyon geciktirilebilir ya da mRNA'ların bir TF olarak çekirdeğe tekrar gidişi sağlanır. Bu sayede yanlış katlanmış proteine karşı oluşturulan cevabın çekirdeğe iletilmesi sağlanır. Çekirdeğe iletilen cevap ile KPY mekanizması ilişkili hedef genlerin ifadesi arttırılır (Bashir vd., 2021). Düzenlenen bu transkripsiyon süreci sonucunda da ER'nin katlanmamış proteinler ile başa çıkma kapasitesi arttırılarak KPY için gerekli genlerin ifadesi arttırılmış olur (Şekil 1.17).

ER stresin fazla olduğu ve KPY ile homeostazın yeniden sağlanamadığı durumlarda hücrelerde IRE1 aracılı apoptoz mekanizması aktifleşebilir (Şekil 1.18). ER stres sürecinde IRE1 hücrenin yaşamını destekleyici bir güç oluşturmaktan ziyade hücre ölümü için yürütücü bir güç olmaya başlar. Düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozulma (Regulated IRE1-Dependent Decay-RIDD) KPY sürecinde hücre kaderini belirlemede görev alır. IRE1, ER homeostazı dengelenmediği takdirde yanıt mekanizmasını baskılar ve RIDD ile apoptozu aktifleştirebilir (Chen & Brandizzi, 2013). Apoptotik süreçte RIDD, KPY mekanizmasını tetikleyen veya KPY'ye bağlı bir şekilde ifadesi artan genlerin de ifadesini baskılayarak ER stres yoğunluğunu arttırır ve yoğunluğun belirli bir eşiğe ulaşmasıyla apoptozu başlatır (Han vd., 2009). Gelişen apoptoz sırasında, proapoptotik proteazların ifadesi arttırılmak üzere yeniden düzenlenir. Bu düzenleme sürecinde tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ilişkili faktör 2 (TNF receptor associated factor 2-TRAF2) ve apoptoz sinyal kinazı 1 (ASK1) aktivasyonu görülür. TRAF2 ve ASK1 aktivasyonu ile çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu sayesinde B-hücreli lenfoma 2 (B-cell leukemia 2-BCL2) protein ailesi üzerinde çeşitli düzenlemeler yapılır.



1. YKP için şaperonların daha fazla miktarda olması beklenir ve bu nedenle YKP yapısı transmembran kinazı aktifleştirir.
2. Aktif kinazın endoribonükleaz aktivitesi başlatılır
3. Ribonükleaz, pre-mRNA'dan intronları çıkarır.
4. Ekzonların birleştirilmesi ile olgun mRNA elde edilir.
5. mRNA translasyona uğratılır ve transkripsiyon düzenleyici (TD) bir protein elde edilir.
6. Oluşturulan TD çekirdeğe gider ve şaperon kodlayan genlerde aktivasyon oluşturulur.
7. Şaperonların ifade seviyesi, miktarı artırılır ve ER'nin protein katlamasına ek bir destek sağlanır.

Şekil 1.17: IRE1 aracılı protein yükünün azaltılmasına dair şaperon ifadesi artışının temsili gösterimi (Alberts vd., 2006).

Bu ailenin proapoptotik proteini olan BCL2 ilişkili X proteininin (BCL2 associated X protein-Bax) ifadesi arttırılırken antiapoptotik proteinlerinin ifadesi azaltılır. BCL2 ailesi ilişkili olan proapoptotik proteinler mitokondriden sitokrom c salınmasını tetikler. Bu duruma ek olarak RIDD aracılı bir şekilde ifadesi arttırılan proapoptotik bir proteaz olan Kaspaz 2 de mitokondri aracılı hücre ölümünü tetikler (Chen & Brandizzi, 2013; Schönthal, 2012). Sitokrom c salınmasından sonra Kaspaz-3 aktive olur ve hücreyi geri döndürülemez bir şekilde ölüme götürecek olan kaspaz ilişkili yoğun sinyalleşme başlatılmış olur (Şekil 1.18).

PERK ve IRE1 yapısal homoloji gösteren iki proteindir. PERK proteini de tip I ER transmembran özellikte olup kinaz alanları bulundurur. KPY tepkisi sonucunda GRP78'in PERK proteininden ayrılması sonucunda PERK'de de oligomerizasyon görülür. Oligomerizasyonu takiben PERK'de trans-otofosforilasyon görülür ve sitozolik alana bakan kinazlar aktifleşir. Aktifleşen bu kinazlar, translasyon kontrolünü sağlamak üzere eIF2 α 'da fosforilasyon gerçekleştirir (Şekil 1.18) (Harding vd., 1999). Fosforlanan eIF2 α (P-eIF2 α) inhibe olur ve translasyon seçici bir şekilde inhibe edilmiş ya da yavaşlatılmış olur.

P-eIF2 α bağımlı bir şekilde translasyonun inhibe edilmesi sonucunda, aslında ER stres ilişkili bir şekilde hücresel döngü durdurulur. Sağlıklı koşullar altında bir hücre, hücre döngüsü içerisinde G1, S, G2 (interfaz evresi) ve mitoz evrelerini tamamlamak ile yükümlüdür ancak P-eIF2 α hücrenin G1 fazında durmasına sebep olur (Brewer & Diehl, 2000). Açıkça görüldüğü üzere ER stres hücrelere zarar vermektedir. Bu zararın engellenmesi amacıyla, hücresel koruyucu genlerin ifadesini arttıran ATF4 mRNA'sının translasyonu artırılır. Artan ATF4 ifadesi eş zamanlı olarak CHOP ifadesini de artırır (Şekil 1.18). CHOP aslen proapoptotik özellikte olan bir TF olarak görev yapar ve BCL2 protein ailesine ait antiapoptotik özellikteki proteinlerini inhibe ederek yine BCL2 protein ailesine ait olan proapoptotik özellikteki Bax proteininin ifadesini artırır (Schönthal, 2012).

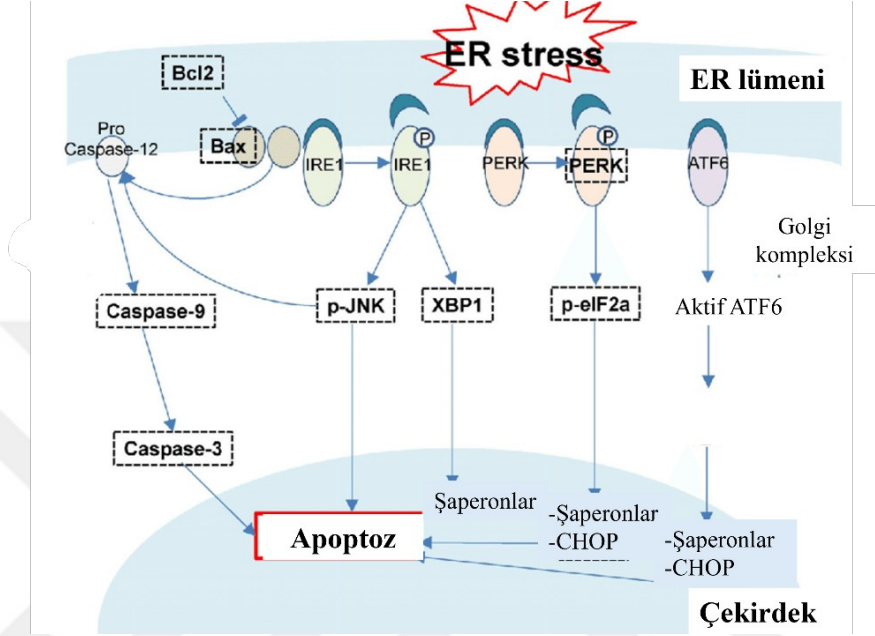
ER stresin hücrede reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) ilişkili bir şekilde apoptozu tetiklediği de bilinmektedir. ROS oluşumu hücresel apoptozu tetiklerken kanser gelişiminde, nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde ve yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır (Hayes & McLellan, 1999). ROS oluşumuna bağlı olarak aktiveleşen nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'de de (Nrf2) hem bazal koşullarda hem de stres koşullarında antioksidan yanıt elemanlarını (ARE) içeren genlerin ifadesini düzenler (Venugopal & Jaiswal, 1996). Normal şartlarda Nrf2 hücre içerisinde Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Kelch-like ECH associated protein 1-Keap1) tarafından tutulurken aktiveleşen PERK aynı zamanda Nrf2'de fosforilasyona sebep olur. PERK'in Nrf2'de yaptığı fosforilasyon sonucunda Keap1 ve Nrf2 birbirinden ayrılır. Bu ayrılma sonucunda Nrf2 ROS oluşumu gerekmeksizin nükleer translokasyona maruz kalır. Bununla birlikte Nrf2'nin ifadesinde görülen artışın KPY sırasında hayatta kalmayı arttırdığı gösterilmiştir (Cullinan vd., 2003).

ATF6 ER'de tip II transmembran özellikte bulunan ve TF özelliği gösteren bir proteindir (Şekil 1.18). ATF6, ER stres tepkisinde proteoliz ile aktive olarak KPY tepkisinde görev alır (Shen & Prywes, 2005). IRE1 ve PERK'den farklı olarak, ATF6 aktiveleştiği durumda ER zarından ayrılır ve bir vezikül aracılığıyla Golgi'ye taşınır. Golgi'de bulunan S1 ve S2 proteazları tarafından ATF6 üzerinde gerçekleştirilen kesim işlemi sonucunda ATF6 α proteini oluşur. ATF6 α proteini, proteinlerin katlanması, işlenmesi veya parçalanmasını sağlayacak olan çeşitli

şaperonların aktifleşmesini veya ifadelerinin değişimini sağlamak üzere çekirdeğe gider. Bu esnada



ATF6α'nın IRE1 aracılı düzenlenen X kutusu bağlayıcı proteini (X box binding protein-1-XBP1) ve proapoptotik özellikli CHOP'un transkripsiyonunu düzenlendiği de bilinmektedir (Walter vd., 2018). Genel hatları ile homeostazın sağlanması ya da hücrenin apoptoza götürülmesinde tüm ER stres belirteçleri bir arada görev alır veya birçok sinyal yolağını tetikler (Şekil 1.18).



Şekil 1.18: ER stres belirteçleri ve tetikledikleri bazı önemli sinyal mekanizmaları (Alberts vd., 2006) p-JNK: fosforlanmış c-Jun N-terminal kinaz (phosphorylated c-Jun N terminal kinase), XBP1: X kutusu bağlayıcı protein 1(x box binding protein 1), Bcl2: B hücreli lenfoma 2 (B cell leukemia 2), CHOP: C/EBP homolog proteini (C/EBP homologous protein), ATF4: aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (activating transcription factor 4), Bax: Bcl2 ilişkili X proteini (Bcl2 associated X protein)

KPY ilişkili bir şekilde ifadesi düzenlenen XBP1'in B hücreleri ilişkili bir şekilde farklılaşmış immünoglobulin salgılayan plazma hücrelerinin gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir. Plazma hücrelerinin kanserleşme sürecinde miyelom hücrelerine dönüşmesinde KPİ ilişkili bir şekilde XBP1'in yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Reimold vd., 1996). XBP1 ilişkili KPİ tepkisinin B hücreleri üzerindeki etkisinin daha derin bir şekilde araştırılması için yapılan çalışmalarda ise XBP1 eksikliğinin plazma hücrelerinin oluşumunu azalttığı ve B hücrelerinin fonksiyonlarında da bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür (Iwakoshi vd., 2003). DH'ler üzerinde yine XBP1 ve IRE1 ekseninde yapılan bir *in vivo* çalışmada çeşitli genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanılması ile azaltılan XBP1 miktarının DH'lerin sayısında da azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmanın

devamında XBP1'in ifadesinin yeniden arttırılması ile DH'lerin sayısında artış ve fonksiyonlarında düzelme görülmüştür. Sonuç olarak ER'nin, ER stresin ve KPY mekanizmasının nörodejenerasyon, oto-immünite ile ilişkisi, literatüre sunulan çalışmalarda MS'li hastalarda ER stres belirteçlerinde artış görüldüğü de bilinmektedir.

MS'nin karmaşık doğası, hastalığın aydınlatılamayan yönleri, hastalığa sahip bireyler arasında görülen farklılıklar sebebiyle her ne kadar patogeneze dair bilgiler ışığında tedavi seçenekleri ve planları belirlense dahi MS'de tam ve kesin bir iyileşme sağlayan bir tedavi henüz belirlenememiştir. Nitekim, günümüzde hastaların yaşam biçimlerini MS'ye göre düzenlemeleri ve uygulanan tedavi planına sadık kalmaları sayesinde hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek mümkündür. MS tedavisi için kullanılan ajanların birçoğu hasta popülasyonunun büyük bir yüzdesini oluşturan RRMS formunu hedefler. İlaç tedavilerine ek olarak fizik tedavi, vitamin-mineral desteği gibi uygulamalarla hastalığın ilerleyici yapısının önüne geçmek ve hastaların RRMS'ye göre daha progresif seyreden MS alt tiplerine geçiş yapması engellenebilmektedir. Ancak, yine de başarılı görülen bir tedavi planı, çeşitli olumsuzlukların engellenmesi amacıyla belirli periyotlarda klinik takip içermektedir. Her ne kadar tedavi süresince klinik, hematolojik, hepatik ve MRG takipleri sık yapılıyor olsa dahi ilaç etkinliğini etkileyebilecek bireysel farklılıklar, hastaların tedavi planını aksatması ve çeşitli etmenler nedeniyle tedaviye karşı yanıtızsızlık gelişebilmektedir. MS patogenezinin immün sistem ve ER stres ile ilişkisi MS'nin tedavisi ve bu tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesi hususunda oldukça önemli olacaktır. Ancak bu değerlendirmelerin yapılabilmesi için günümüzde kullanılan MS tedavilerine ve bu tedavi ajanlarına karşı gelişen yanıtızsızlık durumlarına hâkim olunması ve yanıtızsızlığın ne anlama geldiğinin bilinmesi gerekmektedir.

1.4 MS'de Tedavi

MS'nin ataklar ile karakterize olması ve MSS'de görülen demiyelinizasyon kaynaklı hasarlara sebebiyet veren otoimmünite MS'ye karşı geliştirilen tedavi stratejilerinin temelini oluşturmaktadır. MS'ye karşı geliştirilen tedavi stratejilerinin ana hedefi atakların sıklığı ve şiddetini hastalığın erken aşamasında önlemektir. Bu bağlamda MS için yapılan farmakolojik çalışmalar direkt olarak atak döneminde

uygulanacak



tedavileri belirlemenin dışında bu atakların oluşmasını önleyerek hastalık seyrini değiştirecek terapileri (disease-modulatory therapies-DMT) geliştirmeyi hedefler. Bu sayede hastalığa bağlı uzun vadede gelişecek olan ve kalıcı olacak fonksiyon kayıplarının iyileştirilmesi beklenir (Smith vd., 2017).

1.2 numaralı başlıkta daha da irdelenerek anlatıldığı üzere MS, T ve B lenfositlerin fonksiyonlarında görülen çeşitli bozulmalar sonucunda gelişen bir hastalıktır. Bu sebeple de MS'ye karşı geliştirilen tedavi stratejileri, immün sistem hücrelerini hedefleyerek baskılama ya da modüle etmeyi amaçlar. Hastalık süresinde görülen ataklar ve bu atakların sıklığı ilerleyen progresyonda hastaların EDSS puanında da artış meydana getirebilmektedir. Tedavi sürecinde atak sıklığı ve şiddetinin azaltılması aynı zamanda EDSS puanının ivmeli artışının da önüne geçmeyi hedefler.

MSS'de görülen akson hasarının geri döndürülemez oluşu engellilik ve EDSS puanında artışa sebep olmaktadır. Dolayısıyla EDSS puanında artışın önüne geçmek hastalığın sebep olduğu geri döndürülemez akson hasarlarının gelişimini de engellemeyi hedefler. MS'de tedavi ve EDSS puanı arasında görülen korelasyona dair yapılan bir çalışmada, MS'de EDSS puanının 3'ün üzerine çıkmadan önce etkin bir tedaviye başlamanın puanın 6'ya ulaşmasına kadar geçecek süreyi uzatacağı görülmüştür (Leray vd., 2010).

EDSS puanında görülen artış ile ilgili yapılan çalışmalarda EDSS puanının 3 ya da 4'e ulaşma süresinin bireyler arası değişkenlik gösterdiği görülürken 6 ya da daha yüksek puanlara ulaşmasının EDSS'de 3 puana ulaşma süresinden ya da relaps sürelerinden bağımsız bir şekilde ilerlediği belirtilmiştir (Confavreux vd., 2003; Leray vd., 2010). Puanlarda görülen bu ilerlemenin hastalığın erken evresinden itibaren başlayan enflamatuar yanıt tepkisi ile ilişkili olduğu düşünülebilir. DMT grubunda yer alan ilaçlar; atakları önlemek için, immün sistem hücrelerini modüle etmeyi ya da baskılamayı hedefleyerek anormal immün tepkiyi elimine etmeyi amaçlar. Enflamasyonun baskılanması sayesinde atak sıklığı ve şiddetinin azaltılması hedeflenmiş olur.

MS'de tedavi için geliştirilen ve çeşitli otoriteler tarafından klinik kullanımı onaylanmış olan DMT grubu ilaçlar 1.basamak, 2.basamak ve 3.basamak olarak risk

ve yarar profillerine göre sınıflandırılmıştır. Risk ve yarar profillerine göre bu ilaçların klinik kullanımı monoterapi kavramı ile değerlendirilmektedir.

Günümüzde MS tedavisi için kullanılan immünmodülatör ve immün baskılayıcı özellikteki DMT grubu ilaçlar, bu ilaçların kullanım yolu ve genel etki mekanizması Çizelge 1.2’de özetlenmiştir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Hauser & Cree, 2020; Wingerchuk & Carter, 2014).

Bu tez çalışması RRMS hasta gruplarında kullanılan DMF ilacına bağlı gelişen tedavi yanıtının moleküler mekanizmalar üzerinden boylamsam bir biçimde incelenmesi üzerine kurgulanmış bir çalışmadır. Bu nedenle Çizelge 1.2’de özetlenen DMF’ye ait genel etki mekanizmaları ilerleyen başlıklarda daha detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Bu tez çalışmasında tedavi yanıtı nötrofillerdeki ER stres belirteçleri ve apoptoz belirteçleri ifade seviyesi değişimleri üzerinden incelenmekte olduğundan özellikle DMF’nin bu parametrelerdeki etkisi daha derin bir şekilde araştırılmıştır.

Çizelge 1.2’de özetlenen DMF’ye ait genel etki mekanizması, 1.5.1 numaralı DMF ve etki mekanizması isimli başlıkta ilacın tetiklediği antienflamatuar, antiproliferatif ve antiapoptotik yollar dahil olmak üzere daha geniş bir çerçevede anlatılmıştır. Ek olarak, DMF’nin farmakokinetik ve farmakodinamiği üzerinde durulmuş; ilaca bağlı görülen etkilerin vücutta meydana getirdiği değişimler ve yan etkiler de aktarılmıştır.

Nitekim, bu tez çalışması kapsamında nötrofillerde görülen ER stres yanıtının incelenmesine bağlı olarak 1.5.2 numaralı Nötrofiller ve DMF isimli başlıkta, DMF aracılığıyla nötrofillerin MSS’ye geçişinin ve NHDT oluşumunun engellenmesi ve bu süreçte DMF tarafından yapılan modülasyonun tetiklediği yollar aktarılmıştır. Ek olarak 1.5.3 numaralı DMF ve ER stres isimli başlıkta ise DMF’nin ER stres üzerinde göstermiş olduğu sınırlama ve bu sınırlama aracılığıyla ER stres elemanlarının ifade seviyelerinde görülen değişimlere ait bilgiler sunulmuştur.

1.4.1 DMF ve Etki Mekanizması

DMF; RRMS tedavisinde kullanılan immünmodülatör ve nöroprotektif özellik gösteren, oral yol ile alınan 1. basamak bir DMT grubu ajanıdır. DMF, oral yol ile alınımından sonra ince bağırsakta esterase enzimleri aracılığıyla bir şekilde, asıl terapötik etkiyi gösterdiği düşünülen monometil fumarata (MMF) hidrolize edilir ve buradan

hareketle DMF'nin aslen bir ön ilaç olarak görev aldığı söylenebilir (Mrowietz vd., 2018; Werdenberg vd., 2003; Yadav vd., 2019).

Çizelge 1.2: DMT grubunda yer alan bazı ilaçlar, bu ilaçların kullanım yolu ve genel etki mekanizmaları

İlaç İsmi/Etken Madde	Kullanım/Uygulama Yolu (Basamak Sayısı)	Genel Etki Mekanizması
İnterferon Beta* (IFN-B)	SC**/IM*** (1.Basamak)	T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunda azalma Proenflamatuar sitokin üretiminde azalma Mikrogliaların antijen sunumunda düşüşe sebep olma KBB'de MMP'lerin üretiminde inhibisyon sağlama
Glatiramer Asetat (GA)	SC (1.Basamak)	APC'leri, CD4 +T hücrelerini, CD8 +T hücrelerini, Th1 ve Th17 hücrelerini antienflamasyon yönünde modüle etme Antienflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indüklemeye
Teriflunomid (TRF)	Oral (1.Basamak)	<i>de novo</i> pirimidin sentezini engelleme CD4 +T hücrelerinin klonlarının azalmasını sağlama APC'ler ve lenfositler arasındaki ilişkiyi bozma Proenflamatuar sitokinlerin sayısında düşüş
Dimetil Fumarat (DMF)	Oral (1.Basamak)	Nrf2 ifadesini arttırarak nöroprotektif özellik gösterme Hücre içindeki serbest GSH moleküllerine bağlanarak hücrel redoks sistemini etkileme NFkB translokasyonunda düşüş sağlama Proenflamasyon durumunu antienflamasyon yönünde kaydırma
Fingolimod (FNG)	Oral (2.Basamak)	S1P1 reseptörlerini modüle ederek lenfositlerin MSS'ye geçişini engelleme Lenfoid dokulardaki lenfosit trafiğini ve göçünü kontrol etme Lipofilik yapısı sayesinde KBB'yi geçerek MSS'ye ulaşma
Monoklonal Antikorlar (MAb)****	IV***** (2.basamak ve 3.basamak)	Okrelizumab (2.basamak, hücrel sitotoksiste aracılı apoptoz aktifleştirme) Natalizumab (2.basamak, lökositlerin MSS'ye geçişini engelleme) Alemtuzumab (3.basamak, lenfositleri yüzey belirteçleri sayesinde seçici bir şekilde hücre aracılı sitotoksiste ile apoptoza sürüklemeye)
*IFN-B 1-a ve IFN-B 1-b olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır ve tercih edilen form kullanım yolunu da etkilemektedir ** SC: subkutan (subcutaneous) ***IM: intramüsküler **** MAb genel bir sınıfa belirtmektedir ***** IV: intravenöz		

DMF'nin moleküler mekanizması başlıklı 1.5.1.1 numaralı bölümde de daha detaylı bir şekilde anlatıldığı üzere, DMF'nin etki mekanizması MSS'deki Nrf2 bağımlı ya da bağımsız antioksidan yolların aktivasyonu ve apoptoz ilişkili bir şekilde lenfosit sayısında bir azalma sağlamayı ana ekseninde barındırır (Montes Diaz vd., 2018). DMF'nin ruhsatlandırılmasını sağlayan faz çalışmalarında ilacın, plaseboya karşı, MS hastalarında EDSS'de düşüş ve aktif lezyon sayılarında azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu olumlu etkilerine ilaveten karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, anafaksi, progresif multifokal lökoensefalopati (PML) ve lenfopeni gibi yan etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Yadav vd., 2019).

Farmakokinetik kavramı, ilacın hedef dokuya ulaşması ve buradan uzaklaştırılması süreçlerinde görülen etkilerin tümü ile ilgilenir. Bu durumda farmakokinetik; emilim, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçlerinin tamamını incelemiştir. Farmakodinamik ise kullanılan ilacın vücut üzerinde yaptığı etkiyi, hedef bölgesindeki konsantrasyonu ve ilacın terapötik etkilerini incelemektedir. Bu bağlamda farmakokinetik ve farmakodinamik birlikteliğinde doz ve yanıt arasında kurulan ilişki açıklanabilir hale gelir.



Şekil 1.19: Dimetil fumarat (DMF) ve monometil fumaratın (MMF) kimyasal yapısı (Yadav vd., 2019).

DMF'nin vücuda alınmasının ardından büyük bir kısmı ince bağırsakta hidrolize edilirken, küçük bir kısmı kan dolaşımına girer ve plazmada bulunan esterazlar tarafından MMF'ye hidrolize edilebilir (Şekil 1.19).

DMF; kolayca hidrolize olma yeteneği sayesinde hücre membranından geçebilme özelliğine sahip olan ve bu sayede biyoyararlanım seviyesi oldukça yüksek olan bir moleküldür. MMF ise tıpkı DMF gibi bölünebilir ester gruplarına sahip olmasına karşın mono ester yapısından kaynaklı bir şekilde negatif bir yük kazanarak sahip olduğu çift bağlar ile nükleofillerle etkileşim kurabilir.

Her ne kadar MMF'nin hücre membranından geçemediği bilinse de, tıpkı DMF gibi MMF de terapötik etki göstermek üzere membran reseptörlerinde yer alan sistein aminoasitlerinin SH grupları ile bağ kurabilmektedir (Mrowietz vd., 2018).

DMF ve MMF dönüşümü ile ilgili yapılan farmakokinetik araştırmalarda her iki bileşenin de hücrede bol bulunan ve serbest radikaller açısından koruma sağlayan glutatyon (GSH) ile etkileşim kurduğu görülmüştür. Gelişen etkileşim sayesinde DMF-GSH ve MMF-GSH moleküllerinin oluştuğu ve ilerleyen metabolizma süreçlerinde bu bileşiklerin N-asetil-S(1,2-dimetoksikarboniletıl)-sisteine son ürün olarak dönüştürüldüğü görülmüştür. Oluşturulan bu metabolitin de idrar ya da dışkılama yolu ile elimine edildiği ortaya çıkarılmıştır (Schmidt vd., 2007). Metabolizma ve eliminasyon süreçleri için yapılan birtakım çalışmalarda gerek hayvan deneyleri gerekse *in vitro* çalışmalarda oral yol ile alınan DMF'nin bağırsak dışında yeterli MMF seviyesi oluşturmak üzere bir ön ilaç olarak hareket ettiği görülmüş ve bu düşünce de sedef hastaları ve sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada kanda DMF'nin bulunmaması ile kanıtlanmıştır (Litjens vd., 2004; Yao vd., 2016). Ancak bu durum DMF'nin terapötik bir etkiye sahip olmadığı anlamına gelmemektedir.

1.4.1.1 DMF'nin Moleküler Etki Mekanizması

DMF'nin ilişkili olduğu sinyal yolları ve moleküler mekanizma henüz net bir şekilde anlaşılamamış olsa dahi, olası mekanizmanın, DMF'nin lenfosit sayısında ortaya çıkardığı düşüş sayesinde immün sistemde modülasyon ve Nrf2 bağımlı bir şekilde MSS üzerinde nöronal hayatta kalımı sağlaması üzerine geliştiği bilinmektedir.

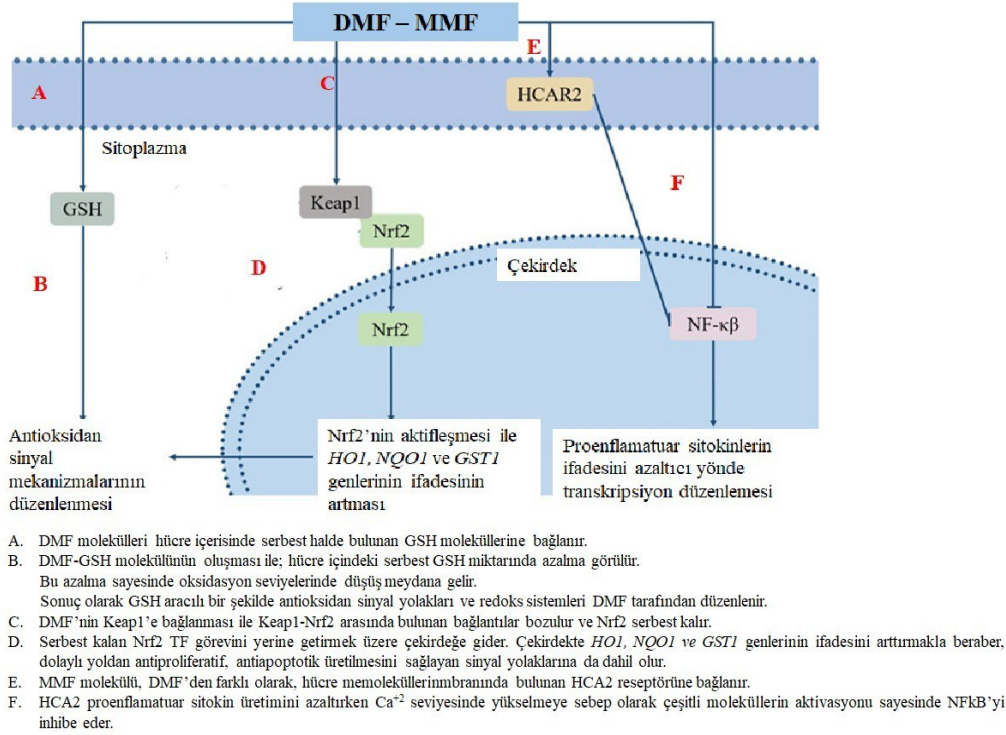
Nrf2 sitoplazmada Keap-1 proteinine bağlı bir şekilde inaktif formda bulunur ve hücrede redoks homeostazisinin korunmasını sağlar. DMF, hücrede oksidatif strese karşı sensör görevi gören Keap-1 proteininde bulunan SH gruplarına bağlanır ve böylece Nrf2 aktifleşir (Şekil 1.20).

Aktif formda bulunan Nrf2 çekirdeğe giderek hemoksijenaz 1 (HO-1), NAD(P)H kinon dehidrojenaz 1 (NQO-1) ve glutatyon-S- transferaz (GST-1) gibi detoksifiye edici enzimler ve antioksidan molekülleri kodlayan genlerin ifade seviyesini arttırıcı yönde bir indüksiyona sebep olur (Yadav vd., 2019). İfade seviyesi arttırılan bu moleküller ise hem hücresel oksidatif stresi baskımlarken hem de dolaylı yoldan

antienflamatuar, antiproliferatif ve antiapoptotik etki gösteren moleküllerin



üretilmesini sağlayan sinyal yollarına dahil olmaktadır. Buradan hareketle DMF'nin Nrf2 aracılı bir şekilde nöroprotektif özelliği de ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1.20: DMF ve MMF etki mekanizmasının temsili görünümü (Mrowietz vd., 2018; Yadav vd., 2019). HCAR2: hidroksi karboksilik asit reseptör 2, GSH: glutatyon, Keap-1: Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Kelch like ECH associated protein 1), Nrf2: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2, HO1: Hemooksijenaz 1, NQO1: NAD(P)H kinon dehidrojenaz 1, GST1: glutatyon S transferaz 1, NF-κβ: Nükleer faktör kappa β

MMF ise terapötik etki göstermek üzere, membran üzerinde bulunan hidroksi karboksilik asit reseptör 2 (HCAR2) ile etkileşim kurar. HCAR2 temel olarak; yağ dokularında lipolizi inhibe etmek, olgun nötrofillerde niasin kaynaklı apoptoza aracılık etmek ve arterlerde aterogenezi baskılama fonksiyonlarına sahiptir. Tüm bunlara ek olarak HCAR2'nin çeşitli patolojik durumlarda proenflamatuar sitokin üretiminde azalma ve Ca^{+2} seviyesinde yükselmeye sebep olduğu da bilinmektedir (Taing vd., 2023). Yükselen Ca^{+2} seviyesi ile adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) aktivitesi de artar ve bu sayede Sirtuin-1 (SIRT1) aktivasyonu da sağlanmış olur (Parodi vd., 2015). Aktif SIRT1'de görülen asetilasyon sayesinde ise NFκB inhibisyonu görülür (Şekil 1.20) ve bu sayede APC fonksiyonlarında değişim sağlanırken proenflamatuar moleküllerin ifadesi de baskılanır. Tüm bunlara

ek olarak



DMF'nin immün sistem hücrelerinde siklik adenosin monofosfat (cyclic adenosine monophosphate- cAMP) sinyal yolağını aktifleştirdiği ve cAMP miktarını arttırarak T hücre proliferasyonunu inhibe ederken antienflamatuar sitokinlerin ifadesini arttırabildiği de literatürde yer almaktadır (Mrowietz vd., 2018).

Bu tez çalışması kapsamında DMF tedavisi altındaki MS hastalarının nötrofillerinde ifadelenen ER stres belirteçleri araştırılmakta olduğundan ve bu çalışmanın sonuçlarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi için, DMF'nin hem nötrofiller hem de ER stres üzerindeki etkilerinin de üzerinde durulmuştur.

1.4.2 DMF ve Nötrofiller

Yaygın enflamasyonu baskılamak için immünmodülasyon etkisi gösteren DMF bu etkisini antioksidan sinyal yolağını kullanarak da göstermektedir.

Nötrofillerin fonksiyonlarından biri olan NHDT oluşumu ROS ilişkili bir şekilde de gerçekleşmektedir. DMF ise hücre içerisinde yer alan GSH ile oluşturduğu etkileşim sayesinde hücre içerisindeki redoks sistemini modüle edebilme özelliği kazanmıştır.

DMF'nin farmakokinetiğiyle ilgili de anlatıldığı üzere DMF ve GSH arasında DMF-GSH molekülü oluşmaktadır. Bu da DMF'nin hücresel redoks sistemini modüle edebilme özelliği kazanmasını sağlar. DMF ve GSH arasında kurulan bu birleşim sayesinde hücre içindeki GSH seviyesinde düşüş meydana gelir. Nötrofillerde görülen GSH miktarındaki azalma, oksidasyon seviyesinde görülen düşüşle beraber NHDT oluşumunu inhibe etmektedir (Hoffmann vd., 2018). Ancak DMF nötrofiller üzerinde yalnızca NHDT oluşumunu inhibe etmekle kalmaz bu oluşumu azaltırken hücrelerde apoptozu da teşvik eder.

DMF, PI3K/Akt ve p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) molekülleriyle hücrede proliferasyon, sağ kalım ve enflamasyon süreçlerini kapsayan sinyal yolaklarında inhibisyon etkisi göstererek nötrofil aktivasyonunu baskılayabilir (M ller vd., 2016). DMF; Akt üzerinde fosforilasyon etkisini azaltarak IL-17'nin ifade seviyesini düşürür. Azalan IL-17 seviyesinin ise nötrofillerin MSS'ye geçişinin azalmasını sağladığı da bilinmektedir (Lin vd., 2016).

Nötrofil aktivasyonunda DMF kaynaklı gelişen baskılamaya bağlı bir şekilde, DMF kullanan MS hastalarının değerlendirildiği ve yaklaşık 5 yıllık bir süreci içeren

retrospektif bir çalışmada, DMF'nin nötropeniye de sebep olduğu görülmüştür (Goldman vd., 2020).

1.4.3 DMF ve ER Stres

DMF'nin ER stres üzerindeki etkisinin belirlenmek istendiği ve MS gibi nörodejenerasyon ile karakterize olan Huntington hastalığı kapsamında yapılan bir çalışmada, DMF'nin CHOP ve p-PERK ifade seviyesini azaltarak ER stres aktivasyonunda bir sınırlama oluşturduğu ve hücre içi apoptotik yolları inhibe ettiği görülmüştür (Hassab vd., 2023). Glioblastoma hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerde ise ER stres üzerinden ATF4 ilişkili sinyal yollarının inhibe edilmesi sonucunda MMF'nin hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin arttığı görülmüştür (Booth vd., 2014). Ayrıca stres yanıtı sürecinde görülen proteazomlar ve proteazom ilişkili komplekslerin DMF aracılı tetiklenen Nrf2 ile ortaklaşa bir şekilde ER stresin neden olduğu apoptozu etkilediği de bilinmektedir (Sun vd., 2018). Literatürde yer alan bu bilgiler değerlendirildiğinde DMF'nin ER stresi dolaylı yoldan etkileyerek KPY tepkisi ile bir ilişki kurduğu görülmektedir.

DMF, oral yol ile alınabilen, bu sebeple hastalar tarafından da oldukça fazla tercih edilen bir ilaçtır. Ancak her ilaç molekülünde olduğu gibi DMF'nin de yarar-zarar değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu yarar-zarar değerlendirmesi, hastaların tedaviye tam bir uyumuna rağmen gelişen tedavi yanıtı sızlığı karşısında etkin bir tedaviye ulaşmak amacıyla ilaç değişikliğini de kapsamaktadır.

Tedavi yanıtı değerlendirmesi MS için oldukça önemli bir olgudur. Daha önce de belirtildiği üzere EDSS puanlarında ani ve geri döndürülemez ilerleme oluşmadan önce bireylerin doğru tedavi ile tanıştırılması gerekmektedir. Klinikte MRG, tam kan ve biyokimya testleri gibi teknik değerlendirmeler veya biyobelirteçler günümüzde MS'de tedavi yanıtını değerlendirmek üzere kullanılmaktadır.

1.5 MS'de Tedaviye Karşı Gelişen Yanıtsızlık Değerlendirmesi

MS'de hem uygulanacak tedavinin belirlenmesi hem de gelişebilecek yanıtsızlığa karşı bir strateji geliştirmek monoterapi kavramına bağlı şekillenmektedir.

Monoterapi öncelikle bir hastanın kullanacağı DMT grubu ilacın 1. basamak bir tedavisi olmasını tanımlar. 1. basamakta yer alan ilaç ile tedavisine başlanmış bir

bireyde atak sıklığı, şiddeti, gelişen engellilik durumu, EDSS değerlendirmesi, MRG sonucu lezyon sayısının taranması ve var olan ya da yeni oluşan lezyonların aktiflik durumunun değerlendirilmesi yapılır (Wingerchuk & Carter, 2014).

Nitekim, bu değerlendirmeler sonucunda hastada oluşan yanıtın değerlendirilmesi amaçlanır. İdeal olarak bu değerlendirme sonucunda hastanın atak sıklığında-şiddetinde azalma, EDSS puanında düşüş ve MRG tetkik sonucunda yeni lezyon görülmemesi beklenir. Ancak her zaman ideal olan durum gerçekleşmez.

Monoterapi kavramı uyarınca 1. basamak bir ilaç ile başlanan tedavide progresyonda ilerleme durdurulamadığı taktirde hekimler bir ikilem ile karşılaşır. Bu ikilem hastanın farklı bir 1. basamak ilaç ile mi tedaviye devam edeceğine ya da 2. basamak bir ilaç ile mi tedaviye devam edileceğine karar vermeyi kapsar. Öyle ki ortaya çıkan bu ikilem monoterapi stratejisinin en zorlayıcı ve en kilit noktasını oluşturur.

MS'nin tedavisinde ana amaç erken tanıya bağlı başlatılan erken tedavi ve DMT grubu ilaçlarda basamak değişimine gereksinimin takip edilmesidir (Smith vd., 2017). Bu noktada, amaç hedefli bir terapötik strateji geliştirmek ve olası yanıtızsızlığa karşı hastalığın ilerleyişini sürekli olarak kayıt altına almaktır. Özellikle son yıllarda tedavide geliştirilen stratejilerin ve takip süreçlerinin ana hedefi, hastalıkta aktivite artışı görülmemesidir ve “hastalık aktivitesine dair kanıt yok” (no evidence of disease activity-NEDA) terimi ile ifade edilmektedir.

Buradan hareketle, gerçekleştirilen çalışmalarda, doğru planlama yapmanın önemi NEDA'ya uygun ilerleyen tedavi sürecinin NEDA'dan bağımsız bir şekilde yürütülen tedaviye göre daha olumlu sonuçlar vermesi ile belirtilmiştir. Fakat NEDA planına uygun ilerleme bile tedavide yanıtızsızlığı ortadan kaldırmaya yetmemektedir (Giovannoni vd., 2015). Sonuç olarak, her ne kadar erken evrede doğru tedaviyi belirlemek önemliyse de erken evrede doğru tedavi değişiminin yapılması da bir o kadar önemli olacaktır.

Biyobelirteçler; biyolojik ve patolojik süreçleri veya bir moleküle maruziyet ya da herhangi bir müdahale karşısında verilen yanıtları yansıtan ölçülebilir ve objektif sonuç veren parametrelerdir (Bielekova & Martin, 2004). Moleküler, histolojik, radyolojik ve fizyolojik özelliklerden biyobelirteç elde edilebileceği gibi bu özelliklere dayanan test sonuçlarının uygun analizlerle düzenlenmesi sonucunda

elde edilen



parametreler de biyobelirteç olarak kullanılabilir. Geniş bir çerçeveden örnek vermek gerektiğinde, moleküler biyobelirteçler; ideal süreçlerde, sağlıklı bireyler ve hasta bireyler arasında ifade seviyesi veya konsantrasyon seviyesi açısından farklılık gösteren ve tespit edilmesi, ölçülmesi, en önemlisi ise elde edilmesi kolay olan protein, enzim vb. moleküllerdir. MS için, günümüzde halihazırda tanı ve hastalık aktivitesine yönelik incelenen parametrelere ek olarak tedavi yanıtıyla ilişkili olmak üzere de değerlendirilen birçok biyobelirteç kullanılmaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3: MS’de kullanılan biyobelirteçler, belirteçlerin tipleri ve elde edildikleri kaynaklar

MS’de Kullanılan Biyobelirteçler		
Molekül	Tipi	Elde Edildiği Yer
OB/IgG	Tanı	BOS
Nörofilament	Hastalık Aktivitesi	Kan (Plazma)
Nötralize Edici Antikorlar	Tedavi Yanıtı	Kan (Plazma)
L-selektin İfade Seviyesi	Tedavi Yanıtı	Lenfositler (Hücre adezyon molekülü)

Çizelge 1.3’te görüldüğü üzere biyobelirteçlerin elde edilebileceği birçok kaynak bulunmaktadır. Örneğin BOS’ta OB/IgG varlığı MS tanısını yansıtan bir biyobelirteçtir. Ancak OB varlığının araştırılması oldukça acılı ve yüksek riskli olan lomber ponksiyon isimli bir prosedür ile mümkün olmaktadır. Bu yöntemin invaziv doğası gereğince yeterli miktarda örnek toplandığı takdirde ve hastalık tanısının kesinleştirilmesi sonucunda prosedür ikinci bir kez uygulanmaz.

Nötralize edici antikorlar (Nab), monoklonal antikor tedavilerine karşı vücudun oluşturduğu bir tür yanıt sistemi içerisinde yer almaktadır. Gelişen Nab’lar hastalığa karşı kullanılan antikor temelli ilaçların biyolojik etkisini nötralize etmektedir. Yapılan çalışmalara göre antikor temelli tedavi alan hastaların %90’ından fazlasında tedavi sonrası Nab geliştiği görülmüş ve özellikle natalizumab tedavisi alan hastalarda bu Nab üretiminin tedavi sonrasındaki ilk 3 ayda geliştiği belirtilmiştir (Hegen vd., 2012; Vennegoor vd., 2013).

OB/IgG ve Nab molekülleri elde edilmeleri açısından değerlendirilmek istenirse her iki biyobelirtecın MS doğasında büyük bir öneme sahip olduğu görölmektedir. Özellikle Nab'ların plazma gibi kolay elde edilebilen bir materyal üzerinden saptanabiliyor oluşu büyük bir avantaj sunmaktadır.

Ancak OB'lerin elde edilmesi için izlenecek prosedürün zorluğu ve sık tekrarlanamayacak olması bir dezavantaj oluşturmaktadır.

İdeal bir biyobelirteç yüksek hassasiyet ve özgüllük değerlerini taşımalıdır. Bu iki önemli parametreye ek olacak şekilde biyobelirtecın elde edilme süreci uygun fiyatlı, tekrarlanabilir ve invaziv olmayan bir yöntem içermelidir.

MS için geliştirilen tanı ve/veya tedavi yanıtı açısından kullanılan MRG ile takip edilen yeni lezyon oluşumu, engellilik skorundaki ilerleme gibi parametreler klinisyenler tarafından takip edilmektedir. Ancak hastalıkta görülen ilerlemenin bu parametreler üzerinden değerlendirilmesi takip açısından uzun süreler beklemeyi gerektirir. Bu durumun önüne geçmek için ise özellikle kolay bir şekilde ulaşılabilecek ve erken dönemde tedavi yanıtı ile ilişkilendirilebilecek olan potansiyel biyobelirteçlerin ortaya koyulması erken evrede tedavi değişiminde doğru planlama yapmanın yeni bir yolunu oluşturacaktır.

1.6 Çalışmanın Amacı

Oto-immünite, demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon ile karakterize olan MS, nörolojik fonksiyon bozukluklarına sebep olan bir MSS hastalığıdır. Hastalığın patogenezi ve immün sistem ilişkisine dair bazı mekanizmalar belirlenmiş olsa dahi MS fenotipinin gelişmesine sebep olan çevresel ve genetik risk faktörleri henüz net bir şekilde tanımlanamamıştır (Hauser & Cree, 2020). MS'nin klinik sunumu genellikle hastalar arasında değişkenlik gösterse de, yorgunluk, görme sorunları, yürüme güçlüğü, ayaklarda veya ellerde uyuşma, kas sertliği ve spazmları, denge ve koordinasyon sorunları ve idrar ve bağırsak semptomlarını içerir (Cosh & Carslaw, 2014). MS, genellikle genç yetişkinlerde görülen bir hastalık olup ilk belirtilerini 20-40 yaş aralığında göstermektedir ve dünya çapında 2020 yılında 3 milyon kişinin MS ile yaşadığı bilinmektedir. Bu duruma ek olarak yapılan araştırmalar sonucunda MS

prevalansının her sene %50 üzerinde artış gösterdiği bildirilmektedir (Walton vd., 2020).

MS'nin klinik alt tipleri içerisinde yer alan ve hastalığın en yaygın formu olan RRMS, MS'de tedavi stratejilerin geliştirildiği ana formdur. Bu durum RRMS klinik tipinde değerlendirilen hastaların ilerleyen yıllarda hastalığın daha progresif formlarına geçiş yapması ve RRMS hastalarının diğer gruptaki hastalara oranla tedaviye daha iyi yanıt vermesinden kaynaklanmaktadır (Rieckmann & Toyka, 1999; Weinshenker, 1998). MS'de geliştirilen tedavi stratejilerinin odak noktası hastalarda atak sıklığı ve şiddetini baskımlarken hastalık semptomlarının artışı yani EDSS puanında kısa sürede yükselmeleri de önlenmesidir. Geliştirilen bu strateji MS hastalarına hastalığın erken evresinde etkili bir tedavi planının uygulanmasıyla hedefine ulaşabilir.

MS'de görülen ve klinik birtakım testler ile de doğrulanabilen, tedaviye karşı gelişen yanıtızlık hastalığın en zorlayıcı noktalarından biridir. Bir hastanın hem erken evrede etkili bir tedaviye sahip olması hem de gelişen tedavi yanıtızlığının da kısa sürede belirlenmesi gerekmektedir. Klinikte tedavi yanıtının incelenmesi amacıyla tercih edilen testler, ilgili yanıtızlığı ortaya çıkaracak olan biyolojik parametrelerin ölçülebilecek duruma geldiği süreç sebebiyle (örneğin yeni lezyon oluşumu) erken evrede yanıtızlığın fark edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu noktada erken evrede yanıtızlığın belirlenebileceği potansiyel biyobelirteçlerin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bir biyobelirteç hastalığın tedavisi hakkında yorum yapılmasını sağlarken aynı zamanda hastalığın patogeneğinde yer alan moleküler mekanizmalar ile de ilişkili bir şekilde değerlendirilmesi bu biyobelirtecın daha da kıymetli bir hale gelmesini sağlamaktadır.

MS'nin oto-immün doğası özellikle adaptif immün sistem hücrelerinin oluşan immün tepkiyi sürekli bir şekilde devam ettirmesi ile ilintilidir. T ve B lenfositler aracılı oluşan enflamatuar tepkiye ek olarak sistemin kontrolünde görev alan Treg gibi hücrelerin fonksiyonlarında görülen bozulmalar da enflamasyonun devam etmesine sebep olmaktadır. B hücreleri, DH'ler, mikroglialar ve makrofajlar kümesinin tamamı olan APC'ler, özellikle T hücrelerinin aktifleşmesi ve farklılaşması süreçlerinde görev almaktadırlar. Yapılan araştırmalarda (Radsak vd., 2000; Vono vd., 2017) immün sistemin bir diğer bileşeni olan nötrofillerin de antijen sunum

sürecine dahil olduğu bilinmektedir.



Nötrofillerin MS patogenezinin dahil olduğu fagositoz, KBB yıkımı, enflamatuar moleküllerin salınımı, NHDT oluşturulması gibi tüm süreçler tıpkı antijen sunumunda olduğu gibi yoğun sinyalleşme ağları sonucunda gelişmektedir. Biyolojik bir sistem olan enflamatuar tepki oluşturulmasında aktifleşen veya inaktifleşen tüm sinyal yolları, bu yollara dahil olan sitokinler, kemokinler protein yapıdadır. Bir proteinin fonksiyonel bir özellik kazanması ve bu fonksiyonu bir görev olarak yerine getirebilmesi için üç boyutlu bir konformasyonel yapı kazanması, katlanması gerekmektedir.

Hücre içerisinde bir proteinin katlanması ER’de gerçekleşir. ER’de bulunan protein ve katlanmış protein miktarı arasında bir denge kurulması gerekmektedir. Kurulan bu denge ER homeostazı olarak adlandırılır. ER homeostazı, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin miktarının artması yani bir diğer deyişle ER’nin protein yüküne dair arz-talep dengesini karşılayamaması sebepleri ile bozulur. Bozulan homeostazın yeniden sağlanması amacıyla gelişen ER stres sonucunda; KPY mekanizması GRP78, IRE1, PERK ve ATF6 sensör proteinleri kullanılarak çalıştırılır. KPY mekanizması sonucunda homeostaz yeniden sağlanamaz ise hücre artan protein yükü sebebiyle apoptoza götürülür.

DMF, MS tedavisinde 1.basamak DMT grubunda yer alan ve oral yol ile kullanılması sebebiyle klinikte oldukça fazla tercih edilen bir ilaçtır. DMF’nin etki mekanizmasında görülen ROS ile ilişkili bir şekilde NHDT oluşumuna katkı sağlaması ve Nrf2 ile ER stres aracılı bir şekilde hücrelerde apoptozu da tetiklediği bilinmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında; enflamatuar tepki özelinde MS patogenezi ile ilişkisi olduğu bilinen nötrofillerde gelişen ER stresine ait belirteçlerin, MS hastaları ve sağlıklı kontroller arasında görülen rölatif gen ekspresyon ve protein ifade seviyesi farkları açısından karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar tedavi yanıtı kapsamında potansiyel biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmiştir.

Bu kapsamda çalışma şeması aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- RRMS tanısı almış ve henüz ilaç tedavisi başlanmayan (naif) ancak DMF tedavisi başlanması belirlenen MS hastalarından ve sağlıklı kontrollerden tam kan örneklerinin alınması

- Naif iken kanı alınan RRMS hastalarının DMF kullanımı sonrası 3. ve 6. ay takip kanlarının alınması
- Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan tam kan örneklerinden manüel yöntem ile nötrofillerin izole edilmesi
- İzole edilen nötrofillerden ER stres belirteçleri ve apoptoz belirteçleri olan *ATF4*, *ATF6*, *BAX*, *BCL2*, *CASP-3*, *CHOP*, *PERK*, *eIF2a* ve *GRP78* genlerinin ifade seviyesinin belirlenmesi amacı ile fenol-kloroform çöktürme yöntemi ile RNA izolasyonu yapılması
- İzole edilen RNA’lardan komplementer DNA (complementary DNA-cDNA) cDNA sentezlenmesi ve sentezlenen cDNA’ların kalıp olarak kullanıldığı kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction-qRT-PCR) ile sağlıklı kontroller ve MS hastalarında hedef genlerin rölatif ekspresyon seviyesi analizlerinin (relative gene expression level-REL) yapılması
- MS hastaları ve sağlıklı kontrollerden izole edilen nötrofillerden total protein izolasyonu yapılması, proteinlerin konsantrasyonlarının bikinkoninik asit analizi (bicinchoninic acid assay-BCA) ile belirlenmesi
- REL analizleri sonucunda MS hastaları ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı farklılık görülen genlerin ürünleri olan proteinlerin ifade seviyesinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez – Western Blot (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis-SDS-PAGE – Western Blot) yöntemi ile belirlenmesi
- Gen ifade seviyeleri ve REL analizleri sonucunda araştırılan protein ifadelerinin hastalık riski ve tedavi yanıtıyla ilişkilendirilmesi
- Çalışma grubunu oluşturan MS hastaları ve sağlıklı kontrollerin cinsiyet, yaş gibi demografik parametreleri ve klinik test sonuçlarının elde edilen deneysel sonuçlar ile bir ilişkisinin olup olmadığının uygun istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirilmesi.

2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma 218S578 kodlu TÜBİTAK 1001 projesinin bir kısmını içermekte olup Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26.06.2018 tarihli 2018/9 No.lu toplantısında incelenmiş ve gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir (Karar No: 18/206, Ek-1). Helsinki deklarasyonu ve iyi klinik uygulamalara (İKU) uyulan ve etik ilkeler gözetilerek yürütülen bu çalışma; Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniğe başvuran RRMS'li hastaların ve sağlıklı kontrollerin dahil edilmesiyle tek kör bir şekilde yürütülmüştür. Çalışma kapsamında elde edilen deneysel verilerin klinikten elde edilen EDSS puanları ve MRG sonuçlarıyla yapılan istatistiksel analizler sonucunda ER stres ve apoptoz belirteci genlerin tanı ve tedavi yanıtı süreçlerinde biyobelirteç olma potansiyelleri değerlendirilmiştir.

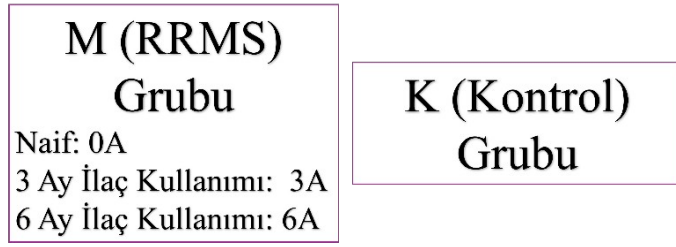
Gönüllülük esasına göre çalışmaya katılmayı kabul eden sağlıklı kontroller (K grubu) ve naif MS hastaları (M grubu) bu çalışmanın iki ana grubunu oluşturmaktadır. Her iki grup için de çalışmaya katılım için uygunluk kriterleri belirlenmiş (Çizelge 2.1) ve kriterleri sağlayan, gönüllülük esasına göre çalışmaya katılmayı kabul edip bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu (BGOF) imzalayan katılımcıların nörologlar tarafından muayeneleri yapılmıştır. Helsinki deklarasyonu ve İKU gereğince hastaların kullanacağı ilaç hekimler tarafından belirlenmiş ve yalnızca DMF kullanımı uygun görülen RRMS hastaları çalışmaya dahil edilmiştir. Çizelge 2.1'de verilen kriterleri sağlayan naif hastalar, hekimlerin tavsiyeleri uyarınca DMF ilacına başlamalarını takiben, ilaç kullanım sürelerinin 3. ve 6. aylarında çalışmamız için kan örneği vermiş olup, M grubunun alt kümelerini oluşturmuşlardır (Şekil 2.1)

Çizelge 2.1: Çalışmaya dahil edilen M (RRMS) grubu ve K (Kontrol) grubu için belirlenen uygunluk kriterleri

Uygunluk Kriterleri	
M Grubu	K Grubu
• Çalışmaya katılmaya gönüllü olmak ve BGOF imzalamak • 18 yaşından büyük 65 yaşından küçük olmak • McDonald Kriterlerine göre kesin MS tanısı almış ve RRMS alt grubunda değerlendiriliyor olmak • Henüz yeni MS tanısı almış olmak ya da naif kabul edilebilecek bir süre boyunca (en az 3 ay) ilaç tedavisi almamış olmak • Herhangi bir atak olgusu göstermiyor olmak • Akut enfeksiyon, travma, ateşli bir hastalık geçiriyor olmak • Malignite öyküsü bulundurmuyor olmak • Hekimler tarafından DMF ilacı kullanacağı belirlenen hastalar	• Çalışmaya katılmaya gönüllü olmak ve BGOF imzalamak • 18 yaşından büyük 65 yaşından küçük olmak • Klinik geçmişinde MS ve MS benzeri öykü bulundurmamak • Yaş ve cinsiyet gibi demografik veriler açısından M grubu ile benzerlik göstermek • MS tanısı veya başka bir oto-immün hastalık tanısı veya geçmişine sahip olmamak ○ MS benzeri oto-immün romatolojik hastalık geçmişi bulundurmamak • Son 3 ay içerisinde immünmodülatör ve immün baskılayıcı ilaç kullanmamış olmak • Akut enfeksiyon, travma, ateşli bir hastalık geçiriyor olmak • Malignite öyküsü bulundurmuyor olmak

M grubuna başlangıçta naif iken dahil edilmiş 20 RRMS hastasının henüz DMF kullanmaya başlamadan önce (0A), DMF kullanmaya başlamalarından sonra 3. ayda (3A) ve 6. ayda (6A) olmak üzere toplamda üç kez olacak şekilde tam kan örnekleri alınmıştır. K grubunda yer alan 60 gönüllünün ise yalnızca bir kez tam kan örnekleri alınmıştır.

M grubu ve K grubunu oluşturan her bir katılımcıdan 2 adet 10 mL’lik sodyum-etilendiamintetraasetik asitli (Na-EDTA) tüplere tam kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri, içine buz aküsü yerleştirilmiş olan ve ısı kaybını önleyen kutularda, direkt buz aküsüne teması engellenmiş bir biçimde, Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi (TOBB ETÜ) Teknoloji Merkezi’nde bulunan Biyomedikal Mühendisliği’ne ait 202 numaralı laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 2.1: Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin oluşturdukları grupların şematik gösterimi. M: RRMS Grubu, K: Kontrol Grubu

2.1.1 Laboratuvar Çalışmaları İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

M grubu ve K grubunu oluşturan gönüllülerden alınan tam kan örnekleri, nötrofil izolasyonu için kullanılmış, elde edilen nötrofillerden hem RNA hem de protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar qRT-PCR deneylerinde, proteinler ise WB deneylerinde kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında tüm deneysel süreçler için kullanılan cihazlar ve çeşitli kimyasallar ile ilgili bilgiler sırasıyla Ek-2 ve Ek-3'te sunulmuştur. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primer dizileri, primerlerin hedef genlerine ait amplifikasyon ve erime eğrileri Ek-4'te sunulurken SDS-PAGE – WB deneylerinde hazırlanan solüsyonlar Ek-5'te sunulmuştur.

2.2 Çalışma Gruplarından Biyolojik Materyal Elde Etmek İçin Kullanılan Metotlar

Bu tez çalışması kapsamında yapılan ve ilerleyen alt başlıklardaki tüm deneysel süreçler için literatür taranmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda, deneysel prosedürlerin her biri bu tez çalışmasına en uygun olacak şekilde ve optimizasyon deneyleri yapılarak belirlenmiştir.

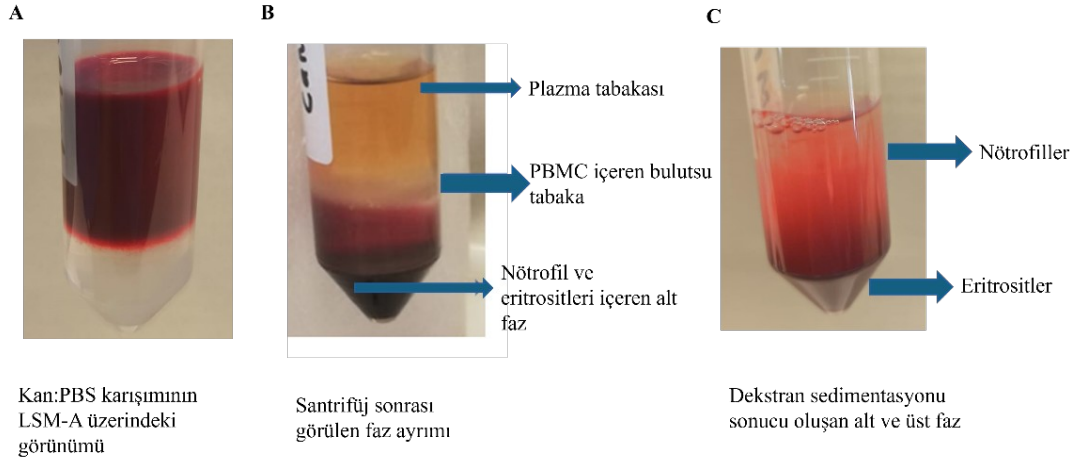
2.2.1 Tam Kandan Nötrofil İzolasyonu

M grubu ve K grubu için çalışmaya katılmayı kabul etmiş gönüllülerden alınan tam kan örneklerinden nötrofil izolasyonu yapılmıştır. Bu tez çalışmasının amacına uygun olarak örneklerin hassasiyeti korunmuş ve özellikle fizyolojik bir durumu yansıtacağı düşünülen nötrofil izolasyonu aşaması için literatüre uygun bir biçimde kan örneğinin alınma saatinden itibaren en fazla 2 saat içinde deney prosedürlerine başlanmıştır (Böyum, 1976; Hirz & Dumontet, 2016).

Tam kan örneklerinden yoğunluk farkına göre ayırma yöntemi kullanılarak nötrofil izolasyonu yapılmıştır (Hirz & Dumontet, 2016). Na-EDTA'lı tüplerde bulunan 15 mL tam kan örneği, 50 mL boyutundaki falkon tüplere aktarılmış ve örneğin üzerine 1:1 oranı sağlanacak şekilde fosfat tamponlu salin (phosphate buffered saline-PBS) eklenmiştir. Oluşturulan bu kan-PBS karışımı lenfosit ayırma besiyeri (lymphocyte separation media-LSM-A) üzerine, 3:2 oran oluşturulacak şekilde (15 mL kan-PBS: 10 mL LSM-A) ve sıvıların birbirine karışmasının önüne geçilerek (Şekil 2.2-A) eklenmiştir. Bu durumda çalışmaya katılan her bir gönüllüden alınan kan örnekleri 2 adet 50 mL falkonda çalışılmıştır. Hazırlanan bu LSM-A-kan karışımı 400 g'de 30 dk 24°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sırasında, yoğunluk farkına göre kan bileşenlerini içeren faz farkının kaybolmaması için cihazın frenleme ayarı 0 olarak belirlenmiştir. Santrifüj sonrasında en üstte plazma, ortada bulutumsu bir tabakada periferik kan mononükleer hücreler (peripheral blood mononuclear cells-PBMC) ve en alt tabakada ise eritrositlerle beraber nötrofiller bulunacak şekilde faz ayrımı olduğu görülmüştür (Şekil 2.2-B). Nötrofillerin elde edilmesi amacıyla, plazma ve PBMC içeren fazlar sistemden uzaklaştırılmış ancak nötrofil ve eritrosit içeren faza (NEF) zarar verilmemeye dikkat edilmiştir. Geride yalnızca NEF kaldığına emin olunduktan sonra LSM-A'nın toksik etkisinden kaçınmak için toplam hacim 10 mL olacak şekilde, falkonlara PBS eklenmiştir.

Bu aşamada NEF bileşenlerinin birbirinden ayrıştırılması amacıyla sedimentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sedimentasyon işlemi herhangi bir santrifüj işlemi gerekmeksizin alyuvarların dibe çökerek adeta bir pelet oluşturması sayesinde nötrofillerden ayrılması olarak tanımlanmaktadır. NEF'den nötrofillerin elde edilmesi amacıyla dekstran sedimentasyonu yapılmış ve bu işlem için %6'lık 10 mL dekstran her bir falkona eklenerek örnekler oda sıcaklığında 40 dk inkübe edilmiştir (Maqbool vd., 2011).

İnkübasyon sonucunda her bir falkonda üstte nötrofiller ve az miktarda eritrositleri içeren süpernatant olduğu görülürken dip kısma ise eritrositlerin çöktüğü görülmüştür (Şekil 2.2-C).



Şekil 2.2: Nötrofil izolasyonu aşamalarında deneyler esnasında elde edilen görüntüler
PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells),
PBS: Fosfat tamponlu salin (phosphate buffered saline), LSM-A: Lenfosit ayırma besiyeri (lymphocyte separation media)

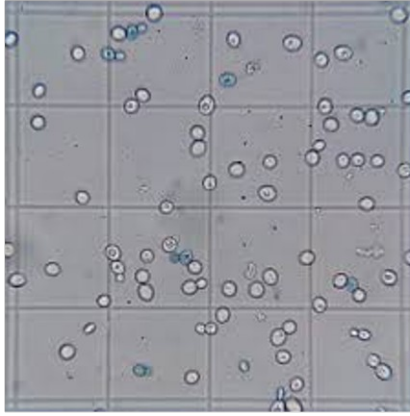
Elde edilen süpernatant ayrı bir falkona alınmış ve çekilen hacmin 2 katı olacak şekilde PBS eklenmiştir. Nötrofilleri içeren örnekler 300 g'de 10 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu sayede sedimentasyon sonucu elde edilen hücrelerin bir pelet oluşturması sağlanmış ve sedimentasyondan geriye kalan az miktarda alyuvarın uzaklaştırılacağı liziz aşamasına geçiş sağlanmıştır.

Alyuvarların sistemden uzaklaştırılması için çeşitli tuzlar içeren kırmızı kan hücresi (red blood cell-RBC) liziz tamponu kullanılmıştır. Her bir falkona 5 mL RBC tamponu eklenmiş, tüm peletin çözülmesi ve hücrelerin mümkün olduğunca liziz tamponuna tabi tutulması amacıyla pipetaj yapılmıştır. Ardından örnekler RBC tamponu ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin liziz tamponundan daha fazla zarar görmemesi, bir diğer deyişle tamponun çalışmasını durdurmak amacıyla her bir falkona 10 mL soğuk PBS eklenmiştir. Nötrofillerin alyuvarlardan ayrıştırılması amacıyla, örnekler 400 g'de 10 dk 4°C'de santrifüjlenmiş ve santrifüj sonrası alyuvarları içeren süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada alyuvarlar yeterince uzaklaştırılamamış ise yalnızca bir kez olmak üzere liziz aşaması tekrar edilmiştir. Liziz aşaması sonrasında, nötrofiller RBC tamponunun kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla bir kez daha 10 mL PBS ile yıkanarak tekrar 400 g'de 10 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir.

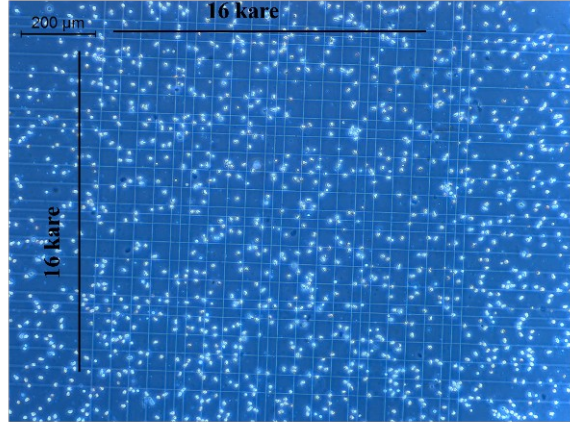
Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak nötrofil peleti 1 mL Ca ve magnezyum (Mg) içermeyen dengeli bir tuz çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution-HBSS) ile

hesaplanmış olur.





TB ile boyanan hücreler
Mavi renkte görülenler
cansız hücre, beyaz-berrak
görülenler ise canlı hücre
olarak sınıflandırılmaktadır



TB ile boyandıktan sonra TC içerisine yüklenen ve
16x16'lık karelerin içerisinde bulunan hücelere ait 10X
büyütme altında elde edilen görüntü

Şekil 2.3: TB ile boyanan hücrelerin temsili görünümü. TB: tripan mavisi (trypan blue)

Literatürden elde edilen bu bilgiler ışığında HBSS içerisinde bulunan nötrofillerden 50 µL alınmış ve 50 µL TB ile yavaşça pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Elde edilen TB-nötrofil karışımı TC'nin alt ve üst karelerine 20 µL olacak şekilde yayılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. TB ile yapılan hücre sayımlarında boya ve hücre karışımının en fazla 3-5 dk süresince bir arada tutulmasına izin verilmektedir. Sayım aşamasında her bir örnek için bu sürenin aşılmasına özen gösterilmiştir. Sayım aşaması sonrasında izole edilen nötrofillerin en az 5 milyonu RNA izolasyonu için ayrılırken kalanı ise protein izolasyonu için kullanılmıştır.

RNA izolasyonunda kullanılmak üzere ayrılmış olan ve 5 milyon nötrofil içeren hücre alikotları, HBSS'nin uzaklaştırılması için 2500 g'de 5 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve her bir hücre peleti 1 mL Qiazol ile çözülerek, RNA izolasyonuna hazır bir şekilde -86°C'de saklanmıştır.

2.2.2 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hazır bir şekilde -86°C'de bekleyen örneklerden fenol-kloroform çöktürme metodu ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Toni vd., 2018). Bu yöntem fenol ve guanidium tiyosiyonat içeren bir kimyasal (örneğin ticari

ismiyle Qiazol) ve kloroform kullanımını içermektedir. Bu iki bileşen, hücrelerin



parçalanmasını ve parçalanma sonucu ortama salınacak materyallerin birbirinden ayrılmasını sağlayan bir faz farkı oluşumunu sağlamaktadır.

Gelişen faz farkı sonrasında en üstte RNA, ortada bulutumsu bir yapıda DNA ve en altta ise organik bileşikler bulunur. Bu sayede diğer hücrel bileşenlerden ayrılan RNA, izopropanol ve etanol yardımıyla çöktürülerek izole edilmiş olur.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan RNA izolasyonu için fenol-kloroform çöktürme yöntemi kullanılmış ve prosedür oluşturulurken Toni vd., 2018 makalesinden yararlanılmıştır. Belirlenen protokole göre M grubu ve K grubuna ait örneklerden izole edilen nötrofiller kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu süresince takip edilen deneysel prosedür TOBB ETÜ Teknoloji Merkezi'nde bulunan RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR çalışmaları için kullanılan biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1 mL Qiazol içerisinde -86°C'de bekleyen örnekler oda sıcaklığına ulaşmaları için bir süre bekletilmiştir. Oda sıcaklığına geldiğine emin olunan örnekler mikropipet yardımıyla homojenize edilmiş ve ardından her bir örneğin üzerine içerdiği qiazol miktarının beşte biri kadar (200 µL) kloroform eklenmiştir. Fenollü bileşik ve kloroformun homojen bir yapı alması için örnekleri içeren eppendorf tüpler 3 dk boyunca elle sallanmıştır. Homojen bir görünüm oluştuğuna emin olunduktan sonra, faz farkı oluşumu sağlanacak şekilde, örnekler 12000 g'de 15 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda faz farkı olduğu görülmüş ve RNA içerdiği bilinen üst faz ayrı bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. Tez çalışması kapsamında tercih edilen RNA izolasyon metodu, klasik RNA izolasyon metotlarından farklı olarak bu aşamadan sonra ikinci bir kloroform ekleme aşaması önermektedir. İkinci kez kloroform kullanılmasının amacı, Qiazol içerisinde bulunan ve izole edilmiş RNA'nın saflığını, kalitesini etkileyebilecek olan fenol ve guanidin tuzlarının olabildiğince uzaklaştırılmasıdır.

Bu amaçla, her bir örnek için, yeni bir tüpe aktarılan ve RNA içeren üst faza bir kez daha 200 µL kloroform eklemesi yapılmıştır. Ayrıca, RNA içeren faz ve kloroformun homojen bir görünüm kazanması için tüpler tekrar 3 dk elle sallanmıştır. Homojen görünüm olduğundan emin olunduktan sonra örnekler tekrar 12000 g'de 15 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonrasında, tıpkı ilk santrifüjde olduğu gibi, yeni bir faz farkı olduğu görülmüştür ve yine RNA içeren üst faz ayrı bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. Ayrılan bu RNA'ların çöktürülmesi için, her bir örneğe 500 µL

izopropanol eklenmiş ve örnekler 10 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından, örnekler 13000 g'de 10 dk 4°C'de santrifüjlenmiş ve santrifüj sonucunda RNA peletinin oluştuğu görülmüştür.

RNA içeren pelete zarar vermeden süpernatantın bir kısmı sistemden uzaklaştırılmış ve her bir örneğe 1 mL %75'lik etanol eklenmiştir. Bu sayede hem RNA'ların başlangıçtan itibaren sistem içerisinde kalan tuzlardan uzaklaştırılması hem de tüplerin içinde bulunan ancak tam olarak çökmemiş RNA'ların tekrar çöktürülmesi sağlanmıştır. Etanol eklenen tüpler 10-20 saniye boyunca vorteks işlemine ve ardından 10000 g'de 10 dk 4°C'de santrifüje tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrasında pelete zarar vermeden süpernatant sistemden uzaklaştırılmış ve tüplere tekrar 1 mL %75 etanol eklenerek 7500 g'de 5 dk 4°C'de RNA'ların etanol ile yıkanması gerçekleştirilmiştir. Literatürde karşılaşılan fenol-kloroform çöktürme yöntemlerinden farklı olarak, RNA saflığının arttırılması amacıyla yapılan bu fazladan etanol yıkama işlemi, amacına uygun bir şekilde takip edilmiş ve aynı adım toplamda iki kez olmak üzere gerçekleştirilmiştir (Toni vd., 2018)

Etanol yıkaması yapılan örneklerden pelete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisinde bulunan tüm RNA'nın tekrar toplanması için tüpler vortekslenmiş ve ardından 10000 g'de 30 saniye boyunca mini santrifüjde santrifüjlenmiştir.

Yapılan son santrifüj işleminden sonra tüm süpernatant çekilmiş ve peletler kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan peletler 20 µL nükleaz içermeyen su (nuclease free water- NFW) ile çözülerek saflık ve konsantrasyon ölçümüne tabi tutulmuştur.

İzole edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümü için laboratuvarımızda bulunan NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific, ABD) spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçüm için öncelikle cihazın her iki pedalı NFW ile silinmiş, ardından RNA'nın çözüldüğü NFW ile kör (blank) ölçüm alınmıştır.

RNA'nın saflık analizi için, literatüre uygun olacak şekilde A260/280 ve A260/230 değerleri dikkate alınmıştır. A260/280 oranı nükleik asitlerin saflığını belirtirken A280/230 oranı ise fenol, guanidin tuzları ve çeşitli kimyasallar açısından saflığı belirten bir değer olarak kabul edilmektedir. Nanodrop cihazı ile yapılan ölçümler sonrasında A260/280 oranı 2,0 ve üzerinde olan; A260/230 oranı ise 2,0 ve üzerinde

olan RNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir (Eldh vd., 2012). Ölçüm esnasında, gen ifade seviyesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak deneyler gözetilerek miktarı 200 ng üzerindeki RNA örnekleri kullanılmıştır. Saflık ve miktar tayini için belirlenen parametrelere uymayan örneklerde ek değerlendirmeler yapılmıştır.

Fenol kontaminasyonu görülen RNA'larda, aynı örneğe ait bir diğer alikot kullanılarak deney tekrarı yapılırken; guanidin kontaminasyonu için Nanodrop cihazı tarafından belirlenen ölçüm değerleri baz alınmıştır. 100 mM değerinin altında guanidin kontaminasyonu görülen örnekler devam eden deneylerde kullanılmıştır. Yapılan RNA izolasyonlarında 100 mM değerinin üzerinde guanidin kontaminasyonu ile karşılaşılmamıştır.

RNA'ların Nanodrop kullanılarak yapılan saflık kontrolüne ek olarak, laboratuvarımızda total RNA kalite kontrolü açısından izole edilen RNA'lar agaroz jel elektroforezinde incelenmektedir. İzole edilen total RNA'lar, ribozomların bileşenleri olarak protein sentezinden sorumlu olacak şekilde görev yapan spesifik ribozomal RNA (rRNA) türleri olan 28S ve 18S RNA yapılarını içerirler. Agaroz jel elektroforezine tabii tutulan RNA'larda, rRNA yapılarının 28S:18S oranı 2:1 oranında olacak şekilde görülmesi, izole edilen RNA'nın kalitesini belirtirken bu yöntemle RNA'ların genomik DNA (gDNA) açısından saflığı da değerlendirilebilmektedir. Laboratuvarımızda fenol-kloroform çöktürme yöntemiyle izole edilen RNA'ların kalite kontrolünün yapılması amacıyla agaroz jel elektroforez deneyi gerçekleştirilmektedir.

Gerçekleştirilen bu agaroz jel elektroforez deneyinde RNA'ların RNazlar tarafından yıkılmasını önlemek amacıyla elektroforez tamponu dietil pyrocarbonate (diethyl pyrocarbonate-DEPC) içeren dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. RNA'ların elektroforez esnasında potansiyel RNaz yıkımından korunması için DEPC kullanımına ek olarak çamaşır suyu da kullanılmıştır.

DEPC'li su kullanılarak hazırlanan %1'lik agaroz jel karışımı içerisine hacmin %1'i kadar çamaşır suyu ve RNA'ların UV altında ışımasını sağlamak üzere etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. Elektroforez işleminde fenol-kloroform çöktürme yöntemi ile izole edilen RNA'lar 1 µg olacak şekilde yüklenmiş ve bu RNA'lara ek olarak,

gDNA ve 1 kilobaz (kb) değerinde DNA ladderı yüklenmiştir. Tüm  rnekler 90V’de 1 saat y r t lm ştir.

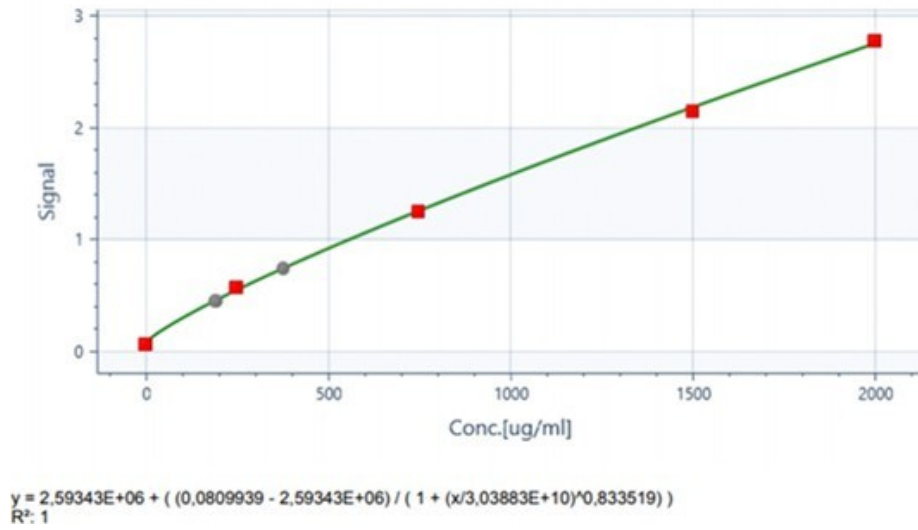
 zole edilen RNA’lar, cDNA sentezinde kullanılmak üzere -86 C’de saklanmıştır.

2.2.3 Total Protein  zolasyonu

Tamamlanan nötrofil izolasyonu sonrası izole edilen nötrofillerin sayılmasının ardından en az 5 milyon nötrofil RNA izolasyonu için ayrılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılacak olan nötrofiller ayrıldıktan sonra geride kalan hücreler 2 mL’lik eppendorf tüplere aktarılmış ve HBSS’nin uzaklaştırılması için 2500 g’de 5 dk 4 C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant sistemden uzaklaştırılmış ve HBSS kalıntılarının tamamen temizlenmesi için hücre peleti 1 mL soğuk PBS ile pipetaj yardımıyla homojenize edilmiştir. PBS ile tamamen  z ld ğ nden emin olunan örnekler tekrar 2500 g’de 5 dk 4 C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atılmış ve peletler radyoimm noprespitasyon tahlil tamponu (radioimmunoprecipitation assay buffer-RIPA) ile muamele edilmiştir. Protein izolasyonu süresince çeşitli proteazların sebep olacağı degradasyonun önlenmesi için proteaz inhibitörü ve bu tez çalışması kapsamında eIF2  ve PERK proteinlerinin fosforile hallerinin de ifade seviyesinin incelenme durumu söz konusu olduğundan fosfataz inhibitörü kullanılmıştır. Tez  alışması kapsamında yapılan optimizasyon deneylerini takiben “10 milyon hücreye 250  L RIPA tamponu” şeklinde belirlenen oran tüm örnekler için kullanılmıştır. Proteaz ve fosfotaz inhibitörleri protein izolasyonu için kullanılacak olan RIPA tamponu içine %1 oranında olmak üzere eklenmiştir.  lgili proteazların eklenmesi ile hazırlanan RIPA tamponu ile homojenize edilen örnekler, 15 dk boyunca buzda bekletilmış ve ardından 14000 g’de 15 dk 4 C’de santrifüjlenmiştir. RIPA tamponu kullanımı sayesinde hücrenin total proteini  z n r hale gelmektedir. Bu nedenle santrifüj sonrası total protein lizatını içeren süpernatant alınmış ve BCA işlemi ile konsantrasyon tayini yapılmıştır.

Kolorimetrik bir yöntem olan bikinkoninik asit analizi (bicinchoninic acid assay-BCA), protein konsantrasyonu belirlemede yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olduğu için tercih edilmektedir. BCA yöntemi temelde peptit bağlarının bakır (Cu) iyonları ile redoks tepkimesi oluşturmasına dayanır. Öncelikle, peptit bağları Cu⁺²

iyonlarını Cu^+ olacak şekilde indirger ve oluşan Cu^+ , BCA molekülleri ile şelatlanarak mor renkte bir kompleks oluşturur (Huang vd., 2010). Bu yöntem sayesinde, incelenen ve konsantrasyonu bilinmeyen bir proteinin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen standart bir örnekten elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizdirilen standart eğri yardımı ile belirlenebilmiş olur. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Takara marka BCA tahlili kiti kullanılmış olup, tüm okumalar çoklu plaka okuyucu SkanIt Microplate Reader cihazında (ThermoScientific, Multiskan Go) yapılmıştır. BCA deneyi için, sığır serum albümini (bovine serum albumin-BSA) kullanılarak sırasıyla 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ ve 2000 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır. Ardından, ilgili standartlar kullanılarak standart eğri çizdirilmiş ve bu eğriden hesaplanan deneysel hatanın yorumlanmasını sağlayan R^2 değeri incelenmiştir (Şekil 2.4). Elde edilen R^2 değerinin 1'e eşit veya 1'e yakın olduğu deneyler doğru kabul edilmiştir.



Şekil 2.4: BCA deneyi için çizdirilen standart eğri

Standartların hazırlanmasının ardından, BCA kitinde üretici tarafından önerilen prosedür takip edilmiştir.

BCA kiti içerisinde A ve B isimli reaktiflerin 100:1 oranında karıştırılması ile bir çalışma solüsyonu (working solution-WS) hazırlanmaktadır ve yine kit prosedürünün önerisine göre bu solüsyonun kör (blank), standart veya hasta/kontrol örneği olması fark etmeksizin konsantrasyon ölçümü yapılacak her bir örneğe 200 μL olacak

şekilde eklenmesi gerekmektedir. Tıpkı RNA miktar ve kalite analizinde olduğu gibi BCA



deneyi için de bir kör (blank) okuması yapılmış ve kör olarak distile su (dH₂O) kullanılmıştır. Kit prosedüründe verilen bu önerileri takiben her bir standart ve hasta/kontrol örneği için ilgili kuyucuklara 200 µL WS eklenmiştir. Deneysel hazırlık sürecinin tamamlanmasını takiben 96 kuyucuklu plaka, ışık görmeyecek şekilde, 37°C’de 50 rpm’de 30 dk çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plaka okuma yapılması için SkanIt Microplate Reader (ThermoScientific, Multiskan Go) cihazı içerisine yerleştirilmiş ve 562 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Ölçüm yapılan cihaz tarafından çizdirilen standart eğri ve bu eğriden elde edilen denklem sayesinde cihaz yazılımı tarafından örneklerin µg/mL cinsinden konsantrasyonları belirlenmektedir. Konsantrasyonu belirlenen örnekler SDS-PAGE – WB deneylerinde kullanılmak üzere -86°C’de saklanmıştır.

2.3 ER Stres ve Apoptoz Belirteci Genlerin İfade Seviyesinin Belirlenmesi

M grubu ve K grubu örneklerinin tamamında ER stres ve apoptoz belirteci olan genlerin ifade seviyesi qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem için öncelikle, kalıp olarak kullanılmak üzere RNA’dan cDNA sentezlenmesi gerekmektedir.

2.3.1 Total RNA’lardan cDNA Sentezi

Saflık ve konsantrasyon açısından uygun bir şekilde izole edilen total RNA örneklerinden ters transkriptaz PCR yöntemi (reverse transcriptase PCR; RT-PCR) ile çift zincirli DNA elde edilmiştir. RT-PCR yöntemiyle gerçekleştirilen cDNA sentezi için iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, ABD) kullanılmıştır. Ökaryotik hücrelerde gerçekleşen transkripsiyon sürecinde mRNA’nın sonunda çoklu adenin nükleotit tekrarı (poli-A) içeren ve poli-A kuyruğu adı verilen bir yapı bulunmaktadır. cDNA sentezi için kullanılmış olan bu kit içerisinde total RNA’ların arasından mRNA’ların seçilmesini sağlayan ve deoksi-timin (dT) tekrarı içeren oligo dT primerleri bulunmaktadır. Böylelikle, kullanılan kit sayesinde total RNA içerisinden mRNA’lar seçilmiş ve RNA bağımlı DNA polimeraz özellikteki ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi sayesinde cDNA sentezi yapılmış olur. Sentezlenen cDNA ise qRT-PCR deneylerinde kalıp olarak kullanılır ve çeşitli analizlerin yapılması ile hedef genlerin rölatif ifade seviyesi (relative gene expression level-REL) belirlenir.

Deney hazırlıkları ve RT-PCR koşulları üretici firmanın önermiş olduğu prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. M grubu ve K grubu örneklerinin tamamı için sabit 200 ng RNA kullanılarak gerçekleştirilen cDNA sentezinde öncelikle, kite ait üretici prosedürü takip edilerek, 1 örnek için kit içerisinde bulunan her bir materyalden kullanılması gereken hacim değerleri gözetilmiştir (Çizelge 2.2). Ardından, prosedüre göre önerilen toplam reaksiyon hacmi, bu hacmin içerisinde 5X iScript Reaction Mix materyalinin 1X konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilmesi ve iScript Reverse Transcriptase enziminin örnek başına 1 µL kullanılması önerileri dikkate alınmış ve bu iki kit materyalini içeren bir ana karışım hazırlanması gerektiği görülmüştür. Ana karışımın hazırlanması amacıyla, Çizelge 2.2’de görülen ve 1 örnek için kullanılması gereken hacim değerleri, cDNA sentezi yapılacak örnek sayısı (n) gözetilmiş ve deneysel hatanın da önüne geçmek için n+1 ile çarpılmıştır.

Çizelge 2.2: cDNA sentezinde bileşenlerin 1 örnek için kullanıldığı hacimsel değerler

Materyaller	1 Örnek İçin
5X iScript Reaction Mix	4 µL
iScript Reverse Transcriptase	1 µL
Kalıp RNA	Her örnekten 200 ng olacak şekilde
NFW	Örnek başına değişkenlik göstermektedir
Toplam Hacim	20 µL

Bu hesaplamaları takiben, çarpım sonucu dikkate alınarak 4 x (n+1) µL 5X iScript Reaction Mix ve 1 x (n+1) µL iScript Reverse Transcriptase içeren ve toplam hacmi 5 x (n+1) olarak hazırlanan ana karışım vortex ve spin işlemlerine maruz bırakılmış ve bu sayede karışımı oluşturan her bir materyalin birbiri ile iyice karışması sağlanmıştır.

cDNA sentezi için, soğutucu tüp tutacağında bulunan 0,2 mL’lik eppendorf tüplere öncelikle NFW eklenmiştir. NFW hacminin belirlenmesi amacıyla; her bir örnek için 200 ng RNA’ya karşılık gelen hacim ve bir örnek için kullanılan ana karışım hacmi (5 µL) toplanmış ve bu değer toplam reaksiyon hacimden (20 µL) çıkarılmıştır. Elde edilen sonuca karşılık gelen NFW’nun tüplere eklenmesinin ardından, hazırlanan ana

karişım her bir tüpe 5 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. En son aşama olarak ise her bir örnekle için hesaplanan ve 200 ng RNA içeren hacim ilgili tüplere eklenmiştir.

Hazırlanan tüpler kibarca vortex ve spin işlemlerine tabi tutulup, herhangi bir hava kabarcığı iermediklerine emin olunduktan sonra Eppendorf Mastercycler® Nexus PCR (Münih, Almanya) cihazında uygun kuyucuklara yerleştirilmiştir.

Isıl dengesinin kaybolmaması için dengeli bir şekilde kapağı kapatılan cihazda RT-PCR için izelge 2.3'te verilen PCR döngüsü seçilerek sentez gerçekleştirilmiştir. Sentez sonrasında elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR deneylerinde kalıp olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

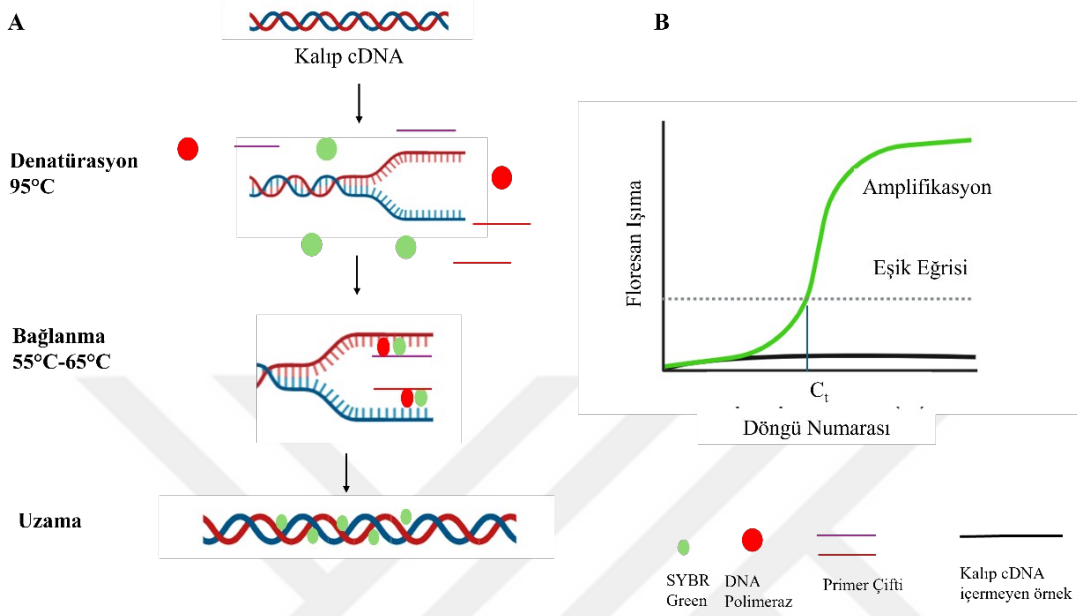
Çizelge 2.3: RT-PCR için kullanılan program

Aşamalar	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
Hazırlanma Aşaması	5	25
Ters Transkripsiyon	20	46
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	1	95
Opsiyonel Bekletme	∞	4

2.3.2 Hedef Genlerin qRT-PCR Yöntemi ile Rölatif İfade Seviyesinin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında ER stres belirteci olan *ATF-4*, *ATF-6*, *CHOP*, *PERK*, *eIF2α*, *IRE1*, *GRP78* ve apoptoz belirteci olan *BAX*, *BCL-2*, *CASP-3* genlerinin ifade seviyesi, referans gen olarak *B-aktin* kullanılarak qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde örneklerin amplifikasyonuna bağlı artan floresan sinyal cihaz tarafından okunmakta ve nicel bir veriye dönüştürölmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, qRT-PCR deneylerinde amplifikasyona bağlı oluşan floresan sinyal, SYBR Green boyası kullanılarak tespit edilmiştir. qRT-PCR deneyi, kalıp olarak kullanılan cDNA'ların ısı aracılığıyla 95°C'de denatüre edilmesiyle başlar. Denatürasyon sonrasında cDNA'ların çift iplikli yapısı açılır (şekil 2.5-A). Ardından, genellikle 55°C-65°C sıcaklık aralığında gerçekleşen, tek iplikli yapılara forward ve reverse primerlerin tutunması ile bağlanma (annealing) aşamasına geçilir. Bu aşamayı takiben, tekrar çift iplikli DNA miktarının arttığı ve SYBR Green boyasının oluşan bu çift iplikli

DNA'ların küçük oluklarına bağlandığı uzama (extension) aşaması başlamış olur. Uzama aşamasında artan amplifikasyona bağlı olarak bir eşik değeri geçilir ve bu değerin geçilmesi sayesinde boyanın oluşturduğu floresan sinyal gerçek zamanlı bir şekilde cihaz tarafından saptanmış olur (Şekil 2.5-B).

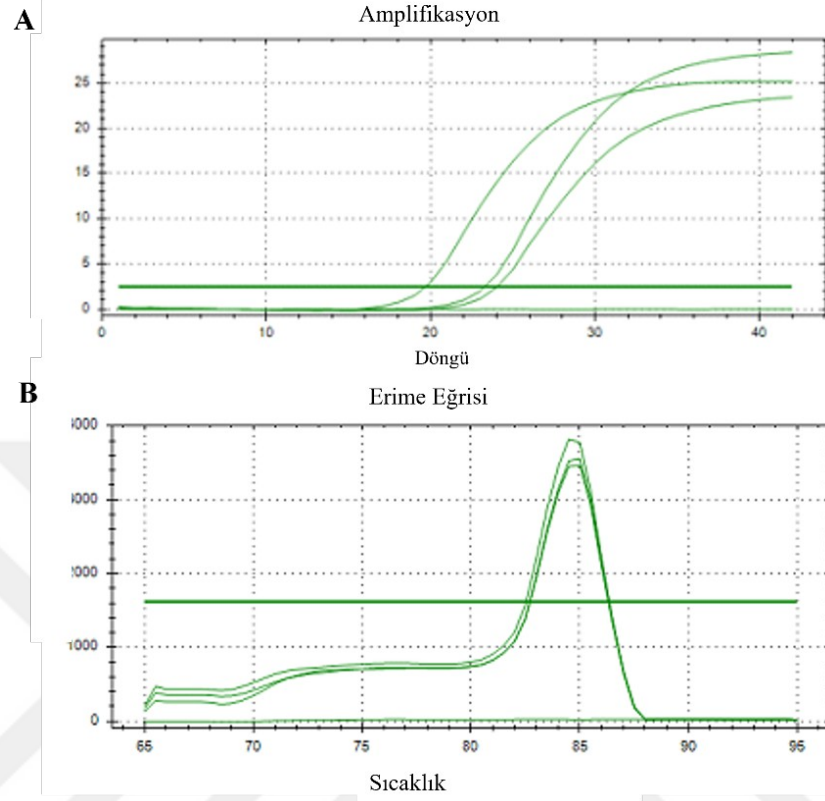


Şekil 2.5: qRT-PCR sürecinin temsili gösterimi, A) qRT-PCR deneyinin şematik gösterimi, B) cihaz tarafından tespit edilen floresan sinyale ait grafiğin temsili görünümü

qRT-PCR deneylerinde görülen amplifikasyona bağlı olarak artan floresan sinyal miktarının eşik eğrisini ilk kez geçtiği nokta döngü eşiği (threshold cycle- C_t) olarak adlandırılır (Şekil 2.5-B, Şekil 2.6-A). Gerçek zamanlı bir şekilde tespit edilebilen C_t değeri, amplifikasyonu gerçekleştirilen ürün miktarı hakkında yorum yapılabilmesini de sağlar. Nitekim, qRT-PCR deneyinde incelenen bir örnekte hedef genin daha fazla ifadeleniş oluşu bu örnekte daha düşük döngü sayısında dahi amplifikasyon olduğu ve floresan sinyal miktarının da arttığını göstermektedir.

Hedef gen ifade seviyesinin gerçek zamanlı amplifikasyonunun belirlenmesine ek olarak, qRT-PCR çalışmalarında gerçekleşen polimerizasyonun tek bir ürüne ait olup olmadığının da değerlendirilmesi mümkündür. Gerçekleşen amplifikasyonun sonunda sıcaklığın kademeli bir şekilde artırılmasıyla tek bir özgül PCR ürününün amplifiye edilip edilmediği kontrol edilir. Bu sıcaklık artışına bağlı olarak erime eğrisi (melt curve) oluşturulur (Şekil 2.6-B). Oluşturulan erime eğrisinin tek bir sıcaklık değerinde

zirve yapıyor oluşu ise reaksiyon boyunca incelenmek istenilen her bir genin ve primerin özgül olduğunu belirtir.



Şekil 2.6: β -aktin geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

Bu tez çalışması kapsamında hedef genlerin her birinin rölatif ifade seviyesi M grubu ve K grubu örneklerinin tamamında hesaplanmıştır. İlgili hesaplamaların yapılabilmesi için öncelikle her bir örnek için qRT-PCR çalışması her bir hedef gen ve referans gen için iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, ABD) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel sürecin kendisi ve PCR döngüsü üretici prosedürüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneysel süreç başlamadan önce 96 kuyulu çoklu plakada hedef genlerin ve referans genin aynı anda çalışılmasını sağlayacak deney tasarımı yapılmıştır.

Deneysel aşamaya geçildiğinde, ilk olarak, qRT-PCR deneyinde kullanılan NFW, iTaq Universal SYBR Green Supermix kiti ve valide primer çiftleri soğutuculu tüp tutacaklarına yerleştirilmiştir. Her bir gen için 1 kuyu içerisinde gereken uygun reaksiyon hacmi hesaplanmış ve sonrasında plaka tasarımına uygun bir şekilde ilgili genlerin çalışılacağı toplam kuyu sayısı hesaplanmış (n), ancak hata payı bırakmak

amacı ile n+1 değeri ile bu hacim çarpılmıştır (Çizelge 2.4). Elde edilen bu çarpım sonucu hacminde bir ana karışım hazırlanarak plaka içerisinde ilgili kuyulara eşit bir şekilde dağıtılmıştır.

Çizelge 2.4: qRT-PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere oluşturulan karışımın 1 kuyu için içerdiği malzeme miktarı ve 9 kuyuya uygun bir şekilde hazırlanan ana karışım hacmi

Materyaller	1 Kuyu İçin (μL)	9 Kuyu İçin (μL)
NFW	3,8	34,2
iTaq SYBR Green Supermix	5	45
İleri Primer (Stok: 10 μ M)	0,2	1,8
Geri Primer (Stok: 10 μ M)		
cDNA	1	-

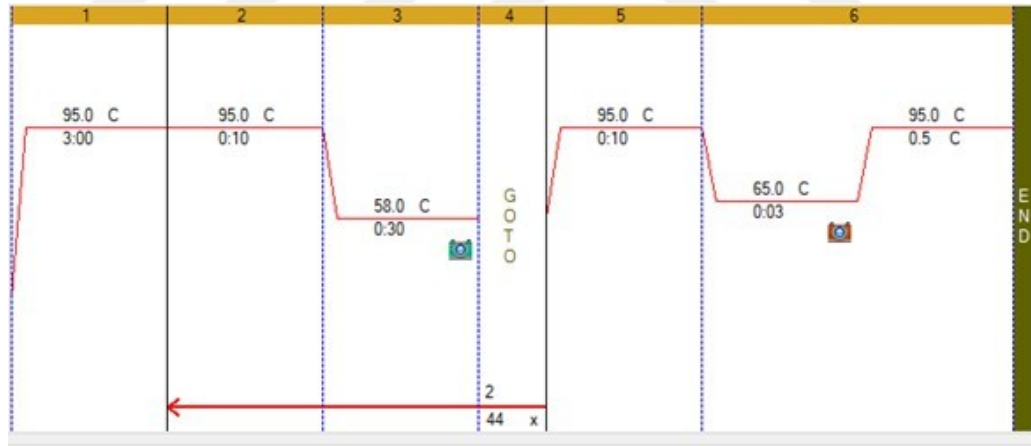
Çizelge 2.4'te verilen ve cDNA içermeyen 9 kuyu için hazırlanan ana karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan ana karışım, ifade seviyesi araştırılan tüm genler için üç teknik replika oluşturulacak şekilde her bir kuyuya 9 μ L hacimde dağıtılmıştır. Ardından, 2.3.1 numaralı başlıkta anlatıldığı gibi her bir örnek için 200 ng RNA'dan sentezlenen cDNA'lar 40 ng olacak şekilde seyreltilerek ana karışım bulunan kuyulara 1 μ L olacak şekilde ve yine üç teknik replika oluşturacak şekilde dağıtılmıştır.

Yükleme işlemlerinin tamamlanmasının ardından, 96 kuyucuklu plakanın yüzeyi, reaksiyon esnasında oluşabilecek buharlaşmanın bertaraf edilmesi amacıyla, şeffaf bir koruyucu ile kapatılmış ve ardından 2500 g'de 2 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Herhangi bir kabarcık içermediğinden emin olunan plaka StepOne Plus RT-PCR cihazına (Woodlands, Singapur) yerleştirilmiştir. Ardından primerlerin bağlanma sıcaklığı da dikkate alınarak Çizelge 2.5'te yer alan reaksiyon döngüsüne ait sıcaklık ve süreler cihaz yazılımına girilerek oluşturulan program kullanılmış ve reaksiyon başlatılmıştır (Şekil 2.7).

Çizelge 2.5: qRT-PCR deney döngüsü

Döngü Aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	3 dk	1X
Denatürasyon	95°C	10 saniye	44X
Bağlanma ve Uzama	58°C	30 saniye	
Erime Eğrisi	95°C	10 saniye	Her 0,5°C’de bir
	65°C	30 saniye	
	95°C	50 saniye	

qRT-PCR çalışmalarında 3 teknik replika olarak kullanılan tüm örneklerin tek tek C_t değerleri cihazda bulunan program tarafından saptanmıştır. Her bir örnek için ise bu 3 replikadan elde edilen C_t değerlerinin ortalaması alınarak tek bir C_t değeri elde edilmiştir.



Şekil 2.7: qRT-PCR deneyi için cihazda kurulan programın ekran görüntüsü

M grubu ve K grubunda bulunan her bir örneğin ortalama C_t değeri belirlendikten sonra REL analizleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Livak & Schmitgenn, 2001). Bu yöntemde her bir hedef genin ifade seviyesi referans gen olarak kullanılan β -aktin'in ifade seviyesine göre normalize edilmektedir. Bu amaçla referans genin C_t değeri hedef genlerin C_t değerinden çıkarılmış ve normalizasyon sonucunda her bir örnek için ΔC_t değeri elde edilmiştir. RRMS hastaları ve kontrol grubunda yapılan

REL analizleri için, K grubundaki her bir örneğe ait ΔC_t değerleri dikkate alınarak kontrol grubunun ortalama ΔC_t değeri hesaplanmıştır.

K grubunda bulunan her bir örneğe ait olan ΔC_t değerinden kontrol grubunun ortalama ΔC_t değerinin çıkarılması ile her bir örneğin $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplanmıştır. $\Delta\Delta C_t$ değerinin 2 tabanında negatif kuvveti alınarak örneklerin fold change değerleri hesaplanmıştır (Şekil 2.8-A). M grubunda bulunan her bir örneğin ΔC_t değerinden kontrol grubunun ortalama ΔC_t değeri çıkarılarak M grubuna ait her bir örneğin $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplanmıştır (Şekil 2.8-B). Hesaplanan $\Delta\Delta C_t$ değerlerinin 2 tabanında negatif kuvveti alınarak M grubu örnekleri için de fold change değerleri hesaplanmıştır. Yapılan bu hesaplamalar sayesinde M grubu ve K grubu örneklerinin hepsi için ayrı ayrı belirlenmiş olan fold change değerleri ile her bir hedef gen için REL analizleri gerçekleştirilmiştir.

A

$$\Delta C_t = C_t (\text{Hedef Gen}) - C_t (\text{Referans Gen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{K grubu}) - \Delta C_t (\text{K grubu ortalama})$$

$$\text{REL Analizi için: Fold change} \rightarrow 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

B

$$\Delta C_t = C_t (\text{Hedef Gen}) - C_t (\text{Referans Gen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{M grubu}) - \Delta C_t (\text{K grubu ortalama})$$

$$\text{REL Analizi için: Fold change} \rightarrow 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Şekil 2.8: REL analizlerinde kullanılan $\Delta\Delta C_t$ hesaplamalarının gösterimi

2.4 ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Proteinlerin Rölatif İfade Seviyesinin Belirlenmesi

qRT-PCR deneyine tabi tutulan ve REL analizi yapılan genlere ait proteinlerin rölatif ifade seviyesinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE – WB yöntemi kullanılmıştır.

SDS-PAGE; akrilamid ve bisakrilamid moleküllerinin amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) kullanımı ile polimer yapısı kazanması sonucunda oluşturulmuş dikey bir elektroforez jel sistemidir. WB ise jelde bulunan proteinlerin katı bir destek sistemi olan bir membran yapısına aktarılma işlemidir.

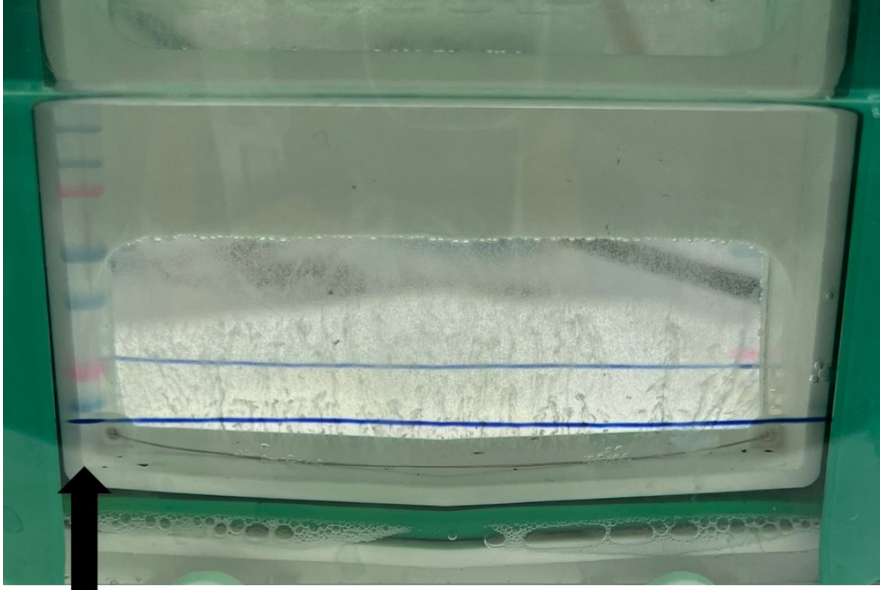
SDS-PAGE sistemi hem kendi içerisinde bulunan hem de örnek yükleme tamponu içerisinde bulunan SDS sayesinde ısı ile denatüre edilerek primer yapısına döndürülen proteinlerin negatif yük ile kaplanmasını sağlar. Bu sayede proteinler uygulanan elektrik alandan da faydalanarak yalnızca moleküler ağırlıklarına göre jel içerisinde birbirlerinden ayrılırlar. Nitekim bu ayrılma işlemi, çoğu jel

elektroforezinde olduğu



gibi, jel yapısının yoğunluğuna bağlı olarak, moleküler ağırlığı küçük olan proteinlerin daha hızlı hareket ederek jelin terminal ucunda, moleküler ağırlığı büyük olan proteinlerin ise jelin başlangıç kısmına daha yakın olan ucunda olacağı şekilde gerçekleşir. SDS-PAGE sisteminde yürütülecek olan örnekler bir örnek yükleme tamponu (laemmli tamponu + β -merkaptotanol) ile karıştırılır. Bu tampon hem proteinlerin olabildiğince doğru bir şekilde ayrışması için gerekli fizikokimyasal şartları oluştururken hem de proteinler için optimum bant çözünürlüğünün elde edilmesini sağlar (Mahmood & Yang, 2012). Ek olarak, jele yüklenen proteinler, örnek yükleme tamponu içerisinde bulunan β -merkaptotanol sayesinde denatüre bir halde stabil bir şekilde kalmaktadır. Ayrıca, örnek yükleme tamponu içerisinde bromofenol mavisi bulunmaktadır. Bu boya aslen bir tür takip boyası olarak görev alır. Nitekim, bromofenol mavisi, jel üzerinde, proteinlerin hemen önünde ilerler ve yürütme işlemi süresince proteinlerin konumu hakkında yorum yapılmasını sağlar.

SDS-PAGE sistemi aslen yoğunluğu birbirinden farklı olan iki jel sistemini içermektedir. Jel sistemlerinden ilki; poliakrilamid konsantrasyonu %4 olan, farklı boyutlardaki tüm proteinleri boyutlarına göre bir ayrıma tabi tutmadan, kompakt bir şekilde aynı anda hareket etmeye zorlayan ve sistemin üst kısmında bulunan istifleme (stacking) jelidir. Bu jel sisteminden eşit bir şekilde çıkan proteinler moleküler ağırlıklarına göre dağılım gösterecekleri ve SDS-PAGE sistemini oluşturan ikinci jel sistemi olan ayırma (separating) jelinin içerisine girerler. Proteinlerin SDS-PAGE sistemi içerisinde yürütülme işlemi hedef proteinlerin moleküler ağırlıklarına uygun volt ve süre parametreleri gözetilerek oluşturulan elektrik alan sayesinde gerçekleştirilir. Bir güç kaynağı kullanılarak oluşturulan bu elektrik alan; tüm sistem içerisinde tris, glisin ve SDS içeren yürütme tamponu sayesinde homojen bir şekilde dağıtılır. SDS-PAGE sistemlerinde proteinlerin jel içerisindeki konumunu belirlemek için bromofenol mavisinin konumunun takibine ek olarak ladder bantlarının açılma durumları takip edilmektedir. Farklı moleküler ağırlıkta proteinleri içeren ladder, ayırma jeli içerisine girdiği andan itibaren içerisinde bulunan proteinlerin ağırlıklarına uygun bantlar oluşturacak şekilde ve jel üzerinde görünür olacak şekilde ilerlemeye başlar (Şekil 2.9). Ladderda bulunan protein bantlarının tamamının birbirinden ayrılmasıyla proteinlerin jel içerisindeki yürütme işleminin tamamlandığına karar verilir.



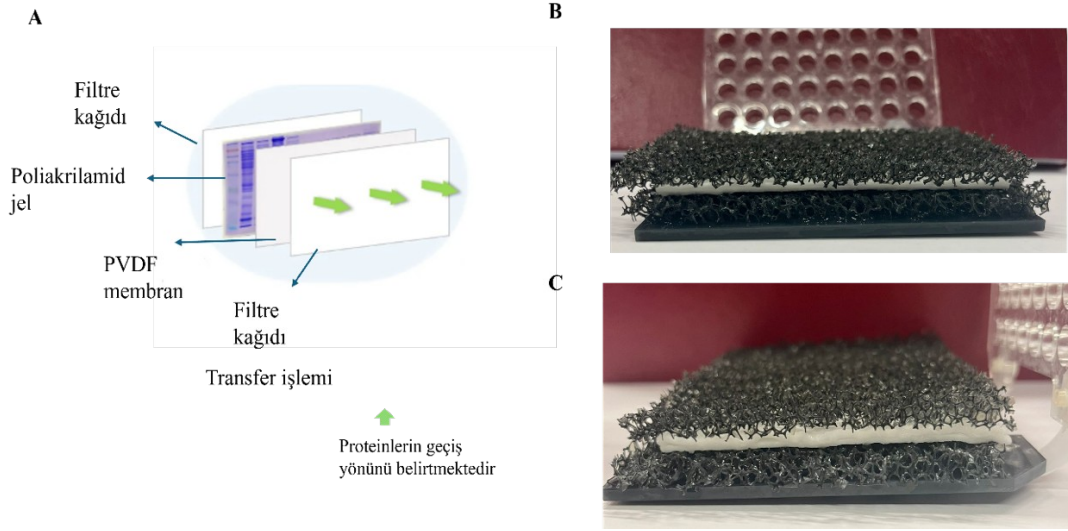
Ayırma jelinde açılan
ladder bantları

Şekil 2.9: Ayırma jelinde yürüyen örnekler ve ladder'a ait deneysel görüntü

SDS-PAGE sisteminde yürütülen proteinler katı bir destek sistem olan çeşitli membran yapılarına aktarılarak WB sürecine geçiş sağlanır. WB için genellikle nitrosellüloz ya da polivinilidin diflorür (PVDF) yapıda olan membranlar tercih edilmektedir. WB deneyi transfer aşaması açısından ıslak, yarı kuru veya kuru olarak çeşitlendirilmektedir. Transfer işlemi, çeşidinden bağımsız olarak, genel anlamda, poliakrilamid jel yapıda bulunan proteinlerin membrana aktarım sürecini anlatan ve WB deneyinin ilk basamağı olma özelliğini taşıyan bir süreçtir. Transfer işlemi sürecinde elektrik alan sayesinde bir transfer tamponu varlığında jele gömülü halde bulunan proteinler PVDF membrana geçirilir.

Bu geçişin sağlanması için ise öncelikle membranın aktifleştirilmesi ve bir transfer sandviçi hazırlanması gerekir. Etanol ya da metanol kullanılarak porları açık hale getirilen membran aktifleştirilir ve transfer işlemine hazır hale getirilir (Mahmood & Yang, 2012).

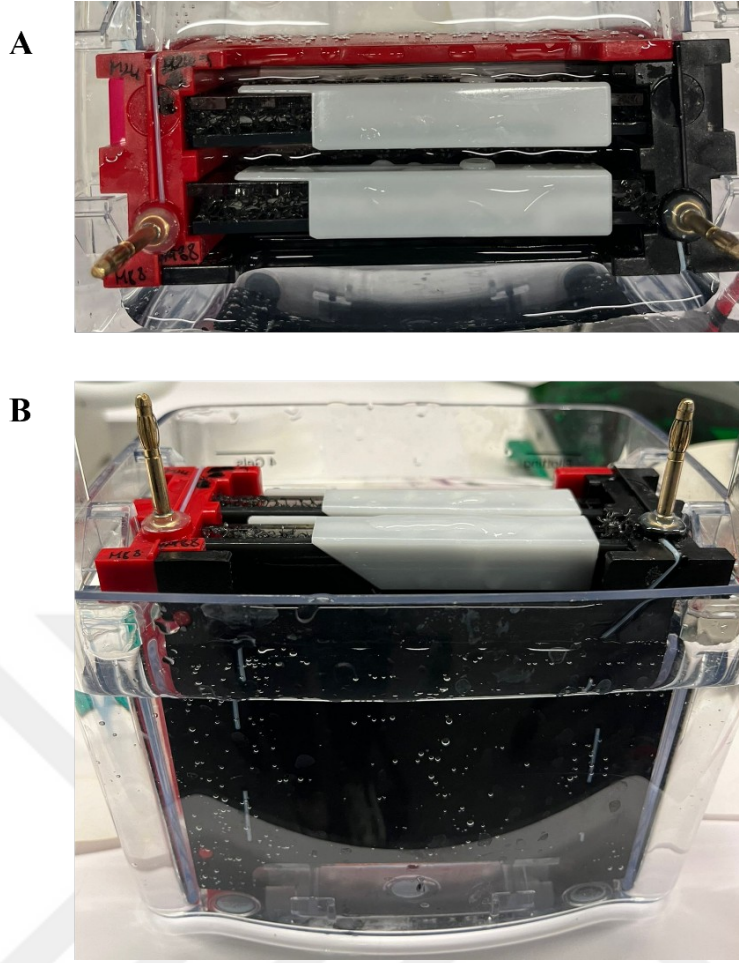
İlgili sandviç ise filtre kâğıdı, jel, membran ve tekrar filtre kağıdının üst üste konması ile oluşturulur (Şekil 2.10-A). Özellikle ıslak transfer işlemlerinde hazırlanan bu sandviç yapı bir sandviç aparatı arasına sıkıştırılır (Şekil 2.10-B).



Şekil 2.10: A) WB deneyi için hazırlanan transfer sandviçinin temsili görünümü, B) sandviç aparatı içerisinde yer alan yapının karşıdan deneysel görünümü ve C) sandviç aparatının yandan görünümü

Hazırlanan sandviç aparatı transfer işlemi süresince elektrik alan uygulanacak olan ek bir aparat içerisine yerleştirilir. Tüm bu aparatlar transfer işleminin gerçekleştirilmesi için tank içerisine yerleştirilir (Şekil 2.11). Tıpkı SDS-PAGE sisteminde olduğu gibi transfer işleminde de elektrik alanın sistemin tamamında eşit bir şekilde dağıtılması için bir tampon kullanılır.

Transfer tamponu olarak bilinen bu solüsyon tris ve glisine ek olarak transferin gerçekleşeceği membranın aktifleştirildiği alkol çeşidini de (metanol ya da etanol) içerir. Transfer tamponu da eklendikten sonra hazır hale getirilen sistemde hedef proteinlerin moleküler ağırlıkları gözetilerek belirlenen uygun volt ve süre parametreleri seçilir ve transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer işleminin ardından membranın açık olan porlarının kapanması ve proteinlerin non-spesifik bant vermesinin önüne geçilmesi amacıyla süt tozu ya da BSA içeren bir tampon ile membran bloklanır. Bloklama işleminin tamamlanmasını takiben membranlar hedef proteini işaretleyecek olan birincil antikor ile inkübe edilir. İnkübasyonu tamamlanan membranlar; non-spesifik bant oluşumunun önüne geçilmesi ve bağlanmayan birincil antikorların atılması için %1 oranında tween-20 içeren tris tamponlu tuzlu su ile (tris buffered saline with tween 20-TBST) yıkanır.



Şekil 2.11: A) Sandviç aparatlarının elektrik alana maruz bırakıldığı tank içerisindeki deneysel görünümü ve B) elektrik alanın iletilmesini sağlayan transfer tamponunu içeren transfer sistemine ait deneysel görünüm

Yıkamaların ardından membranlar; bu sefer birincil antikorları tanıyan, proteinlerin çeşitli görüntüleme teknikleri ile görselleştirilmesini sağlayacak enzimatik özellikli ya da floresan işaretli etiketleri olan ikincil antikor ile inkübe edilir. İnkübasyonu tamamlanan membranlar tekrar aynı amaçla TBST ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilir.

Bu tez çalışması kapsamında hedef proteinlerin ifade seviyesinin belirlenmesi için ayırma jeli yoğunluğu %12 olan SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır (Çizelge 2.6). SDS-PAGE jelinin dökülmesi için uygun bir ortamın hazırlanması gereklidir. Bu uygun ortam için öncelikle 1 mm kalınlığında iki cam “casting” sistem adı verilen bir yapıda çeşitli aparatların kullanılmasıyla sabitlenmiştir (Biorad, ABD).

Çizelge 2.6: SDS-PAGE jel solüsyonu içeriği

Malzemeler/Solüsyonlar	Ayırma Jeli (%12)	İstifleme Jeli (%4)
dH ₂ O	4 mL	3,1 mL
Jel Solüsyonu (%30 T, %2,67 C) *	3,3 mL	1,3 mL
Ayırma Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	2,5 mL	-
İstifleme Tamponu (0,5 M Tris-HCl)	-	1,25 mL
%10 SDS	100 µL	50 µL
%10 APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL
*T:akrilamid+bisakrilamid (total), C: çapraz bağlayıcı (cross-linker)		

Camların sabit olduğu ve düz bir zeminde bulunduğuna emin olunduktan sonra Çizelge 2.6’da verilen hacimler kullanılarak öncelikle ayırma jeli hazırlanmış ve dikey elektroforez sistemini oluşturan iki ince cam arasına dökülmüştür. Ardından, polimerizasyonun sağlanması için jelin üstü izopropanol ile kapatılmıştır. Polimerizasyonun gerçekleşmesini takiben izopropanol sistemden uzaklaştırılmış ve istifleme jeli ayırma jelinin üstüne dökülmüştür. Protein lizatlarının yüklenmesi için istifleme jeli üzerine tarak takılarak kuyu oluşumu gerçekleştirilmiştir. Yapılan her bir SDS-PAGE – WB deneyi için ilgili çalışma grubu örneklerinden 20 µg olacak şekilde protein lizatı alınmıştır. Örnekler su ve laemmli tamponu ile karıştırıldıktan sonra 95°C’de 5 dk kuru ısı bloğu üzerinde denatüre edilmiştir. Yüklenecek protein örnekleri hazırlanırken, toplam örnek hacmi içerisinde stok hali 4X konsantrasyonda olan laemmli tamponunun 1X konsantrasyonda olmasına dikkat edilmiştir. Yükleme işlemi öncesinde istifleme jelinde bulunan kuyular yükleme tamponu kullanılarak yıkanmış ve örneklerin jel içerisinde yürütmesine engel olacak herhangi bir tortu kalmadığından emin olunmuştur. Denatürasyonun tamamlanmasının ardından örnekler jele yüklenmiştir. Her bir SDS-PAGE deneyi için Biorad marka 10-250 kilodalton (kD)

aralığında bant içeren protein ladder da jel sistemine yüklenmiştir. Örnekler başlangıç olarak istifleme jelinde 60 V’de yürütülmüştür.

Ardından ladder bantlarının açılması ile örneklerin ayırma jeline geçtiği görülmüş ve proteinler 90 V’de yürütülmeye devam edilmiştir. Ladder bantlarında görülen açılmalar kontrol edilerek proteinlerin jelde tamamen yürüdükleri kontrol edilmiş ve uygulanan elektrik alan durdurularak transfer işlemine geçilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında WB deneyi için ıslak transfer işlemi yapılmış olup PVDF yapıda bulunan membranlar kullanmıştır. Transfer işlemi için öncelikle, PVDF membran 1 dk boyunca metanol ile inkübe edilerek aktive edilmiş ve bu esnada poliakrilamid jelde bulunan istifleme jeli ve ayırma jeli birbirinden ayrılmıştır. Transfer tamponu ile ıslatılmış olan filtre kâğıdı üzerine öncelikle proteinleri içeren ayırma jeli ve ardından PVDF membran yerleştirilmiştir. Sandviç yapısının tamamlanması için PVDF membran üzerine bir adet daha filtre kâğıdı koyulmuş ve bu sandviç transfer aparatının içine yerleştirilerek transfer işlemi başlatılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında belirlenen hedef proteinler için transfer süreci 100 V 60 dk süresince 4°C’de gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemini takiben ilgili membranın bloklama sürecine hazır hale getirilmesi için çalkalayıcı üzerinde 5’er dk süren üç TBST yıkaması yapılmıştır. Bloklama işlemi non-spesifik bant oluşumunu azalttığı gibi membranda bulunan proteinlerin birincil antikorlar ile kuracağı bağlantının güçlenmesini de sağlamaktadır. Nitekim, membranların birincil ve ikincil antikorların çözüldüğü tampon ile bloklanması gerekmektedir (Zhao vd., 2019). Bu tez çalışması kapsamında hedef olarak belirlenen proteinlere ait antikorların %5 süt tozu içeren TBST içerisinde çözülmesi uygun görüldüğünden her bir membran %5 süt tozu içeren TBST ile bir saat çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bloklanmıştır. Tüm hedef proteinlerin birincil antikor işaretleme gece boyunca 4°C’de çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Birincil antikor inkübasyonunun tamamlanmasından sonra membranlar çalkalayıcı üzerinde 10’ar dk süren beş TBST yıkamasına tabii tutulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında poliklonal özellikte ve kaynağı tavşan olan birincil antikorlar kullanılmıştır. Birincil antikorla işaretlenen her bir membran, proteinlerin bulunduğu bölgelerin işaretleme için sağlamak üzere Horseradish peroksidaz (HRP) enzim etiketi bulunan

poliklonal ve anti-tavşan özellikli ikincil antikor ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. Tüm bu antikor işaretleme süreçleri çalkalayıcı üzerinde yapılmıştır.

İnkübasyonunu tamamlayan her bir membran non-spesifik bağlanmayı engellemek üzere tekrar beş kez her biri 10 dk olacak şekilde çalkalayıcı üzerinde TBST ile yıkanmış ve görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, HRP enzim etiketli ikincil antikorun da kullanılması ile kimyasal reaksiyon sonucunda yayılan ışığın tespit edildiği kemilüminesans görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde ikincil antikorda bulunan HRP enziminin substratları olarak luminol bazlı bir substrat çözeltisi ve peroksit çözeltisi yardımıyla genişletilmiş kemilüminesans (enhanced chemiluminescence-ECL) kullanılmış ve hedef proteinlerin membran üzerinde oluşturduğu bant yapıları saptanmıştır. Oluşan bantların hedef proteine ait olup olmadığının belirlenmesi için ise moleküler ağırlığa göre açılan ladder bantları ile hizalama yapılmıştır. Membranların görüntülenmesi için TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ChemiDoc MP (Biorad, ABD) cihazı kullanılmıştır.

Görüntüleme sonucunda elde edilen bant kalınlıkları Image J (versiyon 1.54i) görüntü analiz programında densitometrik analizler ile hesaplanmıştır. Proteinlerin rölatif ifade seviyesinin belirlenmesi için hedef proteinlerin ve normalizasyon aşamasında kullanılmak üzere B-aktin bant kalınlıkları Image J programı ile hesaplanmıştır. B- aktin bant kalınlıklarının örnekler arasında farklılık gösterdiği saptanmış olup, M grubu örneklerinin tamamı için total protein lizatlarının bütünleşmiş bant yoğunluğunun normalizasyon için kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan hesaplamaların ardından hedef protein bant kalınlığı total proteinlerin bütünleşmiş bant yoğunluklarına bölünmüş ve elde edilen değer 100 ile çarpılmıştır. Bu sayede hedef proteinlerin yüzde rölatif ifade seviyesi belirlenmiştir.

2.5 İstatistiksel ve *in silico* Analizler

İstatistiksel analizlerin doğru bir şekilde yapılabilmesi, tip I hata %5 ve tip II hata %20 ön kabulüyle literatür üzerinden yapılan değerlendirmeler sonucunda, araştırmanın bütünü için M ve K gruplarının örneklem hacminin n=20 olmasının yeterli olacağı görülmüştür (Faul vd., 2007). M grubu ve K grubu örnekleri için

sürekli değişken



olarak sınıflandırılan parametrelerin (klinikten gelen laboratuvar parametreleri, ER stres-apoptoz belirteci olan genlerin ve proteinlerin ifadenme seviyeleri, yaş) normallik analizi gruplar arasında örneklem hacminin eşit olmaması sebebiyle Shapiro-Wilk testi ile tayin edilmiştir. M grubunun alt kümelerini oluşturan 0A, 3A ve 6A gruplarında ise örneklem hacimlerinin eşit olması gözetilerek normallik analizi için Kolmogorov-Smirnov testine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Hem M grubu ve K grubu arasında hem de M grubu alt kümeleri arasında yapılan normal dağılım değerlendirmeleri gruplar arasında uygulanan ilgili testlerin sonucunda elde edilen P değerine göre belirlenmiştir. P değerinin 0,5'ten büyük olması normal dağılım olarak kabul edilirken 0,5'ten küçük olan P değerleri için verilerin normal dağılmadığı kabul edilmiştir.

M grubunda, naif RRMS hastalarından oluşan 0A grubuyla K grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. M grubu ve K grubu arasında kategorik değişken olarak kabul edilen veriler Pearson χ^2 testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

M grubunu oluşturan üç alt küme (0A-3A-6A) içerisinde parametrelerin üçlü karşılaştırılmasında verilerin normal dağılmadığı görülmüş ve Friedman testi uygulanmıştır. Friedman testine tabi tutulan veriler için istatistiksel olarak anlamlı sonuç ($P < .05$) elde edilen verilerin hangi iki grup arasında görüldüğünün belirlenmesi için de post-hoc analizleri yapılmış ve Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

M grubunun alt kümelerini oluşturan 0A, 3A ve 6A gruplarında tedavi yanıtını değerlendirmek için EDSS puanı, MRG total lezyon sayısı, yeni ortaya çıkan T2 lezyon sayısı ve kontrast tutan aktif lezyon sayılarına ait veriler ile nötrofillerde görülen hem ER stres ve apoptoz belirteci genlerin hem de proteinlerin ifade seviyesi arasında çeşitli korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında normal dağılım gösteren veriler için Pearson korelasyon katsayısı hesaplanırken normal dağılım göstermeyen veriler için Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Grup içi yapılan korelasyon analizlerine ek olarak tekrarlı ölçümü bulunan veriler için, bağımlı gruplar olan (0A, 3A ve 6A grupları) arasında tekrarlı ölçümler korelasyonu (repeated measures correlation-rmcorr) analizi yapılmıştır.

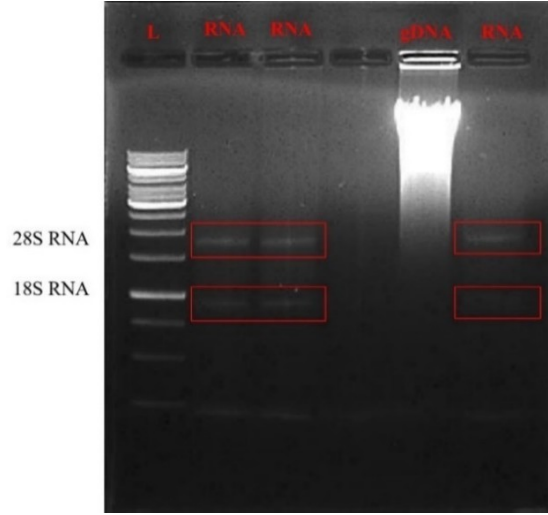
Bu tez çalışması kapsamında yapılan analizler IBM SPSS Statistics programı (versiyon 28) ve R paket programı (versiyon 4.4.2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılmış olan Mann-Whitney *U* testi ve Friedman testleri için *P* değerinin <.05 olarak hesaplandığı karşılaştırmalarda elde edilen sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Çoklu grupların karşılaştırıldığı testlerde anlamlılık değeri için SPSS paket programı tarafından yapılan Bonferroni düzeltmesine bağlı olarak hesaplanan *P* değeri dikkate alınmıştır.

Nötrofillerde görülen ER stres, KPY tepkisi ve bu iki parametreye bağlı görülen apoptozun; RRMS hastalarında DMF'ye tedavi yanıtı üzerinden araştırıldığı bu çalışmada sinyal yollarının birbirleriyle olan ilişkisi, ortak ifadenme durumları ve biyolojik süreç zenginleştirme analizleri Etkileşen Genlerin/Proteinlerin Getirilmesi için Arama Aracı (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - STRING) veri tabanı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Çalışma Grupları

Bu tez çalışması kapsamında, Materyal-Metot bölümünün 2.1 çalışma gruplarının oluşturulması başlığında da anlatıldığı üzere, K grubu (n=60) ve M grubu (n=20) olacak şekilde iki ana grup bulunmaktadır. M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayı (6A) olacak şekilde takip edilerek M grubu alt kümeleri oluşturulmuştur. M grubu ve K grubunu oluşturan gönüllülerden tam kan örnekleri alınmış ve bu örneklerden nötrofiller izole edilmiştir. İzole edilen nötrofillerden ise total RNA ve total protein elde etmek üzere ilgili izolasyon prosedürleri takip edilmiştir. Tez çalışması kapsamında oluşturulan K grubu ve M (RRMS) grubu örneklerinden izole edilen total RNA örneklerinden mRNA'ların seçilmesiyle sentezlenen cDNA'lar qRT-PCR deneylerinde kalıp olarak kullanılmış ve bu sayede ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin rölatif ekspresyon seviyeleri (relative expression level-REL) belirlenmiştir. Total RNA izolasyonunun fenol- kloroform çöktürme yöntemiyle manuel bir şekilde yapılmasını takiben NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific, ABD) ile yapılan ölçüme ek olarak örneklerin saflık ve kalite kontrolünün gerçekleştirilmesi amacıyla agaroz jel elektroforez yöntemi de kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen RNA örneklerine ait deneysel sonuç Şekil 3.1'de sunulmaktadır. İlgili jel görüntüsü incelendiğinde, izole edilen RNA'larda 28S:18S oranının 2:1 oranını sağlayacak şekilde olduğu görülmüştür. Ayrıca, RNA'ların saflığının belirlenmesi amacıyla agaroz jele gDNA örneği de yüklenmiştir. gDNA'nın agaroz jel elektroforezinde oluşturmuş olduğu bant görüntüsü de baz alınarak, izole edilen total RNA'ların gDNA açısından saf olduğu görülmektedir. K grubu ve M grubunu oluşturan tüm örnekler için qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri hesaplanmıştır. M grubunu oluşturan örneklerde ER stresi ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülenlerinde WB deneyleriyle protein ifade seviyesindeki değişim de incelenmiştir.



Şekil 3.1: İzole edilen RNA'ların ve genomik DNA (gDNA) örneğinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda elde edilen görüntü

3.2 M Grubu ve K Grubuna ait Demografik Veriler

M grubu ve K grubu arasında yaş ve cinsiyet parametreleri karşılaştırılmıştır. Yaş analizi için Mann-Whitney U test kullanılırken, gruptaki cinsiyetlerin karşılaştırılması için χ^2 testi kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Çizelge 3.1'de sunulan veriler değerlendirildiğinde M grubunu oluşturan bireylerin yaş ortalamasının K grubunu oluşturan bireylere göre anlamlı derecede düşük olduğu ($P=.048$) görülürken bireyler arasında cinsiyet parametresinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($P=.515$) görülmektedir.

Çizelge 3.1: M (RRMS) grubu ve K (kontrol) grubu arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları

	M (RRMS Grubu) (n=20)	K (Kontrol Grubu) (n=60)	<i>P</i>
Yaş (yıl)			
Ortalama ± SS	29.0 ± 12.0	33.8 ± 12.8	.048
Medyan (Q1-Q3)	24.0 (20.0-34.0)	29.5 (23.0-41.5)	
Aralık (min.-maks.)	45.0 (18.0-63.0)	45.0 (19.0-64.0)	
Kadın, n (%)	10 (50.0)	35 (58.0)	.515
Erkek, n (%)	10 (50.0)	25 (42.0)	
<i>P</i> değerleri M (RRMS) ve K (Kontrol) gruplarının karşılaştırılmasıyla elde edilmiştir. Yaş analizleri Mann Whitney <i>U</i> test ile, cinsiyet analizleri ise χ^2 ile yapılmıştır. Yaş parametresi için verilen değerler ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) ve üçüncü satırda değer aralığı (min.-maks.) olacak şekilde sunulmuştur. Cinsiyet parametrelerinde ise iki satırda başlangıç olarak frekans değeri ardından yüzde değeri sunulmuştur. n: grup içindeki birey sayısı, SS: standart sapma, min.: minimum, maks.: maksimum			

3.3 M Grubunda Klinik Verilerin Değerlendirilmesi

M grubunda 0A, 3A ve 6A dönemlerinde hekimler tarafından belirlenen EDSS puanları, total lezyon sayısı T2 lezyon sayıları ve hastaların geçirdiği atak dönemlerinin sayısı olmak üzere klinik verilerinin, toplamda 6 ay süren DMF tedavisi boyunca gösterdiği değişim incelenmiştir. Bu duruma ek olarak her bir parametrenin cinsiyet bazlı değişimi de incelenmiştir (Çizelge 3.2). 0A, 3A ve 6A gruplarında yapılan incelemelerde verilerin dağılımının normal olmadığı görülmüş ve karşılaştırma için Friedman testi uygulanmıştır. Yapılan post-hoc analizlerinde Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Çizelge 3.2: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanı, T2 lezyon ve total lezyon sayılarının karşılaştırılması

	0A n=20	3A n=20	6A n=20	P
EDSS Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	1.25 ± 1.02 1.00 (0.50-2.00)	0.97 ± 0.68 1.00 (0.50-1.50)	0.85 ± 0.73 1.00 (0.00-1.25)	.036 ^a
T2 Lezyon Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	6.10 ± 6.01 3.50 (2.00-9.00)	0.15 ± 0.49 0.00 (0.00-0.00)	0.70 ± 2.00 0.00 (0.00-0.00)	<.001 ^a <.001 ^b .001 ^c
Total Lezyon Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	24.80 ± 18.84 21.50 (10.00-38.00)	21.25 ± 17.69 16.00 (7.00-36.00)	21.00 ± 16.93 14.50 (8.50-35.50)	.144 ^a
Klinik parametrelerde verilen değerler ilk satırda ortalama ± SS ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak şekilde sunulmuştur n= grup sayısı, SS: standart sapma 0A-3A-6A karşılaştırmaları için Friedman testi kullanılmıştır. a: 0A-3A-6A karşılaştırmaları. b: 3A vs. 0A. c: 6A vs. 0A.				

Çizelge 3.2 incelendiğinde EDSS puan ortalamalarında 0A, 3A ve 6A gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş meydana geldiği görülmektedir ($P=.036$). Ancak bu anlamlı farklılığın hangi gruplar arasında oluştuğunun tespit edilmesi amacıyla yapılan post-hoc analizlerinde gruplar arası anlamlılık kaybolmuştur.

T2 lezyon sayılarının ortalamalarında 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş görülmektedir (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$). Total lezyon sayısında ise 0A, 3A ve 6A grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($P=.144$).

EDSS puanlarında ikili gruplar arası anlamlılığın kaybolması durumunun incelenmesi amacıyla Kendall's W ve Cohen's d isimli iki parametre hesaplanmıştır. Kendall's W değeri bir uyumluluk katsayısı olup bir grup, bir öge ya da tekrarlanan ölçümler üzerindeki tutarlılığı değerlendirmek için kullanılan istatistiksel bir ölçüttür. Kendall's W değeri 0-1 aralığında değişmekte olup W değerinin 1'e olan yakınlığı, incelenen uyum derecesinin yüksek olduğunu belirtir. Cohen's d değeri ise standartlaştırılmış ortalama fark olarak belirtilir ve gruplar arasındaki farkın derecesini anlamak için kullanılır (Kim, 2015; Moslem vd., 2019). Tıpkı Kendall's W değeri gibi Cohen's d değeri de 0-1 aralığında değişir. Ancak Kendall's W değerinden farklı olarak değer 1'e olan yakınlığı gruplar arası farkın oldukça büyük olduğunu söyler.

Yapılan ek değerlendirmeler sonucunda, 0A-3A ve 3A-6A grupları arasında (0A-3A: Cohen's $d=.320$, 3A-6A: Cohen's $d=.170$) küçük bir fark olduğu görülürken 0A ve 6A (Cohen's $d=.450$) grupları arasında orta derecede bir fark olduğu görülmüş ve üç grubun bir arada değerlendirildiği Kendall's W test sonucunda gruplar arasındaki uyum derecesinin düşük olduğu ($W=.166$) görülmüştür (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarının uyumluluk ve fark değerlendirmeleri

M (RRMS) Grubu	Cohen's d	Kendall's W
0A-3A	.320	.166
0A-6A	.450	
3A-6A	.170	

M grubunu oluşturan hastaların ($n=20$), RRMS tanısı aldıktan ve bu tez çalışması kapsamında yürütülen çalışmaya katılmayı kabul etmelerinden itibaren (0A dönemi) DMF tedavisi aldıkları 6 aylık süreçte, yalnızca bir kişi atak geçirmiştir.

3.3.1 M Grubunda Klinik Verilerin Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen klinik verilerin 0A, 3A ve 6A grupları arasında değerlendirilmesini takiben klinik verilerin cinsiyete göre değişimi de araştırılmıştır.

EDSS, T2 lezyon, total lezyon ve kontrast tutan lezyon olmak üzere belirlenen klinik parametrelerin MS hastalarında cinsiyete bağlı bir şekilde yapılan istatistiksel analizlerinde grup içi karşılaştırmalar yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: M Grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanı, T2 lezyon ve total lezyon sayılarının cinsiyete göre karşılaştırılması

	Kadın n=10	Erkek n=10	P
EDSS 0A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.90 $\pm$ 1.17 0.50 (0.00-1.50)	1.60 $\pm$ 0.74 1.25 (1.00-2.00)	.089 ^a
EDSS 3A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.85 $\pm$ 0.78 1.00 (0.00-1.50)	1.10 $\pm$ 0.57 1.00 (1.00-1.00)	.684 ^a
EDSS 6A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.80 $\pm$ 0.75 1.00 (0.00-1.50)	0.90 $\pm$ 0.74 1.00 (0.00-1.00)	.768 ^b
T2 Lezyon 0A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	8.10 $\pm$ 6.57 6.50 (3.00-15.00)	4.10 $\pm$ 4.91 2.00 (1.00-5.00)	.105 ^a
T2 Lezyon 3A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.00 $\pm$ 0.00 0.00 (0.00-0.00)	0.30 $\pm$ 0.67 0.00 (0.00-0.00)	.481 ^a
T2 Lezyon 6A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.70 $\pm$ 2.21 0.00 (0.00-0.00)	0.70 $\pm$ 1.89 0.00 (0.00-0.00)	.796 ^a
Total Lezyon 0A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	31.10 $\pm$ 20.97 28.50 (13.00-44.00)	18.50 $\pm$ 14.88 14.50 (7.00-30.00)	.139 ^b
Total Lezyon 3A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	28.70 $\pm$ 18.63 26.00 (13.00-44.00)	13.80 $\pm$ 13.80 8.00 (5.00-21.00)	.029 ^a
Total Lezyon 6A Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	28.80 $\pm$ 18.43 29.50 (12.00-44.00)	13.20 $\pm$ 11.42 9.50 (7.00-17.00)	.052 ^a
Kontrast Tutan Lezyon Var/Yok (%)	3 / 7 (%75 / %44)	1 / 9 (%25 / %75)	.264 ^c
Klinik parametrelerde verilen değerler ilk satırda ortalama $\pm$ SS ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olacak şekilde sunulmuştur. KT lezyonda ise ilk satırda cinsiyet grubunda KT lezyon bulunduran/bulundurmayan kişi sayısı ve alt satırda bu kişilerin % değerleri verilmiştir. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma. KT Lezyon: Kontrast tutan lezyon. a: P değerleri Mann-Whitney U test, b: P değerleri Independent sample t-test, c: P değeri χ^2 testi ile elde edilmiştir.			

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) oluşturulan gruplarda ayrı ayrı olmak üzere, kadın hastalar ile erkek hastalar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; EDSS, T2 lezyon ve total lezyon parametrelerinde normal dağılan veriler için Independent sample t-test uygulanırken normal dağılım göstermeyen verilerde Mann-Whitney *U* test uygulanmış, kontrast tutan lezyon parametresi için ise χ^2 testi uygulanmıştır.

Sonuç olarak, 0A, 3A ve 6A gruplarında, EDSS puanları yönünden cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (0A: $P=.089$, 3A: $P=.684$, 6A: $P=.768$). Bu duruma benzer şekilde, T2 lezyon sayıları yönünden cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadığı görülmüştür (0A: $P=.105$, 3A: $P=.481$, 6A: $P=.796$). Ek olarak, 0A ve 6A gruplarında, total lezyon sayıları yönünden de cinsiyetler arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark bulunmadığı görülmüştür (0A: $P=.139$, 6A: $P=.052$). Yapılan analizler 3A grubu bazında değerlendirildiğinde ise total lezyon sayıları yönünden kadın RRMS hastalarının erkek RRMS hastalarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla total lezyona sahip olduğu görülmektedir ($P=.029$).

Kontrast tutan lezyonu olan kadın RRMS hastalarının ($n=3$) erkek RRMS hastalarından ($n=1$) sayıca daha fazla olduğu görülmüştür. Fakat, kontrast tutan lezyonları olan RRMS'li hastaların olmayan RRMS'li hastalar yönünden cinsiyetler arasında yapılan istatistiksel analizlerde, kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan RRMS'li hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ($P=.264$).

3.4 ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

M Grubu ve K Grubunu oluşturan örneklerin tamamında *ATF4*, *ATF6*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CHOP*, *PERK*, *eIF2 α* , *IRE1* ve *GRP78* REL değerleri her bir örnek için elde edilen fold change değerleri kullanılarak belirlenmiştir. ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri karşılaştırılmıştır. Öncelikle M grubunda yer alan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesinde yer aldıkları 0A grubu ile kontrol grubu arasında ikili karşılaştırmalar yapılmış ve karşılaştırmaların yapılmasında Mann-Whitney *U* test uygulanmıştır.

0A grubunda bulunan hastaların, toplamda 6 aylık DMF kullanımlarına bağlı olarak 3 ayda bir olacak şekilde kanları alınmış ve bu şekilde tedavinin 3.ayını ile 6.ayını yansıtan 3A ve 6A grupları oluşturulmuştur. Bu sebeple birbiriyle bağımlı olan 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan REL karşılaştırmalarında Friedman testi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde $P < .05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir. Çoklu grup karşılaştırmaları için post-hoc testlerinde Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Ardından DMF tedavisine bağlı olarak ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin hastaların naif oldukları dönem (0A), DMF tedavisinin 3. ayında (3A) ve tedavinin 6. ayında (6A) oluşturdukları gruplar arasında REL değerlerindeki değişim araştırılmıştır. Sonrasında ise 0A, 3A ve 6A grupları arasında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişim EDSS puanlarına göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmıştır. M grubunu oluşturan RRMS hastaları; 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre $EDSS \leq 1.5$ olanlar ve > 1.5 olanlar olacak şekilde kategorize edilmiş ve REL değerlerindeki değişim bu iki grup arasında Mann-Whitney U test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Mann Whitney U testlerinden elde edilen P değerlerinin $< .05$ olduğu durumlarda test sonucu istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4.1 Kontrol Grubu ve 0A Grubu Arasında Rölatif Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

K grubu ve 0A grubu (naif RRMS hastaları) arasında *ATF4*, *ATF6*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CHOP*, *PERK*, *eIF2 α* , *IRE1* ve *GRP78* genlerinin REL analizlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5'te ve Şekil 3.2'de sunulmuştur. Şekil 3.2 ve Çizelge 3.5 incelendiğinde 0A grubu ve kontrol grubu arasında ER stres (*ATF4*: $P=.785$, *ATF6*: $P=.453$, *CHOP*: $P=.237$, *PERK*: $P=.312$, *eIF2 α* : $P=.649$, *IRE1*: $P=.590$, *GRP78*: $P=.609$) ve apoptoz belirteci (*BAX*: $P=.215$, *BCL2*: $P=.629$, *CASP3*: $P=.701$) genlerin REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

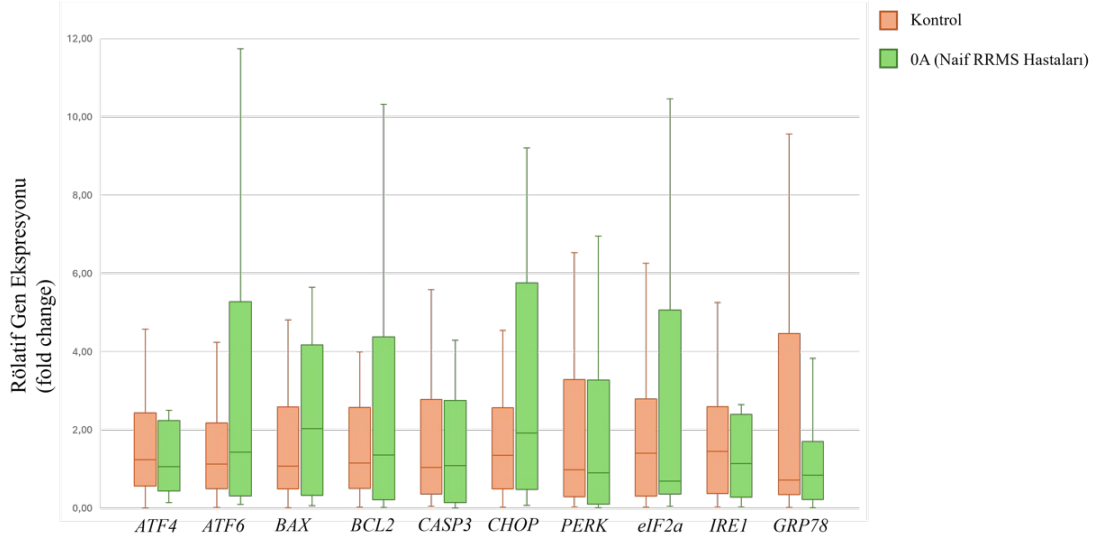
3.4.2 ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin 0A, 3A ve 6A Gruplarında Rölatif Ekspresyon Seviyeleri

M grubunu oluşturan 0A (naif RRMS), 3A ve 6A gruplarındaki hastaların nötrofillerindeki ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri belirlenmiş ve DMF kullanımına bağlı olarak meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla gruplar

arası karşılaştırma analizi yapılmıştır. 20 RRMS hastasından oluşan M grubunun, hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) oluşturulan gruplarının birbirleriyle bağımlı olma durumu göz önünde bulundurularak gruplar arasında gerçekleştirilen karşılaştırma analizleri Friedman testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonucunda elde edilen *P* değerleri, *P*<.05 koşulu sağlandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. *P*<.05 olarak sonuçlanan Friedman testlerinde istatistiksel anlamlılığın hangi gruplar arasında oluştuğunu görmek için post-hoc analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.5: ER stres genleri ve apoptotik genlerin REL değerlerinin DMF tedavisi öncesi RRMS’li hastalar (0A grubu) ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması

	Kontrol n=60	0A n=20	<i>P</i>
<i>ATF4</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.28 ± 3.76 1.24 (0.56-2.43)	4.00 ± 11.43 1.06 (0.50-2.22)	.785
<i>ATF6</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.16 ± 3.27 1.12 (0.50-2.18)	7.46 ± 19.11 1.44 (0.33-4.68)	.453
<i>BAX</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.29 ± 4.04 1.08 (0.51-2.51)	22.17 ± 79.07 2.03 (0.38-4.15)	.215
<i>BCL2</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.82 ± 5.63 1.15 (0.52-2.57)	5.20 ± 11.76 1.36 (0.25-4.14)	.629
<i>CASP3</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.50 ± 3.79 1.04 (0.40-2.76)	5.71 ± 17.49 1.09 (0.16-2.68)	.701
<i>CHOP</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	1.66 ± 1.40 1.36 (0.50-2.52)	5.70 ± 12.05 1.92 (0.49-5.27)	.237
<i>PERK</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	3.16 ± 5.37 0.99 (0.31-3.15)	4.00 ± 11.13 0.90 (0.10-2.74)	.312
<i>eIF2α</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.26 ± 3.12 1.41 (0.31-2.78)	6.57 ± 18.63 0.69 (0.37-4.80)	.649
<i>IRE1</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.03 ± 2.62 1.46 (0.38-2.54)	3.60 ± 7.69 1.14 (0.29-2.35)	.590
<i>GRP78</i> Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	4.57 ± 9.30 0.72 (0.35-3.90)	2.28 ± 4.11 0.84 (0.26-1.69)	.609
<i>P</i> değerleri Mann-Whitney <i>U</i> test ile elde edilmiştir. Her bir gen için verilen REL değerleri ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma.			



Şekil 3.2: ER stres genleri ve apoptotik genlerin REL değerlerinin DMF tedavisi öncesi RRMS’li hastaların (0A grubu) ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması

ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri üzerinden hesaplanarak elde edilen sonuçlar, her bir grup için (0A, 3A ve 6A) ortalama, standart sapma, medyan ve birinci çeyrek (first quartile-Q1) ve üçüncü çeyrek (third quartile-Q3) olacak şekilde tanımlayıcı istatistik değerleriyle beraber Çizelge 3.6’da sunulmuştur. Çizelge 3.6’da verilen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerden elde edilen değerler kullanılarak oluşturulmuş kutu grafiği ise Şekil 3.3’te gösterilmiştir.

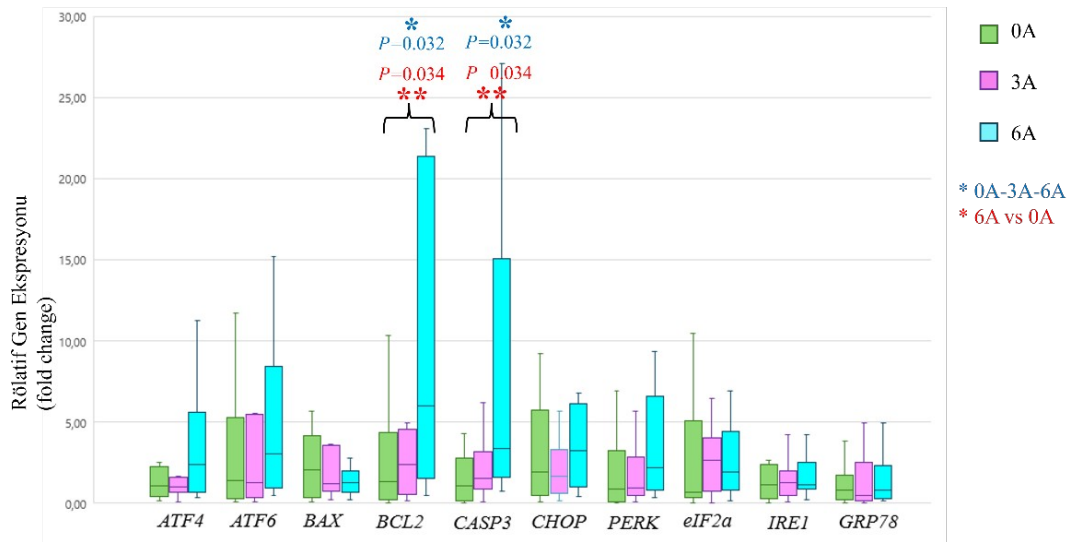
Yapılan analizler sonucunda ER stres belirteci olan genlerin REL değerlerinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark olmadığı görülmektedir (*ATF4*: $P=.204$, *ATF6*: $P=.238$, *CHOP*: $P=.698$, *PERK*: $P=.135$, *eIF2α*: $P=.837$, *IRE1*: $P=.341$, *GRP78*: $P=.540$) (Çizelge 3.6, Şekil 3.3). 0A, 3A ve 6A

grupları arasında, apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimin Friedman testi kullanılarak araştırıldığı karşılaştırmalarda; *BCL2* ve *CASP3* genleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($P=.032$) (Çizelge 3.6, Şekil 3.3). Friedman testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan farkın hangi gruplar arasındaki REL değeri değişiminden kaynaklandığını belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testlerinde, *BCL2* ve *CASP3* genleri için 6A grubunda 0A grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (*BCL2*: $P=.034$, *CASP3*: $P=.034$) (Çizelge 3.6, Şekil 3.3). Görülen bu artışa bağlı olarak Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinin belirlenmesi amacıyla WB deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

	0A n=20	3A n=20	6A n=20	P
ATF4 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	4.00 $\pm$ 11.43 1.06 (0.50-2.22)	2.17 $\pm$ 3.01 1.02 (0.72-1.61)	3.44 $\pm$ 3.18 2.41 (0.72-5.22)	.204 ^a
ATF6 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	7.46 $\pm$ 19.11 1.44 (0.33-4.68)	5.94 $\pm$ 11.15 1.26 (0.38-5.37)	7.88 $\pm$ 12.25 3.05 (0.98-8.25)	.238 ^a
BAX Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	22.17 $\pm$ 79.07 2.03 (0.38-4.15)	7.80 $\pm$ 14.03 1.21 (0.74-3.57)	1.62 $\pm$ 1.29 1.29 (0.71-1.98)	.277 ^a
BCL2 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	5.20 $\pm$ 11.76 1.36 (0.25-4.14)	8.18 $\pm$ 15.12 2.36 (0.61-4.22)	16.50 $\pm$ 23.86 6.00 (1.73-20.22)	.032 ^a .034 ^b
CASP3 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	5.71 $\pm$ 17.49 1.09 (0.16-2.68)	4.94 $\pm$ 9.34 1.55 (0.89-2.99)	17.71 $\pm$ 34.51 3.36 (1.71-14.84)	.032 ^a .034 ^b
CHOP Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	5.70 $\pm$ 12.05 1.92 (0.49-5.27)	1.96 $\pm$ 1.56 1.69 (0.61-3.03)	3.39 $\pm$ 2.44 3.26 (1.05-6.16)	.698 ^a
PERK Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	4.00 $\pm$ 11.13 0.90 (0.10-2.74)	5.10 $\pm$ 12.97 0.98 (0.50-2.51)	5.03 $\pm$ 6.61 2.17 (0.86-6.41)	.135 ^a
eIF2α Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	6.57 $\pm$ 18.63 0.69 (0.37-4.80)	4.64 $\pm$ 8.59 2.66 (0.99-3.94)	7.29 $\pm$ 19.48 1.94 (0.80-4.36)	.857 ^a
IRE1 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	3.60 $\pm$ 7.69 1.14 (0.29-2.35)	1.55 $\pm$ 1.46 1.28 (0.49-1.97)	1.61 $\pm$ 1.13 1.12 (0.94-2.41)	.341 ^a
GRP78 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	2.28 $\pm$ 4.11 0.84 (0.26-1.69)	1.43 $\pm$ 1.74 0.46 (0.22-2.44)	2.54 $\pm$ 4.53 0.84 (0.29-2.25)	.540 ^a
Her bir gen için verilen REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak sunulmuştur. a: 0A, 3A ve 6A karşılaştırmaları Friedman testi ile yapılmıştır. b: 6A vs. 0A. Post-hoc analizleri için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma.				

Bu tez çalışması kapsamında REL değeri araştırılan apoptotik genlerden bir diğeri olan *BAX* geninin 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan REL değerlerindeki değişimin araştırıldığı analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P=.277$) (Çizelge 3.6).



Şekil 3.3: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

3.4.3 0A, 3A ve 6A Gruplarında ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Klinik Verilere Göre Değerlendirilmesi

0A, 3A ve 6A gruplarında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri hasta grubunun EDSS puanları, kontrast tutan lezyon varlığı ve atak durumu açısından değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirme için, 0A, 3A ve 6A dönemlerinde hesaplanan EDSS puanlarına göre, M grubunu oluşturan hastalar $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olacak şekilde iki alt gruba ayrılmıştır. Ardından; EDSS puanlarına bağlı bir şekilde oluşturulan bu iki grup arasında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri Mann Whitney *U* testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

ATF4 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları Çizelge 3.7 ve Şekil 3.4’te verilmiştir.

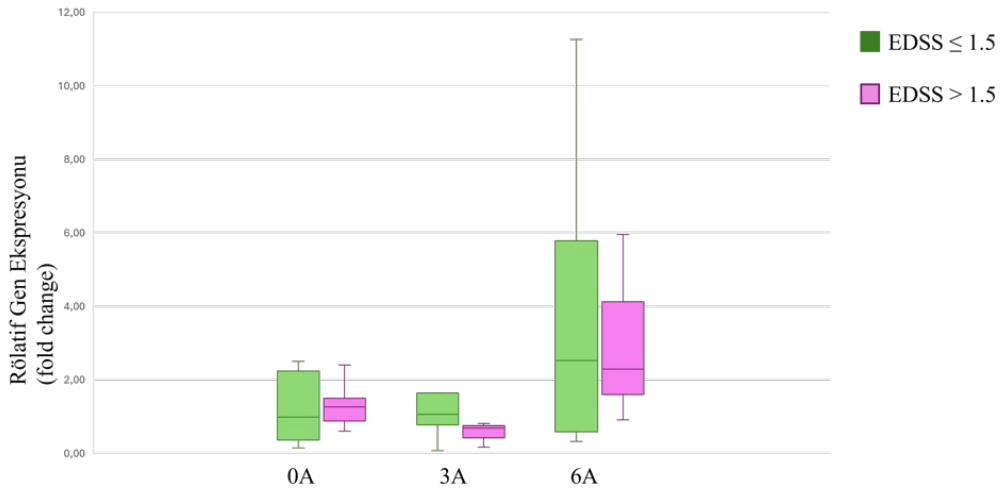
M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *ATF4* REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.680$, 3A: $P=.101$, 6A: $P=.874$) (Çizelge 3.7, Şekil 3.4).

Çizelge 3.7: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *ATF4* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>ATF4</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Grubu Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	5.15 $\pm$ 13.64 0.99 (0.35-2.26)	2.46 $\pm$ 3.18 1.06 (0.77-1.64)	3.51 $\pm$ 3.33 2.52 (0.66-4.48)
EDSS > 1.5 Grubu Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	1.31 $\pm$ 0.64 1.27 (0.80-1.52)	0.55 $\pm$ 0.34 0.68 (0.16-0.81)	3.05 $\pm$ 2.60 2.29 (0.91-5.95)
P	.680	.101	.874

P değerleri Mann-Whitney U test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının *ATF4* REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürllülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.

ATF6 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.8 ve Şekil 3.5'te verilmiştir.

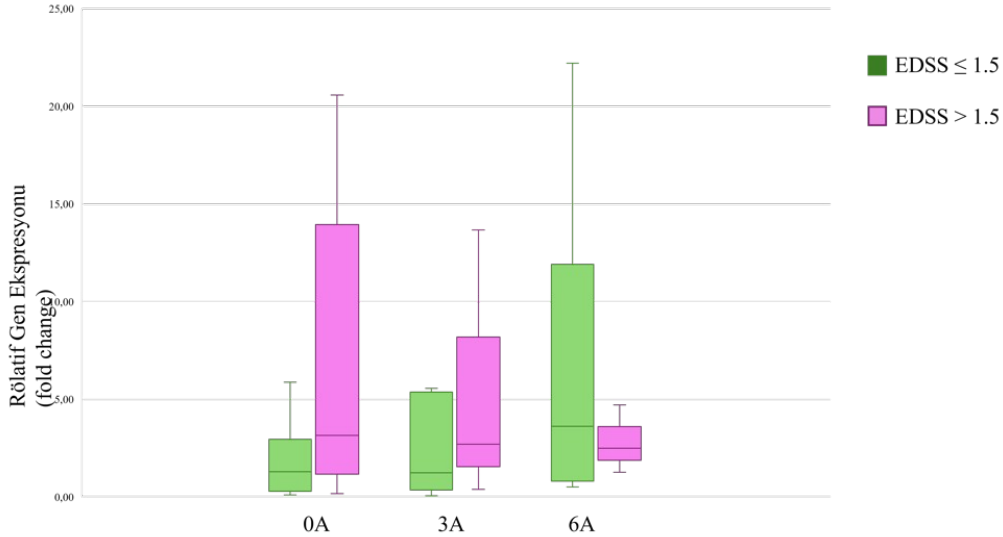


Şekil 3.4: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *ATF4* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

Çizelge 3.8: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *ATF6* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>ATF6</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	7.78 $\pm$ 22.57 1.29 (0.31-1.96)	6.00 $\pm$ 11.89 1.23 (0.37-5.18)	8.77 $\pm$ 13.12 3.61 (0.86-8.65)
EDSS >1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	6.71 $\pm$ 7.92 3.15 (1.50-11.74)	5.59 $\pm$ 7.10 2.70 (0.39-13.67)	2.81 $\pm$ 1.74 2.48 (1.26-4.70)
P	.161	.491	.791
<i>P</i> değerleri Mann-Whitney <i>U</i> test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının <i>ATF6</i> REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürllülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.			

BAX REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.9 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.5: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *ATF6* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar

arasında



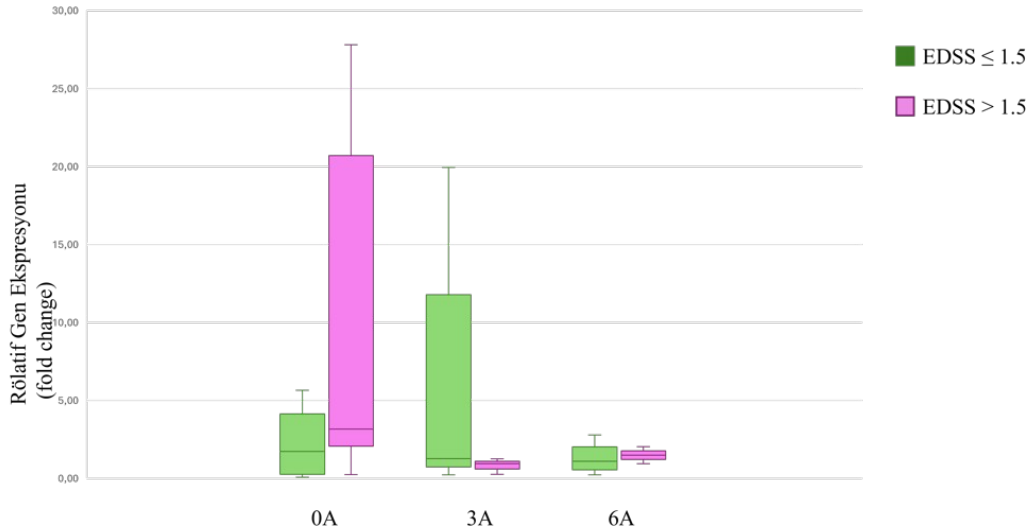
BAX REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.248$, 3A: $P=.266$, 6A: $P=.711$) (Çizelge 3.9, Şekil 3.6).

Çizelge 3.9: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *BAX REL* değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>BAX REL</i> Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	27.20 $\pm$ 94.78 1.73 (0.27-4.11)	9.03 $\pm$ 14.94 1.26 (0.77-3.62)	1.65 $\pm$ 1.83 1.10 (0.64-1.93)
EDSS >1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	10.43 $\pm$ 13.00 3.16 (1.74-26.49)	0.81 $\pm$ 0.51 0.94 (0.25-1.25)	1.48 $\pm$ 0.54 1.48 (0.94-2.02)
P	.248	.266	.711

P değerleri Mann-Whitney *U* test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının *BAX REL* değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.

BCL2 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 olmak üzere oluşturulan gruplarda karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.10 ve Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.6: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *BAX REL* değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

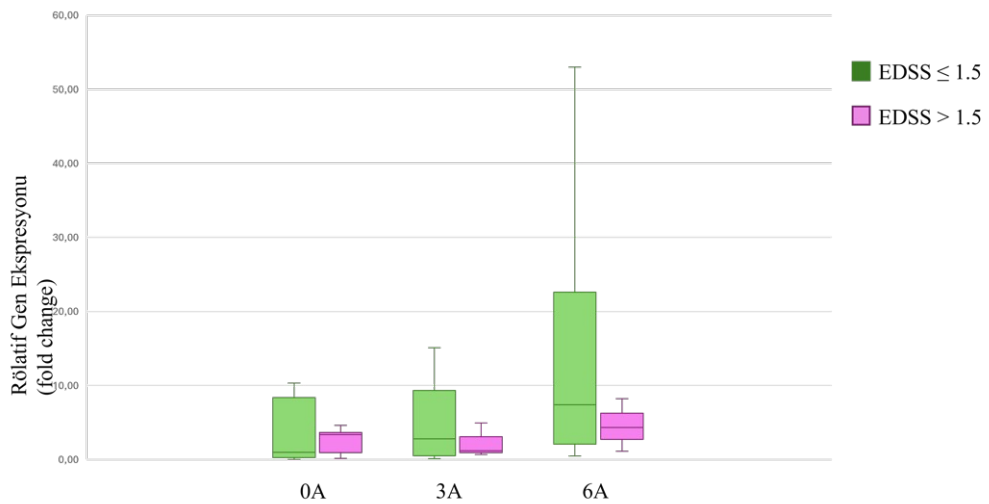
M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *BCL2* REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.741$, 3A: $P=.874$, 6A: $P=.491$) (Çizelge 3.10, Şekil 3.7).

Çizelge 3.10: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *BCL2* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

<i>BCL2</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
$EDSS \leq 1.5$ Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	6.33 $\pm$ 14.00 0.98 (0.30-8.27)	9.22 $\pm$ 16.22 2.80 (0.51-3.50)	18.61 $\pm$ 25.36 7.40 (2.10-22.59)
$EDSS > 1.5$ Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	2.56 $\pm$ 1.92 3.38 (0.19-3.65)	2.27 $\pm$ 2.33 1.17 (0.70-4.95)	4.54 $\pm$ 3.56 4.31 (1.10-8.21)
P	.741	.874	.491

P değerleri Mann-Whitney *U* test ile elde edilmiştir. $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ gruplarında yer alan RRMS hastalarının *BCL2* REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.

CASP3 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.11 ve Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.7: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *BCL2* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

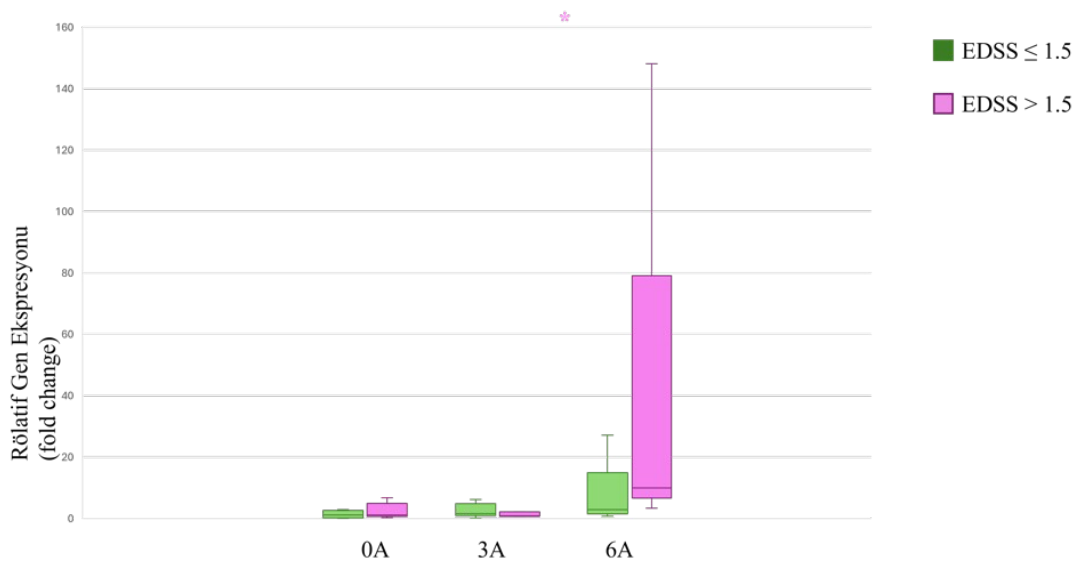
M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *CASP3* REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.483$, 3A: $P=.368$, 6A: $P=.186$) (Çizelge 3.11, Şekil 3.8).

Çizelge 3.11: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *CASP3* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

<i>CASP3</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5			
Ortalama $\pm$ SS	7.15 $\pm$ 20.91	5.59 $\pm$ 10.02	11.34 $\pm$ 17.05
Medyan (Q1-Q3)	1.12 (0.11-2.52)	1.55 (0.99-3.32)	2.89 (1.55-14.43)
(0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)			
EDSS > 1.5			
Ortalama $\pm$ SS	2.37 $\pm$ 2.58	1.21 $\pm$ 0.78	53.80 $\pm$ 81.78
Medyan (Q1-Q3)	1.09 (0.82-4.29)	0.84 (0.68-2.10)	9.92 (3.32-148.16)
(0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)			
P	.483	.368	.186

P değerleri Mann-Whitney *U* test ile elde edilmiştir. $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ gruplarında yer alan RRMS hastalarının *CASP3* REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.

CHOP REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.12 ve Şekil 3.9'da verilmiştir.

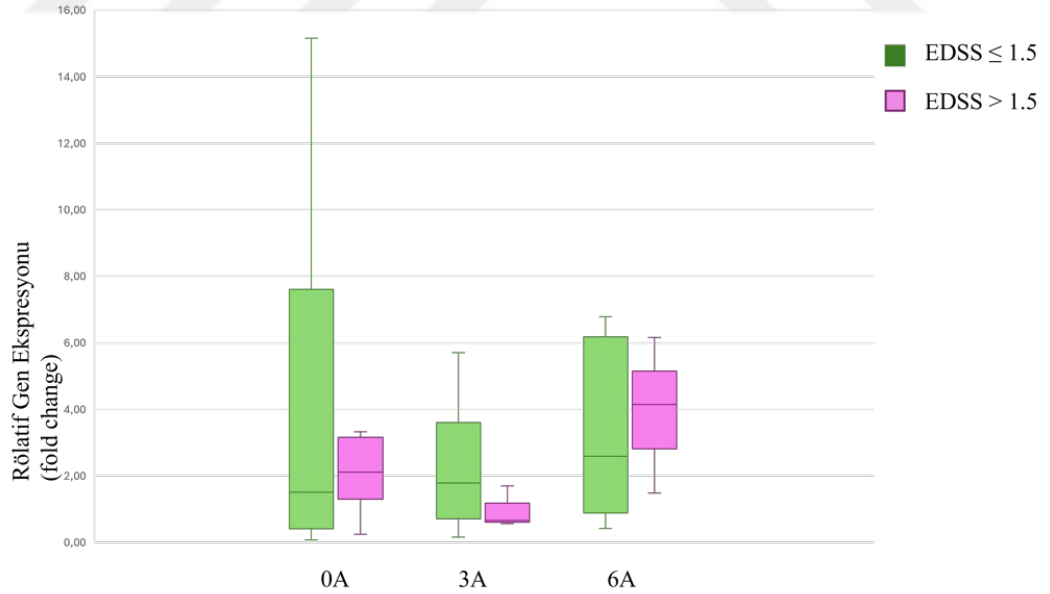


Şekil 3.8: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *CASP3* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

Çizelge 3.12: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen CHOP REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

CHOP REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	7.25 $\pm$ 14.25 1.51 (0.46-7.07)	2.13 $\pm$ 1.62 1.78 (0.90-3.54)	3.29 $\pm$ 2.52 2.59 (0.94-6.16)
EDSS > 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	2.09 $\pm$ 1.11 2.12 (1.65-3.10)	0.97 $\pm$ 0.63 0.66 (0.56-1.70)	3.93 $\pm$ 2.35 4.15 (1.48-6.16)
P	.967	.248	.596
P değerleri Mann-Whitney U test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının CHOP REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.			

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar arasında CHOP REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.967$, 3A: $P=.248$, 6A: $P=.596$) (Çizelge 3.12, Şekil 3.9).



Şekil 3.9: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen CHOP REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

PERK REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 olmak üzere

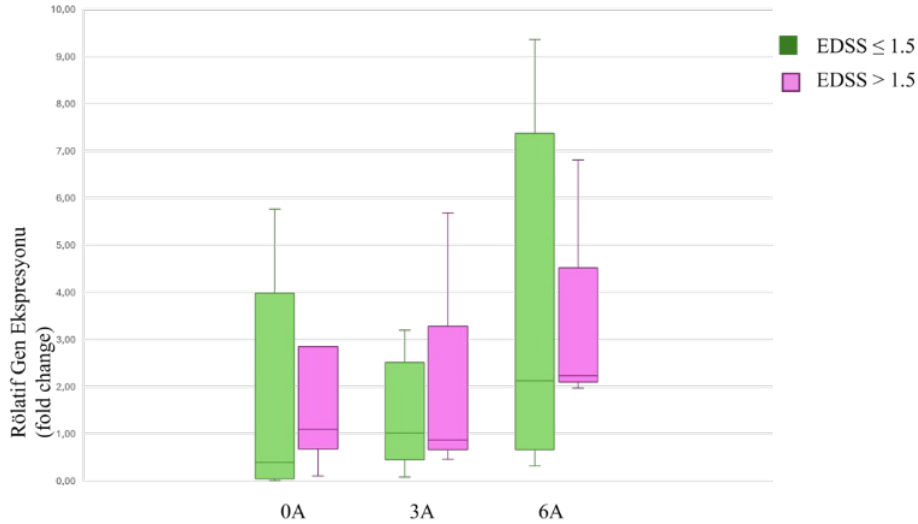
oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.13 ve Şekil 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.13: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *CHOP* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>PERK</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5			
Ortalama $\pm$ SS	4.88 $\pm$ 13.26	5.59 $\pm$ 14.04	5.27 $\pm$ 7.11
Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	0.40 (0.05-3.80)	1.02 (0.54-1.82)	2.12 (0.76-6.01)
EDSS > 1.5			
Ortalama $\pm$ SS	1.93 $\pm$ 2.50	2.34 $\pm$ 2.91	3.67 $\pm$ 2.72
Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	1.10 (0.87-1.48)	0.87 (0.46-5.69)	2.23 (1.97-6.81)
P	.386	.874	.634

0A ve 6A gruplarında P değerleri Mann-Whitney U test ile elde edilirken 3A grubunda P değeri Independent Sample t-test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının *PERK* REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürllülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *PERK REL* değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.386$, 3A: $P=.874$, 6A: $P=.634$) (Çizelge 3.13, Şekil 3.10).



Şekil 3.10: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *CHOP* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

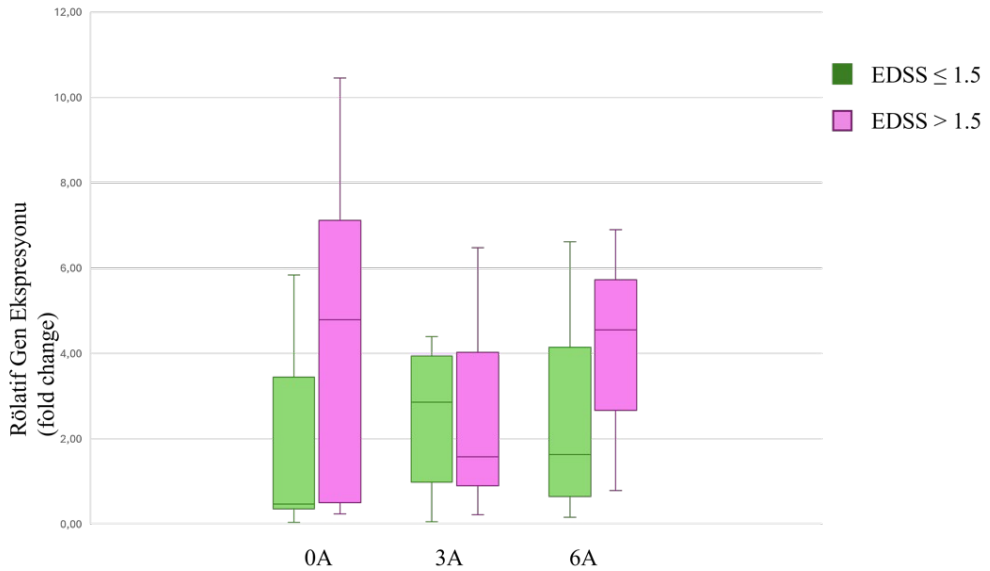
eIF2α REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 olmak üzere

oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.14 ve Şekil 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.14: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *eIF2α* REL değerlerinin EDSS ≤1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>eIF2α</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤1.5 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	7.46 ± 22.34 0.48 (0.36-3.20)	4.97 ± 9.25 2.86 (1.47-3.75)	7.86 ± 21.14 1.63 (0.80-4.13)
EDSS>1.5 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	4.48 ± 3.79 4.80 (0.59-6.01)	2.76 ± 3.29 1.58 (0.22-6.48)	4.08 ± 3.08 4.55 (0.79-6.90)
P	.137	.711	.427
<i>P</i> değerleri Mann-Whitney <i>U</i> test ile elde edilmiştir. EDSS ≤1.5 ve EDSS>1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının <i>eIF2α</i> REL değerleri ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.			

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, EDSS≤1.5 ve EDSS>1.5 olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *eIF2α* REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: *P*=.137, 3A: *P*=.711, 6A: *P*=.427) (Çizelge 3.14).



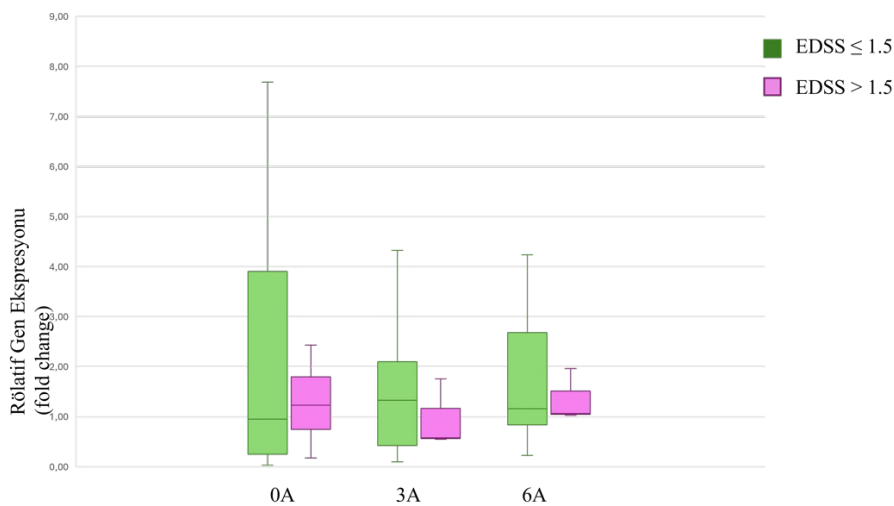
Şekil 3.11: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *eIF2α* REL değerlerinin EDSS ≤1.5 ve EDSS >1.5 grupları arasında karşılaştırılması

IRE1 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.15 ve Şekil 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.15: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *IRE1* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

<i>IRE1</i> REL Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	4.60 $\pm$ 9.09 0.96 (0.29-2.65)	1.65 $\pm$ 1.55 1.33 (0.45-1.99)	1.66 $\pm$ 1.21 1.16 (0.88-2.61)
EDSS > 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	1.27 $\pm$ 0.74 1.23 (0.94-1.58)	0.96 $\pm$ 0.69 0.58 (0.55-1.76)	1.35 $\pm$ 0.53 1.07 (1.03-1.96)
P	.869	.751	.958
P değerleri Mann-Whitney U test ile elde edilmiştir. $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ gruplarında yer alan RRMS hastalarının <i>IRE1</i> REL değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.			

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *IRE1* REL değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.869$, 3A: $P=.751$, 6A: $P=.958$) (Çizelge 3.15, Şekil 3.12).



Şekil 3.12: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *IRE1* REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında karşılaştırılması

GRP78 REL değerlerinin, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmasına ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.16 ve Şekil 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.16: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *GRP78 REL* değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

<i>GRP78 REL</i> Değerleri	0A n=20	3A n=20	6A n=20
EDSS ≤ 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=14, 3A n=17, 6A n=17)	2.36 $\pm$ 4.56 0.73 (0.17-1.71)	1.38 $\pm$ 1.65 0.52 (0.27-2.31)	2.06 $\pm$ 3.83 0.84 (0.27-2.10)
EDSS > 1.5 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3) (0A n=6, 3A n=3, 6A n=3)	2.12 $\pm$ 3.19 0.84 (0.60-1.67)	1.71 $\pm$ 2.63 0.29 (0.10-4.75)	5.30 $\pm$ 8.04 0.83 (0.49-14.59)
P	.620	.874	.634
<i>P</i> değerleri Mann-Whitney <i>U</i> test ile elde edilmiştir. EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 gruplarında yer alan RRMS hastalarının <i>GRP78 REL</i> değerleri ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, EDSS: genişletilmiş özürölülük durum ölçeği (expanded disability status scale), SS: standart sapma.			

M grubunda yer alan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen EDSS puanlarına göre, $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere oluşturulan gruplar arasında *GRP78 REL* değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (0A: $P=.620$, 3A: $P=.874$, 6A: $P=.634$) (Çizelge 3.16, Şekil 3.13).

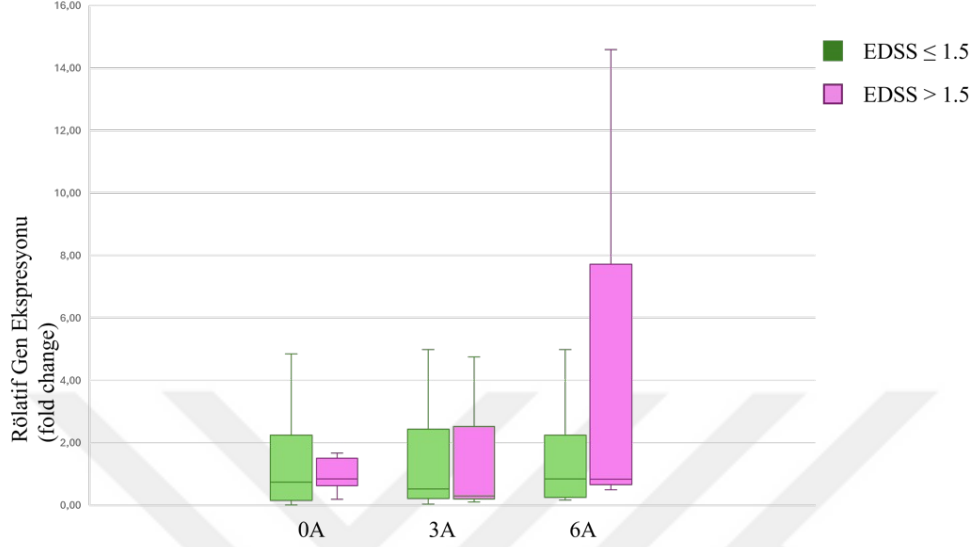
EDSS puanlarının, bu tez çalışması kapsamında araştırılan ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri üzerindeki etkisinin araştırılmasına ek olarak, kontrast tutan lezyonların da hedef genlerin REL değerleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17 incelendiğinde naif RRMS hastalarının oluşturduğu 0A grubunda kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı görülmüştür (*ATF4*: $P=.131$, *ATF6*: $P=.508$, *BAX*: $P=.508$, *BCL2*: $P=.131$, *CASP3*: $P>.999$, *CHOP*: $P=.237$, *PERK*: $P=.108$, *eIF2 α* : $P=.478$, *IRE1*: $P=.395$, *GRP78*: $P=.478$).

3A grubunda da kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde istatistiksel anlamda herhangi bir fark



görülmemiştir (*ATF4*: $P=.098$, *ATF6*: $P=.508$, *BAX*: $P=.257$, *BCL2*: $P=.925$, *CASP3*: $P=.539$, *CHOP*: $P=.848$, *PERK*: $P=.705$, *eIF2 α* : $P=.925$, *IRE1*: $P=.813$, *GRP78*: $P=.508$).



Şekil 3.13: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen *GRP78* REL değerlerinin EDSS ≤ 1.5 ve EDSS > 1.5 grupları arasında karşılaştırılması

6A grubunda yapılan değerlendirmelerde ise, kontrast tutan lezyon olan kişilerde kontrast tutan lezyonu olmayanlara kıyasla *eIF2 α* REL değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($P=.038$). Ancak, 6A grubunda, *eIF2 α* haricinde incelenen diğer ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde, kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*ATF4*: $P=.156$, *ATF6*: $P=.108$, *BAX*: $P=.395$, *BCL2*: $P=.131$, *CASP3*: $P=.777$, *CHOP*: $P=.850$, *PERK*: $P=.705$, *IRE1*: $P>.999$, *GRP78*: $P=.130$.)

Bu tez çalışması kapsamında 6 ay süreyle takip edilen RRMS hastalarından yalnızca birinde atak gözlenmiştir. M grubunu oluşturan RRMS hastalarının atak geçirenler ve geçirmeyenler olarak gruplandırılması sonrası ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri ise Çizelge 3.18'de görülmektedir.

3.5 Western Blot Yöntemiyle Bcl2 ve Kaspaz-3 Proteinlerinin Rölatif Ekspresyon Seviyesinin 0A, 3A ve 6A Gruplarında Belirlenmesi

M grubuna ait her bir örnek için Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinde görülen REL değişimini incelemek üzere WB deneyleri yapılmıştır.

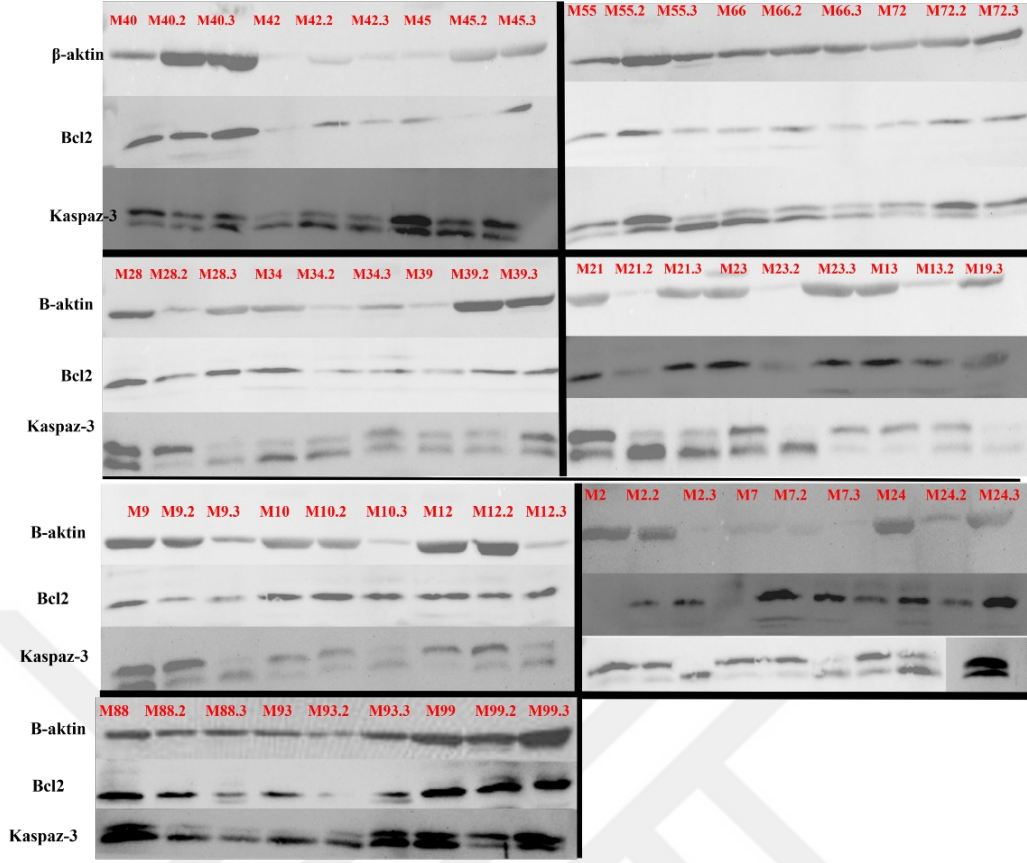
Çizelge 3.17: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında karşılaştırılması

	0A (Naif RRMS Hastaları)		3A		6A		
	Kontrast Tutan Lezyon Var n=4	Kontrast Tutan Lezyon Yok n=16	Kontrast Tutan Lezyon Var n=4	Kontrast Tutan Lezyon Yok n=16	Kontrast Tutan Lezyon Var n=4	Kontrast Tutan Lezyon Yok n=16	P
ATF4 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	0.64 ± 0.48 0.65 (0.24-1.06)	4.83 ± 12.72 1.46 (0.70-2.33)	3.22 ± 3.75 1.49 (1.23-5.21)	1.91 ± 2.88 0.81 (0.54-1.52)	5.08 ± 3.08 5.58 (2.64-7.52)	3.03 ± 3.16 2.28 (0.59-4.17)	.131 ^{a*} .098 ^{b*} .156 ^{c*}
ATF6 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	1.30 ± 1.25 1.07 (0.28-2.32)	9.00 ± 21.21 1.44 (0.53-6.73)	5.44 ± 9.90 0.56 (0.36-10.52)	6.06 ± 11.74 1.51 (0.66-5.37)	1.67 ± 1.39 1.30 (0.68-2.67)	9.43 ± 13.29 5.11 (1.18-11.91)	.508 ^{a*} .508 ^{b*} .108 ^{c*}
BAX Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	7.19 ± 12.88 1.02 (0.36-14.02)	25.92 ± 88.39 2.46 (0.62-4.15)	6.49 ± 9.03 2.45 (1.25-11.73)	8.13 ± 15.25 1.06 (0.53-2.86)	1.70 ± 1.06 1.87 (0.96-2.44)	1.61 ± 1.84 1.04 (0.71-1.92)	.508 ^{a*} .257 ^{b*} .395 ^{c*}
BCL2 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	1.02 ± 1.40 1.48 (0.08-1.97)	6.24 ± 13.00 2.40 (0.34-6.45)	15.23 ± 27.75 2.01 (0.32-30.15)	6.41 ± 10.91 2.36 (0.82-4.12)	35.66 ± 29.15 37.79 (11.98-59.34)	11.71 ± 20.71 4.45 (1.60-13.38)	.131 ^{a*} .925 ^{b*} .131 ^{c*}
CASP3 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	2.43 ± 3.15 1.48 (0.08-4.78)	6.53 ± 19.55 1.09 (0.20-2.40)	5.14 ± 7.26 1.81 (1.24-9.04)	4.89 ± 9.99 1.32 (0.76-2.99)	9.52 ± 12.11 4.75 (1.52-17.53)	19.76 ± 38.16 3.36 (1.89-14.84)	>.999 ^{a*} .539 ^{b*} .777 ^{c*}
CHOP Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	1.14 ± 0.91 1.14 (0.35-1.92)	6.84 ± 13.29 2.66 (0.66-6.66)	1.82 ± 1.43 1.73 (0.91-2.72)	1.99 ± 1.64 1.48 (0.61-3.03)	2.91 ± 2.68 2.13 (1.16-4.67)	3.51 ± 2.46 4.01 (1.05-6.16)	.237 ^{a*} .848 ^{b*} .850 ^{c*}
PERK Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	3.85 ± 2.82 4.16 (1.97-5.74)	4.03 ± 12.46 0.69 (0.08-1.33)	4.46 ± 7.76 0.83 (0.36-8.55)	5.26 ± 14.18 1.01 (0.50-2.51)	4.34 ± 3.69 3.82 (1.30-7.38)	5.20 ± 7.24 2.17 (0.67-5.80)	.108 ^{a*} .705 ^{b*} .705 ^{c*}
eIF2α Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	0.57 ± 0.17 0.57 (0.46-0.69)	8.07 ± 20.68 3.18 (0.37-5.59)	11.34 ± 18.87 2.86 (1.18-21.50)	2.97 ± 2.72 2.66 (0.99-3.94)	0.82 ± 0.66 0.75 (0.29-1.35)	8.91 ± 21.60 3.59 (1.02-5.59)	.478 ^{a*} .925 ^{b*} .038 ^{c*}
IRE1 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	0.72 ± 0.49 0.70 (0.31-1.14)	4.32 ± 8.49 1.42 (0.24-2.54)	1.68 ± 1.86 1.20 (0.29-3.08)	1.52 ± 1.41 1.28 (0.54-1.97)	2.01 ± 1.84 1.78 (0.52-3.50)	1.51 ± 0.94 1.12 (1.02-2.09)	.395 ^{a*} .813 ^{b*} >.999 ^{c*}
GRP78 Ortalama ± SS Medyan (Q1-Q3)	0.67 ± 0.58 0.56 (0.27-1.08)	2.69 ± 4.52 1.02 (0.26-2.77)	0.72 ± 0.83 0.46 (0.17-1.27)	1.61 ± 1.88 0.46 (0.22-3.13)	0.62 ± 0.56 0.51 (0.18-1.07)	3.02 ± 4.97 0.88 (0.40-2.53)	.478 ^{a*} .508 ^{b*} .130 ^{c*}
Her bir gen için verilen REL değerlerinde ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma. a:0A, b: 3A, c:6A grubu içerisinde oluşturulan kontrast tutan lezyon var ve yok olmak üzere oluşturulan gruplar arasında yapılan analizlerden elde edilen P değerleri. *: Mann Whitney U test. +: Independent sample t-test.							

Çizelge 3.18: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin atak öyküsüne bağlı olarak oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılması

	0A		3A		6A	
	Atak Var* n=1	Atak Yok n=19	Atak Var* n=1	Atak Yok n=19	Atak Var* n=1	Atak Yok n=19
ATF4 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	2.40	4.08 $\pm$ 11.74 1.00 (0.39-2.18)	0.81	2.24 $\pm$ 3.07 1.05 (0.68-1.64)	2.29	3.50 $\pm$ 3.25 2.52 (0.66-5.95)
ATF6 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	3.49	7.67 $\pm$ 19.61 1.37 (0.31-5.87)	2.70	6.11 $\pm$ 11.43 1.23 (0.37-5.55)	4.70	8.05 $\pm$ 12.56 2.48 (0.86-8.65)
BAX Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	3.03	23.18 $\pm$ 81.11 1.89 (0.27-4.19)	0.94	8.16 $\pm$ 14.32 1.25 (0.71-3.62)	1.48	1.63 $\pm$ 1.73 1.10 (0.64-2.02)
BCL2 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	3.65	5.28 $\pm$ 12.08 1.08 (0.19-4.62)	4.95	8.35 $\pm$ 15.51 1.93 (0.51-3.50)	8.21	16.93 $\pm$ 24.43 4.59 (1.36-22.59)
CASP3 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	1.29	5.94 $\pm$ 17.94 0.88 (0.12-2.83)	0.68	5.16 $\pm$ 9.54 1.55 (0.93-3.32)	9.92	18.12 $\pm$ 35.40 3.32 (1.55-15.25)
CHOP Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	1.65	5.91 $\pm$ 12.394 2.02 (0.46-6.24)	0.56	2.03 $\pm$ 1.57 1.70 (0.66-3.54)	4.15	3.35 $\pm$ 2.50 2.59 (0.94-6.16)
PERK Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	0.87	4.16 $\pm$ 11.41 0.93 (0.10-3.80)	5.69	5.07 $\pm$ 13.33 0.93 (0.46-1.82)	6.81	4.93 $\pm$ 6.77 2.12 (0.76-6.01)
eIF2α Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	5.34	6.63 $\pm$ 19.14 0.59 (0.36-4.25)	6.48	4.55 $\pm$ 8.82 2.46 (0.50-3.75)	4.55	7.44 $\pm$ 20.00 1.63 (0.79-4.16)
IRE1 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	1.58	3.71 $\pm$ 7.89 1.07 (0.28-2.43)	0.58	1.60 $\pm$ 1.48 1.33 (0.45-1.99)	1.03	1.64 $\pm$ 1.15 1.16 (0.88-2.61)
GRP78 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	8.56	1.95 $\pm$ 3.94 0.68 (0.19-1.67)	0.29	1.49 $\pm$ 1.77 0.52 (0.16-2.56)	14.5	1.91 $\pm$ 3.63 0.83 (0.27-2.10)
*: Atak durumunda bulunan RRMS hastasının 0A, 3A ve 6A dönemlerindeki rölatif gen ekspresyon (fold change) değeri sunulmuştur. Her bir gen için verilen REL değerlerinde ilk satırda ortalama $\pm$ SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) değer aralığı olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma.						

Bu WB deneylerinden elde edilen membran görüntüleri Image J 1.54i programı kullanılarak analiz edilmiş ve densitometrik değerler elde edilmiştir. Normalizasyon aşamasında kullanılmak üzere B-aktin proteinleri de incelenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: M grubu örneklerinin tamamı için Bcl2, Kaspaz-3 ve B-aktin proteinlerine ait Western blot (WB) yöntemiyle elde edilen membranlara ait görüntüler

Şekil 3.14 incelendiğinde B-aktin bant yoğunluğunun M (RRMS) grubu örneklerinin tamamı için farklılık gösterdiği görülmektedir. Yapılan literatür incelemelerinde çeşitli faktörler sebebiyle B-aktin proteininin ifade seviyesinde değişimler görülebildiği belirlenmiştir. Başlıca; yaş, post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) ve nöropatolojik koşullar olmak üzere sıralanan bu çeşitli faktörler, WB deneylerinde normalizasyon aşamasında B-aktin proteini kullanımının limitleyici sebepleri olarak belirtilmektedir (Yu vd., 2011; Shen, 2013; Dziedzic vd., 2024).

Western blot (WB) deneylerinin normalizasyonunda B-aktin proteinine bağlı sınırlamalardan kaçınmak amacıyla, bu tez çalışması kapsamında hedef proteinlerin REL değişimlerini incelemek için gerçekleştirilen WB deneylerinin normalizasyon aşamasında, M grubu örneklerinin tamamı için her bir örneğin total protein lizatlarına ait bütünleştirilmiş bant yoğunluklarının kullanılması tercih edilmiştir.

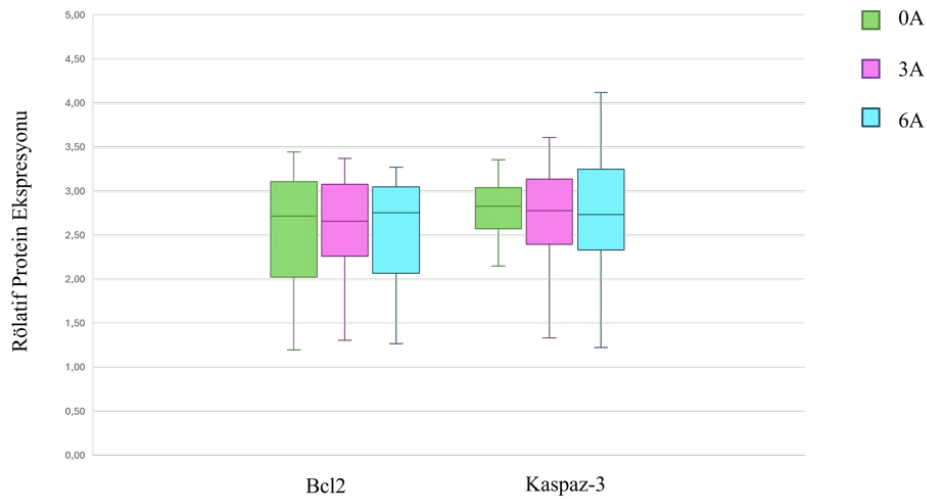
Her bir örneğe ait total protein lizatlarını içeren membranlar ve bu membranların görüntüleri bu tez çalışmasının materyal-metot bölümü 2.4 numaralı ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Proteinlerin Rölatif İfade Seviyesi isimli başlığında da açıklandığı

gibi elde edilmiştir. Ardından her bir örneğin total protein lizatlarına ait bütünleşmiş bant yoğunlukları Image J programı üzerinden hesaplanmıştır. WB deneylerinden elde edilen membran görüntüleri EK-6'da sunulmuştur. Normalizasyon sonrasında elde edilen %Bcl2 ve %Kaspaz-3 değerleri kullanılarak hedef proteinlerin REL değerlerindeki değişim hesaplanmıştır (Çizelge 3.19, Şekil 3.15).

Çizelge 3.19: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) elde edilen total protein lizatlarının normalizasyon aşamasında kullanıldığı WB deneylerinden elde edilen Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait densitometrik analiz sonuçları

Densitometrik Analiz	0A n=20	3A n=20	6A n=20	P
Bcl2 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	4.87 $\pm$ 7.55 2.72 (1.98-3.11)	3.75 $\pm$ 5.12 2.66 (2.26-3.09)	4.08 $\pm$ 5.09 2.75 (2.05-3.11)	.915
Kaspaz-3 Ortalama $\pm$ SS Medyan (Q1-Q3)	22.25 $\pm$ 65.36 2.83 (2.57-3.10)	10.79 $\pm$ 25.52 2.78 (3.34-3.15)	15.89 $\pm$ 49.04 2.74 (2.32-3.26)	.462
P değerleri Friedman testi uygulanarak elde edilmiştir. Her iki protein için verilen değerlerde ilk satırda ortalama $\pm$ SS ve ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak sunulmuştur. n= grup içerisindeki birey sayısı, SS: standart sapma				

Çizelge 3.19 incelendiğinde, M grubunu oluşturan RRMS'li hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında oluşturulan grupları arasında Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark olmadığı (Bcl2: $P=.915$, Kaspaz-3: $P=.462$) görülmektedir (Çizelge 3.19, Şekil 3.15).



Şekil 3.15: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) elde edilen total protein lizatlarının normalizasyon aşamasında kullanıldığı WB deneylerinden elde edilen Bcl2 ve

Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait densitometrik analiz sonuçları



3.6 M Grubunda Yapılan Korelasyon Analizleri

M grubunu oluşturan 0A, 3A ve 6A gruplarında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleriyle klinik parametrelerin arasındaki ilişki korelasyon analizleri ile incelenmiştir.

3.6.1 Basit Korelasyon Analizleri

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplarının her birinde ER stresi ve apoptoz belirteci olan genlerin yapılan qRT-PCR deneylerinden elde edilen REL değerleri, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin WB deneyleri sonrası elde edilen REL değerleriyle birlikte klinikten gelen EDSS, total lezyon ve T2 lezyon parametreleri ile ilişkisi incelenmiştir. Bu ilişkinin belirlenmesinde öncelikle verilerin dağılımı dikkate alınmış, normal dağılım gösteren parametrelerde Pearson korelasyon testi uygulanmış ve Pearson korelasyon katsayısı (r) hesaplanmıştır.

Normal dağılmayan verilerde ise Spearman korelasyon testi uygulanıp bu veriler için Spearman korelasyon katsayısı (ρ) hesaplanmıştır. 0A ve 6A gruplarının kendi içinde yapılan korelasyon analizlerinde verilerin dağılımının normal olmadığı görülerek Spearman korelasyon testi seçilerek Spearman korelasyon katsayısı (ρ) hesaplatılmıştır. 3A grubunda ise yalnızca *CHOP* geni REL değerleri ve total lezyon sayısı verilerinin normal dağıldığı görülerek bu iki parametrenin birbiriyle ilişkisinin değerlendirilmesinde Pearson korelasyon katsayısı (r) hesaplanırken diğer ER stresi ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değerleri, Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleriyle EDSS puanı, total lezyon ve T2 lezyon sayıları olmak üzere klinik parametrelerin ilişkisinin bir arada değerlendirilmesi için Spearman korelasyon katsayısı (ρ) hesaplanmıştır. 0A, 3A ve 6A grupları için gerçekleştirilen korelasyon testlerine ait olan ve istatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar, bir özet halinde, sırasıyla Çizelge 3.20, Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22'de sunulmuştur. Gerçekleştirilen korelasyon testlerinden elde edilen tüm sonuçlar ise EK-7'de sunulmuştur. KPY tepkisinin başlatılması ve sonlanmamasına bağlı olarak gelişen ER stres ve bu stresin belirteci olan genlerin, yer aldıkları sinyal yolağı içerisinde apoptoz belirteci genleri de etkilediği bu tez çalışmasının giriş bölümünde yer alan 1.3.5 numaralı ER ve ER'de Gelişen Protein İşleme Süreçleri isimli başlıkta da detaylıca anlatıldığı üzere bilinmektedir.

Çizelge 3.20: 0A (Naif RRMS Hastaları) grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo

Aralarında korelasyon bulunan parametreler		Spearman korelasyon katsayısı (ρ)	<i>P</i>
<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	.725	<.001
	<i>BAX</i>	.711	<.001
	<i>BCL2</i>	.827	<.001
	<i>CASP3</i>	.730	<.001
	<i>CHOP</i>	.711	<.001
	<i>PERK</i>	.461	.041
	<i>eIF2α</i>	.661	.002
	<i>IRE1</i>	.753	<.001
<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	.747	<.001
	<i>BCL2</i>	.743	<.001
	<i>CASP3</i>	.702	.001
	<i>CHOP</i>	.718	<.001
	<i>PERK</i>	.584	.007
	<i>eIF2α</i>	.790	<.001
	<i>IRE1</i>	.735	<.001
	<i>GRP78</i>	.573	.008
<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	.541	.014
	<i>CASP3</i>	.575	.008
	<i>CHOP</i>	.582	.007
	<i>eIF2α</i>	.532*	.016
	<i>IRE1</i>	.603	.005
	<i>GRP78</i>	.467	.038
<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	.642	.002
	<i>CHOP</i>	.755	<.001
	<i>PERK</i>	.592	.006
	<i>eIF2α</i>	.859	<.001
	<i>IRE1</i>	.744	<.001
	<i>GRP78</i>	.713	<.001
<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	.617	.004
	<i>PERK</i>	.724	<.001
	<i>eIF2α</i>	.703	.001
	<i>IRE1</i>	.560	.010
	<i>Bcl2</i>	.476	.034
<i>PERK</i>	<i>eIF2α</i>	.760	<.001
	<i>IRE1</i>	.497	.026

Çizelge 3.20 (devam): 0A (Naif RRMS Hastaları) grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo

Aralarında korelasyon bulunan parametreler		Spearman korelasyon katsayısı (ρ)	<i>P</i>
<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	.512	.021
	<i>eIF2α</i>	.722	<.001
	<i>IRE1</i>	.959	<.001
	<i>GRP78</i>	.634	.003
<i>eIF2α</i>	<i>IRE1</i>	.686	<.001
	<i>GRP78</i>	.700	.001
<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	.649	.002
Total Lezyon	T2 Lezyon	.873	<.001

Korelasyon analizlerine ait veriler incelendiğinde, 0A, 3A ve 6A gruplarında beklendiği üzere ER’de görülen KPY tepkisinin başlatılmasına uygun bir şekilde ER stres belirteci genlerin REL değerleri ile apoptoz belirteci genlerin REL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.20 incelendiğinde; bu tez çalışması kapsamında oluşturulan M (RRMS) grubunun 0A grubunda ER stresi ve apoptoz süreçlerinde aktif rol alan genlerin REL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu görülmektedir. Ayrıca, 0A grubunda *CASP3* REL değerleriyle Bcl2 proteininin REL değeri arasında pozitif bir ilişki olduğu ($\rho=.476$, $P=.034$) görülmektedir. M grubunu oluşturan RRMS’li hastalara ait klinik değerlendirmeler olan total lezyon sayısı, T2 lezyon sayısı ve EDSS puanlarıyla bu tez çalışması kapsamında REL değerleri araştırılan ER stresi ve apoptoz belirteci genler Bcl2, Kaspaz-3 proteinleri arasında 0A grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon oluşmadığı görülmüştür.

3A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait veriler ise Çizelge 3.21’de sunulmuştur. Çizelge 3.21 incelendiğinde yine ER stresi ve bu stres durumuna bağlı aktif hale gelebileceği bilinen, apoptotik yollarda görev alan genlerin REL değerleri arasında görülen istatistiksel olarak anlamlı korelasyona ek olarak, 3A grubunda *IRE1* REL değeri ve Bcl2 proteininin REL değeri arasında ($\rho=-.526$, $P=.017$) negatif bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.21: Naif RRMS hastalarının 3 ay boyunca DMF kullanımı sonucunda oluşturulan 3A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo

Aralarında korelasyon bulunan parametreler		Spearman korelasyon katsayısı (ρ)	<i>P</i>
<i>ATF4</i>	<i>BAX</i>	.761	<.001
	<i>BCL2</i>	.642	.002
	<i>CASP3</i>	.600	.005
	<i>CHOP</i>	.584	.007
	<i>PERK</i>	.648	.002
	<i>eIF2α</i>	.578	.008
	<i>GRP78</i>	.502	.024
	Total Lezyon	.555	.017
<i>ATF6</i>	<i>CHOP</i>	.699	.001
	<i>GRP78</i>	.789	<.001
<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	.541	.014
	<i>CASP3</i>	.468	.037
	<i>CHOP</i>	.518	.019
	<i>PERK</i>	.552	.012
	<i>eIF2α</i>	.609	.004
	<i>GRP78</i>	.485	.030
<i>BCL2</i>	<i>CHOP</i>	.535	.015
	<i>PERK</i>	.896	<.001
	<i>eIF2α</i>	.821	<.001
	<i>GRP78</i>	.529	.016
<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	.623	.003
<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	.598	.005
	<i>GRP78</i>	.714	<.001
<i>PERK</i>	<i>eIF2α</i>	.836	<.001
	<i>GRP78</i>	.606	.005
<i>eIF2α</i>	<i>GRP78</i>	.448	.048
<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	.455	.044
	Bcl2	-.526	.017

Klinikten gelen EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı değerlendirmeleri açısından 3A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri incelendiğinde, *ATF4* REL değeriyle total lezyon parametresi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ($\rho=.555$, $P=.017$) (Çizelge 3.21).

Ancak 3A grubunda, ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri, Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleriyle EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon ilişkisi görülmemiştir.

6A grubunda yapılan korelasyon analizleri Çizelge 3.22’de sunulmuştur. Çizelge 3.22 incelendiğinde, 6A grubunda Bcl2 proteinin REL değeri ve *eIF2α* geninin REL değeri arasında negatif yönde ($\rho=-.595$, $P=.006$) bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.22: Naif RRMS hastalarının 6 ay boyunca DMF kullanımına bağlı oluşturulan 6A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerine ait istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçları içeren genel tablo

Aralarında korelasyon bulunan parametreler		Spearman korelasyon katsayısı (ρ)	<i>P</i>
<i>ATF4</i>	<i>BAX</i>	.544	.013
	<i>BCL2</i>	.741	<.001
	<i>CASP3</i>	.529	.016
	<i>CHOP</i>	.548	.012
	<i>PERK</i>	.601	.005
	Kaspaz-3	.520	.019
<i>ATF6</i>	<i>CHOP</i>	.479	.032
	<i>eIF2α</i>	.597	.005
<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	.478	.033
	<i>PERK</i>	.473	.035
	<i>eIF2α</i>	.522	.018
	<i>IRE1</i>	.574	.008
<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	.496	.026
	<i>PERK</i>	.530	.016
<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	.610	.004
	<i>PERK</i>	.641	.002
<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	.616	.004
	<i>eIF2α</i>	.634	.003
	<i>IRE1</i>	.659	.002
	<i>GRP78</i>	.547	.013
<i>PERK</i>	<i>GRP78</i>	.495	.026
<i>eIF2α</i>	<i>IRE1</i>	.578	.008
	<i>GRP78</i>	.663	.001
	Bcl2	-.595	.006

Çizelge 3.22’de sunulan sonuçlara göre, Kaspaz-3 proteinin REL değeriyle *ATF4* geninin REL değeri arasında ($p=.520$, $P=.019$) pozitif yönde bir ilişki olduğu görülmüştür. 0A, 3A ve 6A dönemleri için gerçekleştirilen basit korelasyon analizlerine ek olarak, bu tez çalışmasının boylamsal oluşuna uygun bir şekilde, M grubunu oluşturan hastaların tekrarlı ölçümlerinin aralarındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla tekrarlı ölçümler korelasyonu yapılmıştır.

3.6.2 Tekrarlı Ölçümler Korelasyonu

Tekrarlı ölçümler korelasyonu (repeated measures correlation-Rmcorr) birden çok zaman noktasında, birden fazla kez ölçülen verilerin bulunduğu bir çalışma grubunda uygulanan bir fonksiyondur (Bakdash & Marusich, 2017). Yapılan bu Rmcorr analizi sayesinde bireylerin farklı ölçüm dönemlerindeki değişimleri yansıtılarak, birden fazla ölçülen değerin ortak değişim ilişkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında; M grubunu oluşturan 20 RRMS hastası için 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değişimi, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değişimi ile EDSS, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı parametrelerinde görülen değişimin, ortak ilişkisi araştırılmıştır.

Rmcorr analizlerinin yapılması için R paket programı (versiyon 4.4.2) kullanılmış ve analizin gerçekleştirilmesini sağlayan kod EK-8’de sunulmuştur.

Her bir Rmcorr analizinden elde edilen (r) ve P değerleri Çizelge 3.23, Çizelge 3.24, Çizelge 3.25, Çizelge 3.26, Çizelge 3.27 ve Çizelge 3.28’de görülebilmektedir. Ek olarak EDSS puanlarının, T2 lezyon ve total lezyon parametrelerinin kullanıldığı Rmcorr analizlerinden elde edilen istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen grafikler sırasıyla Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20 olmak üzere sunulmuştur. Ayrıca, Rmcorr sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmeyen değerlendirmelere ait grafikler ise EK-9’da sunulmuştur.

EDSS puan değişimiyle ilişkisi incelenen tüm parametrelere dair Rmcorr analizi sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri Çizelge 3.23’de sunulmuştur. Çizelge 3.23 incelendiğinde görüldüğü üzere, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerinin bu 6 aylık süreç boyunca değişimiyle EDSS puanlarında görülen değişim arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (*ATF4*: $r=-.429$, $P=.005$, *BCL2*: $r=-.346$,

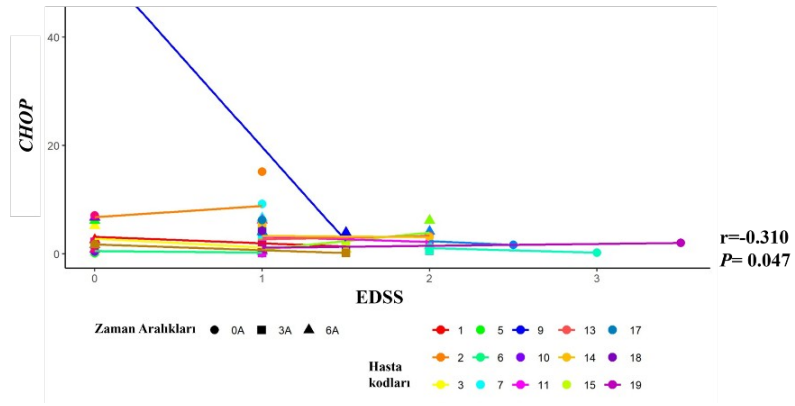
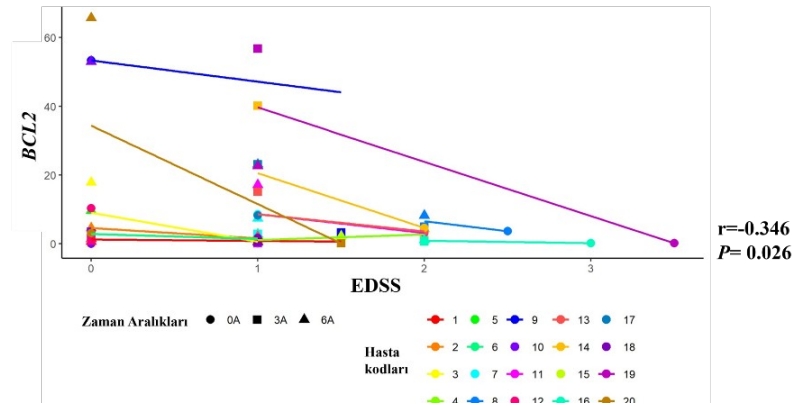
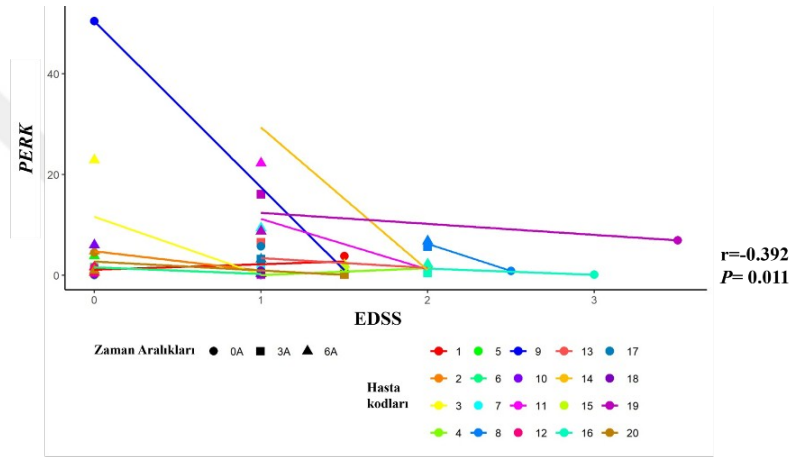
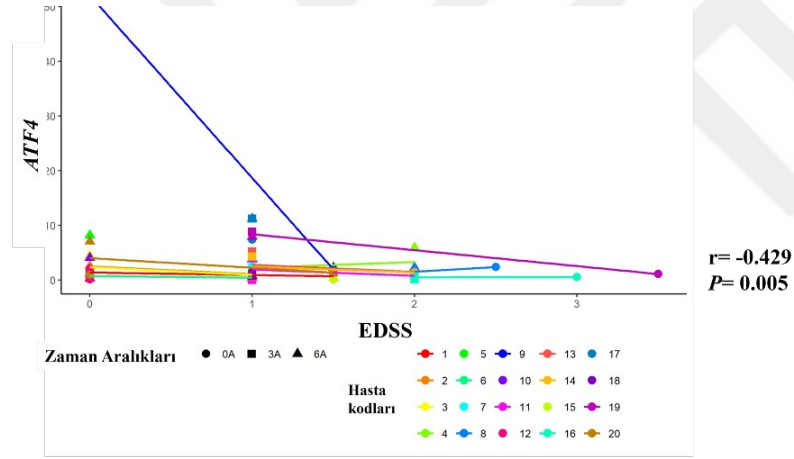
$P=.026$, *CHOP*: $r=-.310$, $P=.011$, *PERK*: $r=-.392$, $P=.011$). Ancak, *ATF6*, *BAX*, *CASP3*, *eIF2 α* , *IRE1* ve *GPR78* genlerinin REL değişimleri ve EDSS puanlarının değişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (*ATF6*: $r=-.215$, $P=.175$, *BAX*: $r=-.268$, $P=.089$, *CASP3*: $r=-.306$ $P=.051$, *eIF2 α* : $r=-.239$, $P=.131$, *IRE1*: $r=-.273$, $P=.083$, *GRP78*: $r=-.186$, $P=.241$).

Çizelge 3.23: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri

	EDSS	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P
<i>ATF4</i>	-.429	.005
<i>ATF6</i>	-.215	.175
<i>BAX</i>	-.268	.089
<i>BCL2</i>	-.346	.026
<i>CASP3</i>	-.306	.051
<i>CHOP</i>	-.310	.047
<i>PERK</i>	-.392	.011
<i>eIF2α</i>	-.239	.131
<i>IRE1</i>	-.273	.083
<i>GRP78</i>	-.186	.241

M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinde görülen REL değişimleri ve EDSS puanlarında görülen değişim arasındaki ilişkiyi anlatan grafikler Şekil 3.16’da sunulmaktadır.

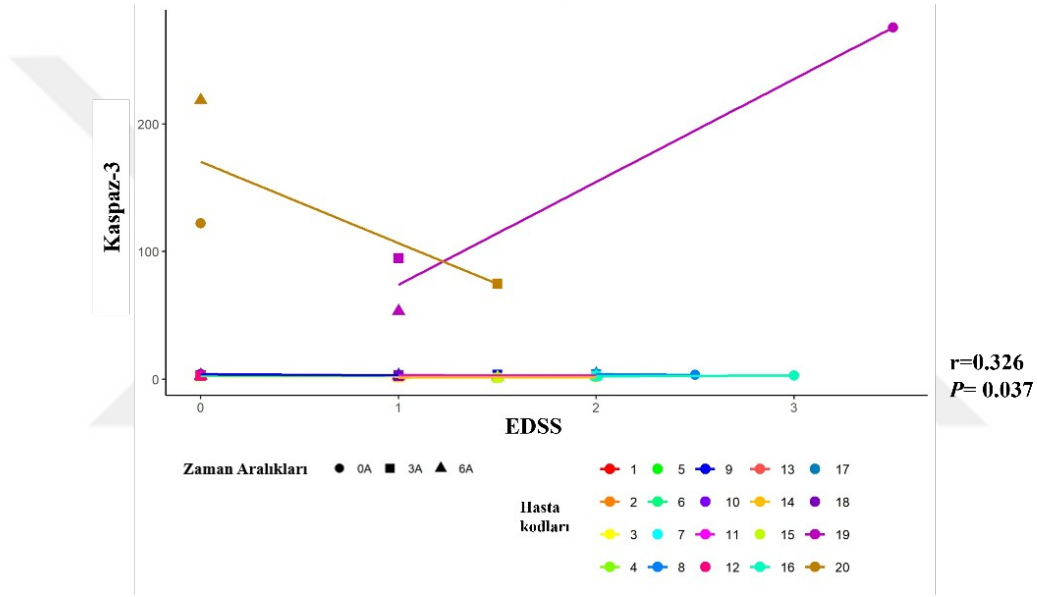
Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerine ait Rmcorr analizlerinden elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri ise Çizelge 3.24’te sunulmaktadır. Çizelge 3.24 incelendiğinde; 0A, 3A ve 6A grupları arasında Bcl2 proteininin REL değişimi ile EDSS değişimi arasında istatistiksel anlamda bir ilişkinin bulunmadığı görülürken ($r=-.024$, $P=.878$), Kaspaz-3 proteininin REL değişimi ve EDSS değişimi arasındaki ilişkinin pozitif yönde ($r=.326$, $P=.037$) olduğu görülmektedir (Şekil 3.17).



Şekil 3.16: Soldan sağa olmak üzere, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucu elde edilen grafikler

Çizelge 3.24: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri

	EDSS	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P
Bcl2	-.024	.878
Kaspaz-3	.326	.037



Şekil 3.17: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle Kaspaz-3 proteininin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik

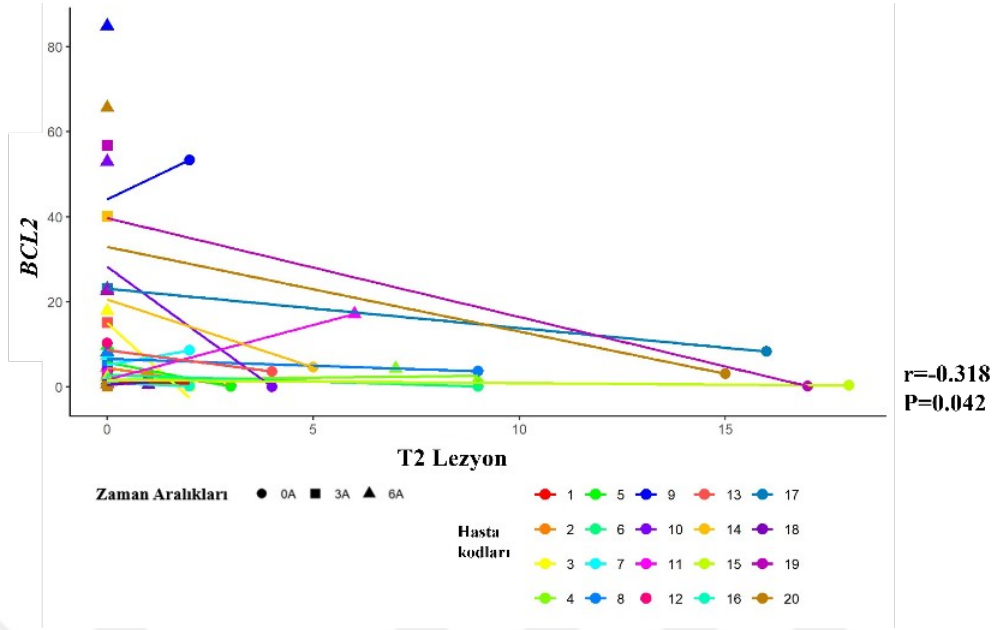
Deneysel verilerle arasındaki ilişki incelen bir diğer klinik veri T2 lezyon sayısındaki değişim olmuştur. M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında görülen T2 lezyon sayısındaki değişim ile ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan Rmcorr analizlerinden elde edilen değerler Çizelge 3.25'de sunulmuştur.

Çizelge 3.25: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri

	T2 Lezyon Sayısı	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P
<i>ATF4</i>	.069	.665
<i>ATF6</i>	-.115	.471
<i>BAX</i>	.076	.633
<i>BCL2</i>	-.318	.042
<i>CASP3</i>	.033	.833
<i>CHOP</i>	.079	.619
<i>PERK</i>	-.023	.885
<i>eIF2α</i>	-.085	.594
<i>IRE1</i>	.070	.663
<i>GRP78</i>	-.064	.689

Çizelge 3.25 incelendiğinde T2 lezyon sayısında görülen değişimin yalnızca *BCL2* geninde görülen REL değişimi ile ilişkili olduğu ve bu ilişkinin de negatif yönde olduğu görülmektedir ($r=-.318$, $P=.042$). Yapılan bu analize ait grafik Şekil 3.18’de sunulmaktadır. Ancak, 0A, 3A ve 6A grupları arasında ER stres belirteci olan genler (*ATF4*: $r=.069$, $P=.665$, *ATF6*: $r=-.115$, $P=.471$, *CHOP*: $r=.079$, $P=.619$, *PERK*: $r=-.023$, $P=.885$, *eIF2α*: $r=-.085$, $P=.594$, *IRE1*: $r=.070$, $P=.663$, *GRP78*: $r=-.064$, $P=.689$) ile apoptoz belirteci olan *BAX* ($r=.076$, $P=.633$) ve *CASP3* ($r=.033$, $P=.833$) genlerinin REL değeri değişimleriyle T2 lezyon sayısında görülen değişim arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değeri değişimleriyle T2 lezyon sayılarında görülen değişimin arasındaki ilişkiyi ifade eden korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri ise Çizelge 3.26’da sunulmuştur.



Şekil 3.18: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle *BCL2* geninin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik

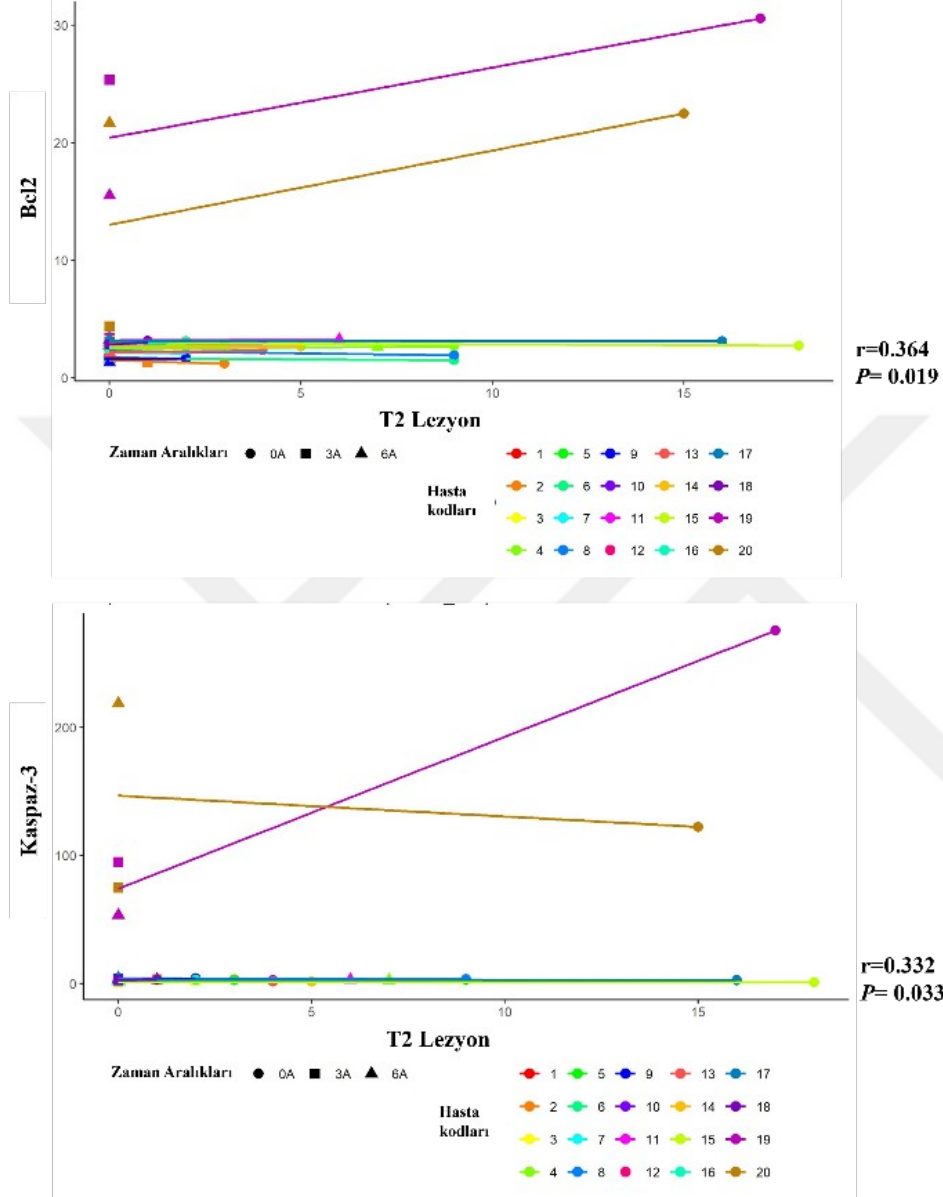
Çizelge 3.26: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle *Bcl2* ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (*r*) ve *P* değerleri

	T2 lezyon sayısı	
	Korelasyon Katsayısı (<i>r</i>)	<i>P</i>
Bcl2	.364	.019
Kaspaz-3	.332	.033

Çizelge 3.26 incelendiğinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında *Bcl2* ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerinde görülen değişimlerle T2 lezyon sayılarında görülen değişim arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunduğu görülmektedir (*Bcl2*: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$). Elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 3.19'da görülmektedir.

EDSS ve T2 lezyon parametreleri kullanılarak yapılan Rmcorr analizlerinin ardından total lezyon sayısı parametresinde görülen değişimin ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin ve *Bcl2*, Kaspaz-3 proteinlerinde görülen REL değeri değişimleriyle

arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla da Rmcorr analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu analizden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.27 ve Çizelge 3.28’de sunulmuştur.



Şekil 3.19: M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik

Çizelge 3.27 incelendiğinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında total lezyon sayısında görülen değişimle ER stresi ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değeri değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (*ATF4*: $r=-.051$, $P=.748$,

ATF6: $r=-.026$, $P=.868$, *BAX*: $r=.009$, $P=.955$, *BCL2*: $r=-.103$, $P=.520$, *CASP3*: $r=.030$, $P=.849$, *CHOP*: $r=.065$, $P=.686$, *PERK*: $r=-.009$, $P=.951$, *eIF2 α* : $r=.063$, $P=.694$, *IRE1*: $r=.072$, $P=.653$, *GRP78*: $r=-.106$, $P=.508$).

Çizelge 3.27: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri

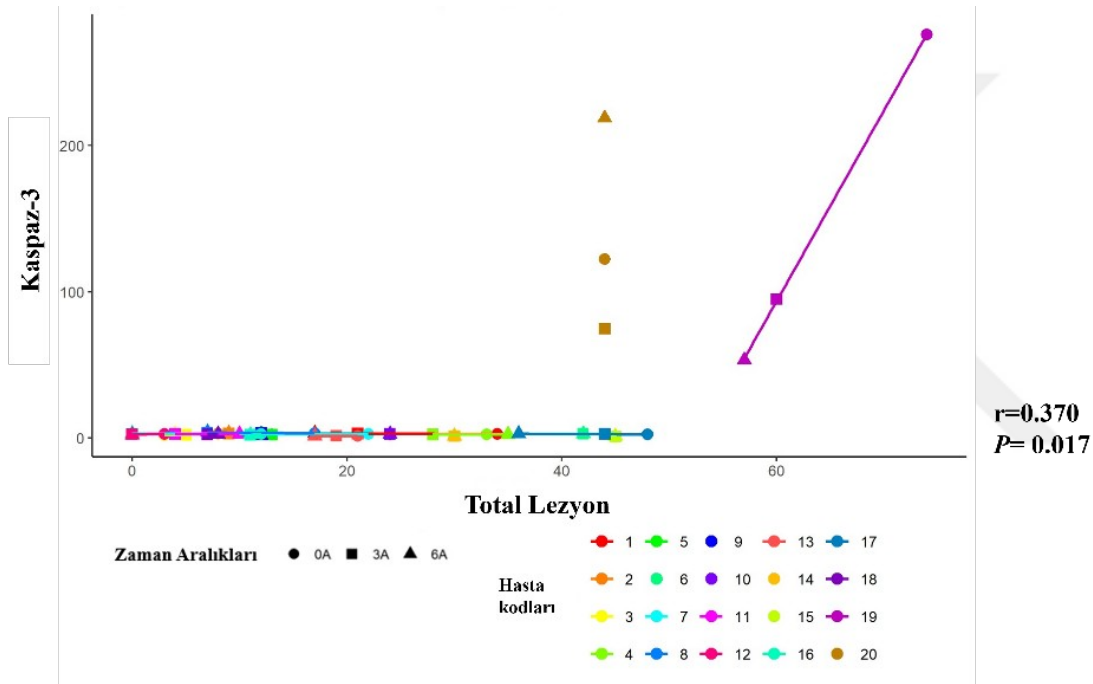
	Total Lezyon Sayısı	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P
<i>ATF4</i>	-.051	.748
<i>ATF6</i>	-.026	.868
<i>BAX</i>	.009	.955
<i>BCL2</i>	-.103	.520
<i>CASP3</i>	.030	.849
<i>CHOP</i>	.065	.686
<i>PERK</i>	-.009	.951
<i>eIF2α</i>	.063	.694
<i>IRE1</i>	.072	.653
<i>GRP78</i>	-.106	.508

Çizelge 3.28 değerlendirildiğinde, 0A, 3A ve 6A grupları arasında total lezyon sayısındaki değişimlerle Bcl2 proteininde görülen REL değeri değişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($r=.219$, $P=.167$). Total lezyon sayısındaki değişimin Kaspaz-3 proteininde görülen REL değeri değişimiyle istatistiksel anlamda pozitif yönde bir ilişkisi olduğu ($r=.370$, $P=.017$) görülmektedir.

Çizelge 3.28'de sunulan total lezyon sayısındaki değişimlerle Kaspaz-3 proteininin REL değerinde görülen değişimlere ait olan 0A, 3A ve 6A grupları arasında pozitif yönlü ($r=.370$, $P=.017$) görülen bu ilişkiye ait grafik ise Şekil 3.20'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.28: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r) ve P değerleri

	Total Lezyon Sayısı	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P
Bcl2	.219	.167
Kaspaz-3	.370	.017



Şekil 3.20: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle Kaspaz-3 proteininin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafik

4. TARTIŞMA

MS genç yetişkinlerde en sık görülen, nörodejeneratif, nöroenflamatuar ve travma harici engelliliğin görüldüğü bir MSS hastalığıdır. Nörodejenerasyon sonucunda sinir sisteminde görülen lezyonlar hastalık tanısında ayırcı kriterlerden biri olma özelliği taşıırken sinyal iletim sürecinde aksamalara sebep olmalarıyla hastalık semptomlarını meydana getirmektedir. Yürüme güçlüğü, görme sorunları, mesane-bağırsak fonksiyonlarında bozulma, kuvvet kaybı, bilişsel ve zihinsel fonksiyon kayıpları gibi hayat kalitesini negatif yönde etkileyen çok çeşitli semptomatik bulgular, hastalığın klinik seyrinde de önem arz etmektedir. Bu semptomların 24 saatten uzun süre çözömlenmemesi, herhangi bir iyileşme olmaksızın devam etmesi hastalığın alevlenmesi anlamına gelen atak sürecini tanımlar. Atak döneminin süresi, şiddeti ve sıklığı, hastalığın tanısı ve progresyonu ile ilişkilendirilirken tanı ve tedavi sürecinin de büyük bir parçasını oluşturur (Hurwitz, 2009; Polman vd., 2011; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

Başta *HLA* geni üzerinde görülen varyantlar olmak üzere çeşitli polimorfizmler MS'nin genetik risk faktörleri olarak literatürde yer alırken, D vitamini seviyelerindeki düşüş, obezite, beslenme biçimi gibi çeşitli çevresel parametreler de hastalığın çevresel risk faktörleri olarak kabul edilmiştir (Filippi vd., 2018; Dobson & Giovanni 2019). Hastalığın bu çok faktörlü yapısı ve heterojen semptomları popölasyonlar arasında farklılık gösterirken hastalığın eşsiz doğasını da ortaya koymaktadır. MS'nin bu kendine özgü yapısı hastalığın tanı ve tedavisinde de çeşitli zorluklara yol açarken hastalar arasındaki öngörölemeyen klinik seyri de beraberinde getirir.

MS, KİS, RRMS, PPMS ve SPMS olmak üzere klinikte dört farklı alt tipte değeriendirilmektedir. MS'li bireylerin yaklaşık %80'inde görülen RRMS'nin en karakteristik özelliği atak dönemleri arasında görülen remisyon süreçleridir (Weinshenker, 1998). Remisyon süreci uygun bir tedaviyle atak dönemlerinde görülen engelliliğin kalıcı hale gelmediği ve kısmen iyileşmenin görüldüğü bir periyodu tanımlar.

Her ne kadar RRMS, MS'nin görece iyi bir formu olarak görülse de yıllar içerisinde hastalık progresyonunda görülen kümülatif artış hastalığın ilerlemesine ve farklı alt tiplere dönüşmesine sebep olmaktadır (Weinshenker, 1998). Her hastada olmasa bile RRMS'nin farklı zaman periyotlarında SPMS fenotipi geliştirdiği görülürken bu iki formun tedavi yanıtı açısından birbirlerinden ayrıldığı da bilinmektedir. RRMS formu MS'de tedaviye en iyi yanıt veren klinik alt tip olma özelliğine sahipken SPMS'nin özellikle immünmodülatör tedaviye karşı direncinin RRMS'ye göre daha yüksek olduğu literatürde yer almaktadır (Rieckmann & Toyka, 1999). Sonuç olarak RRMS fenotipinden tedaviye dirençli farklı klinik alt tiplere geçişten önce etkin bir tedavinin uygulanması oldukça önemlidir. Nitekim, bu bilgiler MS'de tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde RRMS'nin neden odak noktası olduğunu açıklar niteliktedir.

MS'de tedavi sürecindeki ana strateji atak sıklığı ve şiddetini önleyerek hastalığın seyrini değiştirmek üzerine kuruludur. Ancak hastalığın çok faktörlü yapısı ve semptomlarının heterojen dağılımı, MS'nin kesin bir tedaviye sahip olmasını engellemektedir. Bu sebeple MS tedavisinde hastalığın seyrini değiştiren (disease-modulatory therapies-DMT) ilaçlar kullanılmaktadır. DMT grubu ilaçlar immün sistemi baskılamayı ya da modüle etmeyi amaçlayarak hastalığın nöroenflamatuvar karakterini hedef alır (Smith vd., 2017; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

MS'de görülen enflamasyon sürecinde, T hücreleri, B hücreleri ve çeşitli birçok düzenleyici faktörün fonksiyonlarında veya sayılarında görülen değişime bağlı olarak immün sistemde sonlanmayan bir aktiflik durumu görülmektedir (Loma & Heyman 2011; Rosenblum vd., 2015). MS patogenezinde T ve B hücrelerinin rol aldığı bazı moleküler mekanizmalar aydınlatılmış olsa dahi immün sistem elemanlarının tamamının MS patogenezinin olan katkısına dair araştırmalar günümüzde devam etmektedir (Hertwig vd., 2016). Ayrıca, T ve B hücrelerinden farklı olarak nötrofillerin de MS patogenezinin katkı sağladığı bilinmektedir. Nötrofiller; fagositoz, KBB yıkımı, degranülasyon, NHDT oluşturma ve APC olgunlaştırma fonksiyonları sayesinde enflamasyon sürecine katkı sağlamaktadırlar.

Nötrofiller'in MS'deki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, makrofaj ve mikroglialar dışında nötrofillerin de MSS'de görülen demiyelinizasyon sürecinde görev aldığı görülmüştür (Yamasaki vd., 2014).

MS hastalarının atak döneminde, nötrofillerin KBB'yi geçerek BOS'ta bulunduğu (Kostic vd., 2014) ve CXCL1, CXCL5 gibi nötrofillerin dolaşıma katılmasını ya da olgunlaşmasını etkilediği bilinen kemokinlerin hastalığın atak dönemlerinde remisyon dönemine kıyasla daha yüksek seviyede bulunduğu (Rumble vd., 2015) gösterilmiştir. Ayrıca, sağlıklı kontroller ile RRMS, PPMS ve SPMS hastalarından izole edilen nötrofillerin kullanıldığı bir çalışmada ise, nötrofillerin sağlıklı kontrollere kıyasla RRMS hastalarında sayıca daha fazla bulunduğu ve bu nötrofillerin degranülasyon, NHDT gibi enflamasyon ve doku hasarını artırıcı özellikler sergilediği gösterilmiştir (Naegele vd., 2012). MS patogenezinde oldukça önemli bir role sahip olan T hücrelerinin, APC'ler tarafından aktive edilmesi, antijen sunumunun nöroenflamasyonu tetiklemedeki önemini bir kez daha belirtirken bu sunum sürecini araştırmaların odak noktası haline getirmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda, B hücreleri, DH, mikroglia ve makrofajlara ek olarak nötrofillerin de APC sınıfına girdiği literatüre sunulmuştur. Nötrofillerin kazanmış olduğu bu antijen sunma özelliği, T hücrelerinin ve immün sistemin sonlandırılmayan aktifliğine ek bir katkı sunduğu anlamına gelmektedir (Abbas vd., 2015; Vono vd., 2017; De Bondt vd., 2020).

MS patogenezinde görülen enflamasyon süreçlerinin tamamı antienflamatuar ve proenflamatuar moleküllerin ve hücrelerin birbirleriyle iletişim halinde olmasını sağlayan yoğun bir sinyalleşme ağı ile kontrol edilir. Gerçekleştirilen bu kontrol süreci içerisinde hücreler oldukça yoğun bir şekilde protein sentezleme yükü altına girerler. Bu yük, ER'de var olan homeostazı bozarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinen ER stresin tetiklenmesine neden olur. Gelişen ER strese yanıt olarak KPY mekanizmasının aktive edilmesine rağmen homeostazın yeniden sağlanamaması ise hücreyi apoptoza götürür (Cunnea vd., 2011; Sprengle vd., 2017).

DMT grubu ilaçların 1.basamağında yer alan ve oral yolla kullanılan DMF, hücre içindeki redoks sistemini etkileyen, nöroprotektif ve antienflamatuar özellik gösteren bir ilaçtır (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Yadav vd., 2019). DMF tarafından enflamatuar tepki, PI3K/Akt yolu üzerinden nötrofillerin MSS'ye geçişlerinin azaltılması yoluyla baskılanabilir (Müller vd., 2016; Montez Diaz vd., 2018). Ayrıca, DMF tedavisi uygulanan EAE modellerinde T hücre sayısının azaldığı, buna karşın miyelin ve akson bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğu gösterilmiştir.

Bu etkilerin, DMF'nin hücrel redoks sistemini modüle etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Schilling vd., 2006; Linker vd., 2011).

Hücrel redoks sisteminde görülen DMF aracılı bu modülasyon, DMF'nin KEAP-1 proteinine bağlanması ve sonrasında Nrf2'nin hücre içerisinde serbest kalmasıyla başlar (Yadav vd., 2019). Serbest kalan Nrf2 tarafından *NQO1* geninin ekspresyon seviyesinde artış sağlanır. *NQO1* geninde görülen bu artış sayesinde, hücrede antioksidan olarak görev yapan, oksidatif stresi dengeleyen ve bağışıklık sistemi hücrelerini düzenleyen GSH miktarında da artış görülür (Linker vd., 2011). Ayrıca, DMF, hücre içerisinde serbest halde bulunan GSH molekülleriyle doğrudan etkileşime girebilir (Mrowietz vd., 2018). GSH hücre içerisinde elektrofillerin deaktivasyonunu sağlamak için serbest bir şekilde bulunur ve DMF'nin metabolize edilerek vücuttan atılmasını sağlayacak olan süreci başlatmak üzere bağ kurabilir (Schmidt & Mrowietz vd., 2007). Sedef hastalığında, DMF tedavisinin NHDT oluşumu üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada; DMF'nin, nötrofillerdeki serbest GSH miktarında meydana getirdiği düşüş ve ardından bu düşüşe bağlı oksidatif patlama kapasitesinde (ROS üretme yeteneği) görülen azalmayı takiben NHDT sürecinde görülen inhibisyon olmak üzere bir dizi birbirini tetikleyen mekanizmalar üzerinde etki gösterdiği ortaya konmuştur (Hoffman vd., 2018).

DMF'nin nötrofiller üzerindeki hücrel etkilerinin dışında çeşitli sinyal yolları üzerinden ER stresi baskıladığı da literatürde yer almaktadır. CHOP ve p-PERK ifadenmesinde düşüşe sebep olan DMF'nin bu yolla ER stres'in aktivasyonundaki etkisinin sınırlayıcı olduğu bilinmektedir. ER stres belirteci olan CHOP, NADPH oksidazı arttırarak hücrel oksidatif stresin artmasına sebep olur (Chou vd., 2013). Bu noktada, DMF, ROS oluşumunu azaltmak için AKT/CREB aktivasyonuna sebep olmaktadır (Abd El Fatah vd., 2021). AKT/CREB yolunun DMF tarafından aktivasyonu, Nrf2'nin CREB'in transkripsiyonel hedefi olarak hareket etmesi nedeniyle antioksidan etkilerini artırır ve ayrıca DMF'nin IRE1 ve PERK gibi ER stres belirteçleri tarafından indüklenen apoptozu düzenlediğini gösterir (Katoh vd., 2001; Sun vd., 2018; Hassab vd., 2023).

MS'de tedavinin değerlendirilmesi, atak sıklığı ve şiddetinde görülen değişimin takip edilmesi üzerine kurgulanmıştır.

En genel bakış açısıyla, atak sayısı ve atak sürecinde görülen semptomların kalıcılığı, kısa vadede hekimlerin yapmış olduğu muayenelerde EDSS puanı olmak üzere subjektif değerlendirmeler ve bazı kan testleri aracılığıyla değerlendirilirken, uzun vadede lezyon sayısında görülen stabil durumun veya değişimin MRG tetkikleri ile takip edilmesini içermektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). Nitekim, yapılan değerlendirmeler ve incelenen test sonuçları neticesinde hastanın uygulanan tedaviye verdiği yanıtın pozitif ya da negatif yönü ortaya çıkmaktadır. Ancak yapılan bu değerlendirme sürecindeki periyodik aralıkların uzun olması ve bazı subjektif klinik değerlendirmelere bağlı yapılan yorumunun her zaman yeterli olmaması da söz konusudur.

MS'nin çevresel ve genetik risk faktörlerinin tanımlanmasına rağmen hastalığın çok faktörlü doğasıyla ilişkili olarak hangi risk faktörünün ortadan kaldırılmasının veya tedavi edilmesinin MS fenotipinin ilerleyici yapısını durduracağı henüz bilinmemektedir. Ayrıca, MS'nin dünya çapında 2023 yılı itibarıyla 2,9 milyon kişiyi etkilediği bilinmekte olup, dünya üzerinde hastalık etkisinin görüldüğü alanın her geçen yıl prevelansta görülen yükselişe doğru orantılı bir şekilde arttığı gözlenmektedir (MSIF 2020; Walton vd., 2020). Gelişen bu süreç, hem hekimleri hem de araştırmacıları tedavi yanıtının değerlendirilmesinde klinik parametrelerle de desteklenebilen ek biyobelirteçlerin arayışına itmektedir.

Biyobelirteçler, biyolojik ve patolojik süreçleri, bir moleküle maruziyet veya herhangi bir müdahaleye karşı verilen yanıtları yansıtan, ölçülebilir ve objektif sonuçlar sağlayan parametrelerdir. Günümüzde, MS'nin tanısını ya da hastalığın aktivitesini yansıtan biyobelirteçler olduğu gibi tedavi yanıtını yansıtan biyobelirteçler de kullanılmaktadır. Biyobelirteçlerin elde edilmesi için birçok biyolojik kaynak olmasına rağmen ideal bir biyobelirteç yüksek hassasiyet ve özgüllük değeri taşıyarak invaziv olmayan bir yöntemle elde edilmelidir (Bielekova & Martin, 2004; Ziemssen vd., 2019). Örneğin, klinikte rutin kan testi sonuçlarında yer alan ve sistemik enflamasyonun bir belirteci olarak kabul edilen nötrofil/lenfosit oranı (neutrophil/lymphocyte ratio-NLR), MS'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha yüksektir (Demirci vd., 2016).

Bu bağlamda, NLR'nin MS'de görülen enflamatuar tepkinin periferik kandan anlaşılabilirliğini göstermesi (Noseworthy, 1999), hem de minimal invaziv bir yolla elde edilebilen bir biyobelirteç olması nötrofillerin fonksiyonlarının veya nötrofillerde görülen sinyal mekanizmalarının MS'de potansiyel biyobelirteç adayı olarak değerlendirmelerine olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, nörodejeneratif hastalıklarda görülen ER stresin ve apoptozun MS patogenezinde görev aldığı bilinen nötrofillerdeki etkisi ve bu ilişkinin MS tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biri olan DMF tedavisine karşı gelişen yanıtı yansıtacak bir biyobelirteç olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, tez çalışması sürecinde RRMS hastalarının nötrofillerinde ifadelenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin toplamda 6 ay boyunca alınan DMF tedavisi süresince gelişen ve değişen mRNA REL değerleri incelenmiştir. Ayrıca, gen ekspresyon analizi sonucunda REL değerlerinde anlamlı farklılık olduğu belirlenen *BCL2* ve *CASP3* genlerinin kodladığı proteinlerin REL değerleri de Western blot analizi ile incelenmiştir. İncelenen REL değerlerinin EDSS puanı, total lezyon sayısı ve T2 lezyon sayıları olmak üzere klinik parametrelerle ilişkisi de araştırılmıştır.

4.1 Çalışma Grupları ve Grupların Demografik Yapısı

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında 60 sağlıklı bireyden oluşan K grubu ve 20 RRMS hastasının oluşturduğu M grubu bulunmaktadır. M grubu içerisinde yer alan RRMS'li hastaların, DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ay (6A) olmak üzere 3 farklı zaman noktası takip edilerek M grubunun alt kümeleri oluşturulmuştur.

K grubu ve M grubu örneklerinin tamamı için fenol-kloroform çöktürme yöntemiyle gerçekleştirilen RNA izolasyonunu takiben izole edilen RNA'ların saflığının değerlendirilmesinde Nanodrop ile yapılan değerlendirmeye ilaveten agaroz jel elektroforez yönteminden de yararlanılmıştır. Agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen görüntü incelendiğinde (Şekil 3.1), izole edilen RNA'ların literatüre uygun bir şekilde gDNA içermediği ve 28S:18S oranının 2:1 oranını sağladığı görülmüştür. M grubu ve K grubu arasında gerçekleştirilen demografik verilere dair analizlerin sonuçları incelendiğinde, M grubunun yaş ortalaması 29.0 ± 12.0 olarak ve K grubunun yaş ortalaması 33.8 ± 12.8 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, K grubuna kıyasla M grubunun yaş ortalamasının anlamlı derecede düşük olduğu ($P=.048$) olduğu görülmektedir. Demografik verilere dair yapılan bir diğer analiz ise cinsiyet parametresi üzerinden gerçekleştirilmiş olup (Çizelge 3.1) M grubu ve K grubunu oluşturan bireyler arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P=.515$). Elde edilen bu sonuca göre, cinsiyet parametresinin M grubu ve K grubu üzerinde yapılan analizler üzerinde bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

MS genellikle 20-40 yaş arası genç yetişkinlerde görülmektedir ve MS atlas verilerine göre MS'nin başlangıç yaş ortalaması da 29 olarak belirtilmektedir (MSIF, 2020). Dolayısıyla, M grubunun yaş ortalaması açısından elde edilen değerlerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, K grubu ve M grubu arasında yaş parametresinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($P=.048$) görülmüştür. Ancak, P değerinin, istatistiksel anlamlılığın sınır değerine yakın olması ($P<.05$) ve M grubu yaş ortalamasının literatürle uyumlu olması, yaş parametresine dair görülen anlamlı farklılığa dair oluşabilecek etkinin, yapılan analizlerde göz ardı edilebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, DMF'nin yan etkilerinden biri olduğu bilinen lenfopeni ve nötropeni geliştirme riskinin özellikle yaş ile doğru orantılı bir şekilde arttığı bilinmektedir (Longbrake vd., 2015; Goldman vd., 2020). Bu durum baz alınarak DMF tedavisi başlanması planlanan naif RRMS hastalarının daha genç yaştaki hastalar olabileceği düşünülebilir ve bu yorum da K grubuna kıyasla M grubunun daha düşük yaş ortalamasına sahip oluşunu açıklayabilir.

4.2 M Grubunda Klinik Verilerinin Yorumlanması

Otoimmünite görülen hastalıklarda gelişen klinik belirtiler semptomların veya hastalığın derecelendirilmesini de sağlar. Özellikle MS'de EDSS puanlandırması, MSS'de görülen lezyonların sayısı ve varlığı, hastalık sürecinde yalnızca tanı kriteri olarak değil tedavi sürecine karşı gelişen yanıtı da bildirmektedir (Pisetsky, 2023).

M grubunu oluşturan RRMS hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) hekimler tarafından gerçekleştirilen fizik muayenelerinde belirlenen EDSS puanları, yine aynı zaman dönemlerinde gerçekleştirilen MRG tetkiklerinden elde edilen T2 lezyon ve total lezyon sayıları

0A, 3A ve 6A grupları arasında kıyaslanmıştır (Çizelge 3.2).



0A, 3A ve 6A grupları bir arada değerlendirildiğinde ve EDSS puanı üzerinden istatistiksel analizler gerçekleştirildiğinde, EDSS puanlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmektedir ($P=.036$). İstatistiksel olarak kanıtlanmış olan bu düşüşün hangi gruplar arasında görüldüğünün belirlenmesi amacıyla yapılan post-hoc analizlerinde ise anlamlılığın kaybolduğu sonucuyla karşılaşılmıştır.

EDSS değerlendirmesi, MS fenotipinde görülen engelliliğin derecelendirildiği bir ölçüt olarak kabul edilen bir puanlama sistemidir (Kurtzke, 2015). MS'li hastaların EDSS puanları her ne kadar fizyolojik değerlendirmelere dayandırılan bir ölçekle açıklanıyor olsa dahi, puanlama kan testleri ve MRG tetkiklerine kıyasla subjektif bir değerlendirme olarak görülmektedir. Nitekim, bu subjektif değerlendirme gruplar arasında farklılıklar ve uyum sorunu gelişmesine de sebep olabilmektedir. Dolayısıyla, 0A, 3A ve 6A gruplarında gerçekleştirilen EDSS puan karşılaştırmalarına ek olarak grupların uyumluluğunun ve farklılığın derecesinin değerlendirilmesi amacıyla Kendall's W ve Cohen's d değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.3).

Kendall's W değeri tekrarlanan ölçümlerin tutarlılığını değerlendirirken Cohen's d değeri farklılıkların büyüklüğünü araştırır. Her iki değer kapsamında Friedman testi sonrasında gerçekleştirilen post-hoc analizlerde kaybolan istatistiksel anlamlılığın hem gruplar açısından değerlendirilmesi hem de bireylerin ikili karşılaştırma testlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonucun tespit edilebileceği kadar büyük bir etki boyutuna sahip olup olmadığının belirlenmesi mümkün hale gelir (Legendre, 2005; Baguley, 2009; Marozzi, 2014). Bu kapsamda gerçekleştirilen ek analizler sonucunda, 0A-3A (Cohen's $d=.320$) ve 3A-6A (Cohen's $d=.170$) grupları arasında küçük bir fark görülürken 0A ve 6A grupları arasında orta düzeyde farklılık olduğu Cohen's $d=.450$ görülmektedir (Çizelge 3.3). Üç grubun birlikte değerlendirildiği Kendall's W test sonucunda ise gruplar arasındaki uyumun düşük olduğu ($W=.166$) tespit edilmiştir. Sonuç olarak hem Cohen's d hem de Kendall's W değerleri açısından 0A, 3A ve 6A gruplarının arasındaki uyumun düşük olduğu ancak farkın yeterince büyük olmadığı görülmüştür.

Genel anlamda, DMT grubu ilaçların atak sıklığı ve şiddetini baskılamadaki hedefinin başarıya ulaşması, MS hastalarında EDSS puanında düşüş görülmesi veya ilerleme olmaksızın stabil bir şekilde aynı puan ölçeğinde devam etmesi anlamına

gelmektedir.



DMF'nin RRMS tedavisinde etkinliğinin ve güvenilirliğinin değerlendirildiği Faz 2 ve Faz 3 çalışmalarına katılan MS'li hastalarda tedaviye bağlı değişen EDSS puanları incelenmiştir. Faz 3 çalışmalarının birleştirilmiş analizlerinde, DMF'nin etkinliğinin düşük EDSS puanına sahip RRMS hastalarında daha yüksek olduğu (Gold vd., 2015) ve faz çalışmalarına katılmış tüm MS'li hastalarda DMF'nin tedavi alan kişilerde sakatlıkta görülen ilerleme riskini plasebo alan kişilere göre azalttığı gösterilmiştir (Bomprezzi vd., 2015). Bu durumda M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi  ncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplar arasındaki EDSS puanında görülen düşüş, bu hususta literatürde yer edinmiş çalışmalardan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Ancak literatürde, EDSS puan değerlendirmesinin subjektif olması nedeniyle oluşabilecek yanlı sonuçları önlemek amacıyla, ilgili analizlerin belirli kritik zaman dilimlerinde periyodik takiplerle gerçekleştirilmesi gerektiği önerilmektedir (Kalincik vd., 2015). EDSS puanında görülen değişimin en doğru biçimde nasıl yansıtılacağının araştırıldığı bir çalışmada 5 yıl boyunca süregelen bir şekilde 3, 6, 12 ve 24 ay sürelerinde periyodik bir şekilde zaman aralığının artmasıyla daha keskin sonuçların ortaya çıktığı görülmüştür (Kalincik vd., 2015). Öyle ki, yapılan bu çalışmada 3-6 ay sürecinde EDSS puanı üzerinden yapılan analizlerin yalancı pozitifliğe sebep olabileceği de belirtilmektedir.

Nitekim, bu tez çalışması kapsamında 6 ay süreyle takip edilen EDSS puanında görülen düşüşün, DMT tedavisi sonucunda beklenen bir gelişme olduğu görülürken, post-hoc analizlerinde istatistiksel anlamlılığın kayboluşunun literatürde de sunulduğu gibi (Kalincik vd., 2015) takip süresinin EDSS puanı açısından daha uzun tutulması gerektiği yorumu ile açıklanabilir.

DMF tedavisinin T2 lezyon sayılarında herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amacıyla 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan analizlerde 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla T2 lezyon sayısı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$) görülmektedir ( izelge 3.2). T2 lezyonları; doku hasarı, demiyelinizasyon, ve enflamasyon görülen bölgelerde oluşarak hastalık aktivitesine bağlı olarak gelişim göstermektedir.

DMF ilacının etkinliği ve güvenilirliğinin değerlendirildiği, RRMS hastalarının katılımıyla gerçekteştirilen Faz-3 çalışmalarında, DMF alan grubun plasebo grubuna karşı 6.ayda yapılan ilk MRG değerlendirmesinde T2 lezyon sayılarında dūřuř meydana geldiği literatürde yer almaktadır (Arnold vd., 2014; Bomprezzi, 2015;). Ayrıca, klinik sunumu MS olarak tanımlanmayan ancak MRG değerlendirmeleri sonucunda MS fenotipi sergileyen radyolojik izole sendrom (RİS) hastalarında DMF tedavisine bağlı olarak, tedavi alan grubun plasebo alan gruba göre T2 lezyon sayılarında önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (Okuda vd., 2023). Bu bilgiler değerlendirildiğinde, bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların, literatürde sunulan sonuçlara benzer olduğu görölmektedir.

M grubunu oluşturan 0A, 3A ve 6A alt kümelerine denk gelen zaman noktalarında gerçekteştirilen MRG tetkikleri uyarınca hastaların total lezyon sayıları baz alınarak yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemiştir ($P=.144$). MSS’de görölen lezyonlar, demiyelinizasyon sonucu görölen akson hasarına bağlı gelişmekte olup kalıcı hale gelen kronik yapılar, izler olarak dūřünölmektedir. Geliřen lezyonlar kalıcı engelliliğe sebebiyet verirken lezyonların sayılarında görölen artış var olan engelliliğin derecesini arttırmaktadır (Efendi & Yandım Kuřcu 2018). M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayını (3A) ile

6.ayında (6A) oluşturulan gruplarda total lezyon ve T2 lezyon sayısı parametreleri MS’nin doğası gereği bir arada değerlendirilebilmektedir. Yapılan analizler sonucunda T2 lezyon sayılarında görölen dūřuř (3A vs. 0A: $P<.001$, 6A vs. 0A: $P=.001$) ve total lezyon sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemesi ($P=.144$), bu tez çalışması kapsamında takip edilen RRMS hastalarında, yalnızca MR değerlendirmeleri ağısından, 6 aylık süreçte DMF tedavisinin etkili olduğu yorumunun yapılmasını sağlar.

Bu tez çalışması süresince hastaların atak olguları da hekimler tarafından değerlendirilmiş ve takip edilmiştir. Hastaların kesin RRMS tanısı almaları ve gönüllölük esasıyla bu çalışmaya katılmayı kabul ettikleri süreçte, tanı almalarına sebep olan atak olgusu dışlandıktan sonra 6 aylık süreçte yalnızca bir hastanın klinik muayenesinde atak öyküsü yer almıştır.

4.2.1 M Grubunda Klinik Verilerin Cinsiyete Göre Yorumlanması

MS, kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha fazla görülmektedir (Munger vd., 2013; Ribbons vd., 2015) ve literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde genç yaştaki kadınların yine genç yaştaki erkeklere oranla MS’de görülen nörodejenerasyon ve enflamasyona daha sık maruz kaldıkları görülmektedir (Magyari & Koch-Henriksen 2022). Bu tez çalışması kapsamında takip edilen RRMS hastalarının EDSS puanları, T2 lezyon sayısı, total lezyon sayısı ve kontrast tutan lezyonlarında cinsiyet bazlı karşılaştırmalar yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Yapılan analizler sonucunda M grubunu oluşturan kadın RRMS hastalarının erkek RRMS hastalarına kıyasla EDSS puanında (0A: $P=.089$, 3A: $P=.684$, 6A: $P=.768$) ve T2 lezyon sayısında (0A: $P=.105$, 3A: $P=.481$, 6A: $P=.796$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 0A ve 6A gruplarında kadın RRMS hastaları ve erkek RRMS hastalarının total lezyon sayıları arasında yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken (0A: $P=.139$, 6A: $P=.052$), 3A grubunda kadın RRMS hastalarının total lezyon sayılarının erkek RRMS hastalarına göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P=.029$). Ek olarak, kontrast tutan lezyon varlığı yönünden cinsiyete bağlı anlamlı bir fark görülme (= $P=.264$), kontrast tutan lezyona sahip kadın sayısının ($n=3$) erkeklerden ($n=1$) daha fazla olduğu görülebilmektedir. Total lezyon sayısı ve kontrast tutan lezyon varlığında görülen bu durumun, kadın MS hastalarının erkek MS hastalarına oranla hastalığın nörodejeneratif etkisine daha fazla maruz kalmasına bir örnek olduğu söylenebilir.

4.3 ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

ER stresin Alzheimer, Huntington ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif ve nöroenflamatuar hastalıklarda belirgin bir etkiye sebep olduğu bilinmektedir (Stefani vd., 2012). ER strese ek olarak KPY tepkisinin sitokinleri ve enflamatuar yanıtta görev alan diğer molekülleri etkileyebildiği de bilinmektedir. MS ve ER stres özelinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, KPY tepkisi ve sonucunda gelişen ER stresin hastalığın patogenezi açısından ayırt edici bir özellikte olduğu görülmüştür (Mhaille vd., 2008; Sprenkle vd., 2007; Andhvarapu vd., 2019).

MS'nin klinikte dört farklı alt tipinin olmasına rağmen moleküler düzeyde ER stres, klinik alt tip fark etmeksizin aynı etkiye sahiptir (Andhavarapu vd., 2019).

Bu durumda da araştırmacılar tarafından MS'de görülen ER stresi anlamak için enflamatuar tepkide görev alan ya da enflamasyon sonucunda MS patogenezinin dahil olan her bir molekül ve hücre için ayrı ayrı çalışmalar yapılmaktadır.

MS'li hastaların lezyonlarında ATF4 ve CHOP ifadesinin yüksek seviyede olduğu bilinmektedir. Ayrıca, T lenfositler, mikroglialar ve oligodendrositlerde CHOP, IRE1 ve GRP78'in yüksek seviyede bulunduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Mháiille vd., 2008; Cunnea vd., 2011; McMahon vd. 2012; Ní Fhlathartaigh vd., 2013). Ek olarak, ER stres ve enflamasyonla birlikte gelişen nörodejenerasyon üzerine yapılan çalışmalarda, PERK ve eIF2 α 'nın etkileri veya rollerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır. PERK sinyal yolağının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *in vivo* fare modeli oluşturulmuştur (Lin vd., 2013). Bu fare modeli, MS'nin araştırıldığı geleneksel EAE modelinden farklı olarak PERK sinyal yolağının zamana bağlı kontrol edilebilmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmada, orta düzeyde oluşturulan PERK aktivasyonunun, EAE'nin olgun oligodendrositler için koruyucu etki oluşturduğu gösterilmiştir. ER stres sürecinde görülen PERK aktivasyonu yüksek seviyede görülmekte olup eIF2 α 'nın fosforilasyonunu tetiklemektedir ve eIF2 α 'nın nöronal sağ kalım sürecinde de görev almaktadır. Azalan eIF2 α fosforilasyonunun MS progresyonuyla ilişkili olduğu da düşünülürse, orta düzeydeki PERK aktivasyonunun hücre sağ kalımını desteklediği yorumu yapılabilmektedir (Lin vd., 2007). Ancak PERK aktivasyonu sonrası ER stres haricinde birçok sinyal mekanizmasının MS patogenezinde gösterdiği etkiler bir arada değerlendirildiğinde, PERK sinyalleme sayesinde gelişen korumanın kesin etkisi de sorgulanmaktadır (Walter & Ron 2011; Lin vd., 2013). Literatürden örneklenen bu çalışmalara istinaden MS ve ER stres arasında bir ilişki olduğu görülebilmektedir. Ancak MS'nin yalnızca MSS üzerindeki etkisi aracılığıyla ER stresle arasındaki ilişkinin anlaşılması mümkün olmayacaktır. Bu nedenle MS'nin enflamatuar karakteri üzerinden de ER stresle olan ilişkisinin incelenmesi gerekmektedir.

Periferal kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells-PBMCs) immün sistem elemanlarından olan T lenfositleri, B lenfositleri, doğal öldürü

hücreler ve monositleri içeren bir hücre topluluğudur. PBMC'lerde, ER stres ve Alzheimer



hastalığına dair belirteçlerin ifade seviyesinin incelendiği bir çalışmada, çalışma popülasyonunu oluşturan ve ortalama yaşı 45 olan erkek katılımcıların çok kilolu, obez ve aşırı obez olmak üzere VKİ değerleri hesaplanmıştır. Özellikle obezite görülen kişilerin PBMC'lerinde çok kilolu kişilere göre ER stres belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1'in, enflamasyon ilişkili TLR2, TLR4 ve Alzheimer hastalığıyla ilişkili olan belirteçlerin mRNA'larında artış görülmüştür (Lei vd., 2016). Otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ve ER stres arasında yapılan bir çalışmada, SLE hastalarının T lenfositlerinde IRE1, PERK, ATF6 ve p-eIF2 α moleküllerinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük seviyede ifade edildiği görülmüştür (Lee vd., 2015). Romatoid artrit (RA) hastalarının katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise, GRP78, IRE1 ve XBP1 seviyesinde sağlıklı kontrollere kıyasla artış görüldüğü raporlanmıştır (Ahmadiany vd., 2019). SLE hastalarının PBMC'lerine ER stresin incelendiği bir başka klinik araştırmada ise anormal KPY'nin SLE'nin bir belirteci olduğu ve IRE1/XBP1 ile PERK/CHOP etkileşimlerinin SLE potansiyel tanı veya tedavi belirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Cheng vd., 2014). PBMC'ler; IFN-gama, TNF- α , IL-4 ve IL-10 gibi çeşitli sitokinlerin üretiminde görev alarak MS'de immün sistem fonksiyonlarının düzenlenmesinde görülen bozulmaya bağlı olarak gelişen kronik enflamasyon süreçlerinde çeşitli etkiler gösterir (Navikas & Link, 2016 ; Simpson vd., 2015). Ayrıca, PBMC'ler tarafından üretilen bu sitokinlerin, MS'nin alevlenme döneminde hastalığın remisyon dönemine ve sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek seviyede olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Hollifield vd., 2003; Romme Christensen vd., 2012). MS, PBMC ve ER stres parametrelerinin birbirleri arasında oluşturdukları etkileşimin araştırıldığı bir çalışmada, MS'li hastaların PBMC'lerinde IFN-B tedavisi alanlarda almayanlara göre glukosidaz II alfa altbiriminin (glucosidase II alpha subunit-GANAB) ifade seviyesinin daha az olduğu gösterilmiştir (De Masi & Orlando 2021). GANAB, ER'de proteinlerin katlanmasını ve glikozilasyona uğramasını sağlayan kalretikulin-kalneksin mekanizmalarda görev alarak KPY ve ER stres tepkisinde yer almaktadır (Caramelo & Parodi 2008; Getts vd., 2008). Bu çalışmada, GANAB seviyelerinde görülen değişimin MS hastalarındaki IFN-B tedavisiyle olan ilişkisi neticesinde GANAB'ın MS'de tedavi yanıtına dair potansiyel bir belirteç olarak görev yapabileceği de söylenmektedir.

Kalretikulin, ER’de N-bağılı glikozilasyonun tamamlanması sonucunda katlanma aşamasına gelen proteinlere doğru katlanmalarında yardımcı olan bir şaperondur. ER stres artışına bağlı olarak ifade seviyesi artan kalretikulin, EAE’li farelerin mikrogliya ve astrositlerinde tespit edilmiştir. Ayrıca, sağlıklı kontroller ile natalizumab kullanan ve kullanmayan MS’li hastalar arasında serum kalretikulin seviyeleri de araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda, natalizumab kullanan MS’li hastaların serumlarında natalizumab kullanmayan MS’li hastalara göre daha düşük seviyede kalretikulin görülmüştür. Ancak natalizumab kullanan MS’li hastalar ve sağlıklı kontroller kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Ní Fhlathartaigh vd., 2013).

Clusterin, stres koşulları altında aktive olan ve yanlış katlanmış proteinlerine bağlanarak bu proteinlerden kaynaklanan toksisiteyi nötralize eden hücre dışı bir şaperondur ve SLE, RA, otoimmün miyokardit gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Stein vd., 2024). Clusterin seviyesinin MS’deki tedavi yanıtıyla ilişkisinin incelendiği bir çalışma literatürde yer almaktadır (Malhotra vd., 2024). Bu çalışmada 1 yıl boyunca tedavi alan RRMS hastaları tedaviye yanıt verenler ve vermeyenler olmak üzere kümelendirilmiştir. DMF ve fingolimod tedavisi alan ancak tedaviye yanıt vermeyen RRMS hastalarında tedavi sonrasında clusterin seviyelerinde herhangi bir azalma görülmezken teriflunomid tedavisi alan ancak yanıtızlık görülen RRMS hastalarında clusterin seviyelerinde azalma görülmüştür (Malhotra vd., 2024).

Genel olarak, MS ve ER stres ilişkisini, MSS’de görülen lezyonlar ve hayvan modelleri üzerinden açıklayan çalışmalar literatürde görülmektedir (Mháille vd., 2008; Cunnea vd., 2011; McMahon vd. 2012; Ní Fhlathartaigh vd., 2013; Lin vd., 2013). MS’de rol aldığı bilinen PBMC’lerin gerek farklı otoimmün hastalıklarda gerekse MS üzerinde ER stresle olan ilişkisini anlatan çalışmalara ek olarak, otoimmün hastalıklarda PBMC’lerde görülen ER stres belirteçlerinin potansiyel tanı veya tedavi belirteçleri olarak kullanılabileceği de gösterilmiştir (Cheng vd., 2014 De Masi & Orlando 2021). Ayrıca, tek başına ER’de protein katlama süreçlerinde görev alan moleküllerin de MS’de tedavi yanıtı için potansiyel belirteçler olarak tanımlandığı görülmüştür. Ancak, MS için hastalık aktivitesini ya da tedavi yanıtını gösteren biyobelirteçlere hala ihtiyaç duyulmaktadır (Yang vd., 2022).

Nötrofillerin ve ER stresin ayrı ayrı MS patogenezindeki yeri tartışılmaz derecede belirgindir. Ancak nötrofillerde görülen ER stresin MS’de tedavi yanıtı üzerinden değerlendirildiği bir çalışma henüz literatüre sunulmamıştır.

Bu tez çalışmasında, literatürdeki çalışmalar örnek alınarak, ilk kez RRMS’li hastaların nötrofillerinde ER stres belirteçleri ve bu stres tepkisine bağlı olarak aktifleşebilen apoptoz belirteci genlerin REL değişimleri incelenmiştir. Bu inceleme, bu tez çalışması kapsamında oluşturulan M grubundaki RRMS’li hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) takip edilmesiyle RRMS’li hastaların DMF tedavisine verdikleri yanıt doğrultusunda potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında nötrofillerdeki ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde sağlıklı bireylerden oluşturulan K (kontrol) grubu ile DMF tedavisi öncesi naif RRMS’li hasta grubu (0A) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*ATF4*: $P=.785$, *ATF6*: $P=.453$, *BAX*: $P=.215$, *BCL2*: $P=.629$, *CASP3*: $P=.701$, *CHOP*: $P=.237$, *PERK*: $P=.312$, *eIF2 α* : $P=.649$, *IRE1*: $P=.590$, *GRP78*: $P=.609$) (Çizelge 3.5).

Bu tez çalışması kapsamında, henüz yeni tanı almış veya herhangi bir ilaç tedavisinden sonra naif kabul edilebilecek kadar süre geçen ve DMF tedavisine başlanması planlanan RRMS’li hastalar, M grubunun 0A alt kümesini oluşturmuştur. Sağlıklı kontroller ve DMF tedavisi öncesindeki RRMS’li hastalar (0A) arasında ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde herhangi bir fark görülmemesi, hastaların yeni tanı almış olmaları veya naif kabul edilmeleriyle ilişkili olarak MS patogenezinin, nötrofillerde henüz ER homeostazında stres tepkisini arttıracak yönde bir değişim meydana getirmemesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, MS’de apoptoz belirteçlerinin ifade seviyesi ER stresten bağımsız olarak da değerlendirilebilir. Bu bağlamda, hastalığa bağlı görülen enflamasyonun 0A grubunu oluşturan RRMS’li hastaların apoptoz belirteçlerinin REL değerlerinde sağlıklı kontrollere kıyasla bir fark oluşturmamasının sebebi olarak, RRMS’li hastaların 0A grubuna dahil edilme kriterleri gösterilebilir.

Daha önce de belirtildiği üzere bu tez çalışmasının temel amacı, RRMS’li hastaların nötrofillerinde, DMF tedavisi sırasında ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL

değerlerinde meydana gelen değişimlerin tedavi yanıtını yansıtip yansıtmadığını belirlemek ve bu değişimlerin potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceğini araştırmaktır.

Bu nedenle M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar, DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayına (6A) denk gelen zaman periyotlarında takip edilmiş ve çalışmaya boylamsal bir karakter kazandırılmıştır. DMF tedavisinin nötrofillerdeki ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri üzerindeki etkisinin görülmesi amacıyla 0A, 3A ve 6A grupları arasında istatistiksel analizler yapılmıştır (Çizelge 3.6) 0A, 3A ve 6A grupları arasında ER stres belirteçlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*ATF4*: $P=.204$, *ATF6*: $P=.238$, *CHOP*: $P=.698$, *PERK*: $P=.135$, *eIF2 α* : $P=.837$, *IRE1*: $P=.341$, *GRP78*: $P=.540$).

MS fenotipinin ER stres belirteçlerinde meydana getirdiği değişimler, MSS'nin bir parçası olan beyaz maddeden elde edilen aktif MS lezyonlarındaki T hücreleri, oligodendrositler, astrositler ve mikroglialar üzerinden örneklendirilmiştir (Mháille vd., 2008; Cunnea vd., 2011). Özellikle Mháille vd. yapmış oldukları çalışmada PPMS ve SPMS hastalarının postmortem dönemlerinde elde edilen lezyonların kullanıldığı bildirmiştir (Mháille vd 2008). MSS'nin bir diğer parçası olan gri maddede yer alan lezyonların incelendiği ve ER stres belirteçlerinden CHOP seviyesinde artış görülen çalışmada ise biyopsi örnekleri alınan MS'li hastaların hastalık sürelerinin minimum

8 yıl olduğu gösterilmiştir (McMahon vd. 2012). Bu noktada, bu tez çalışması kapsamında değerlendirilen hastaların, MS'nin PPMS ve SPMS alt tiplerine göre daha az progresyon görülen RRMS alt tipinde yer alması nedeni ile 0A, 3A ve 6A grupları arasında ER stres belirteçlerinin REL değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiş olabileceği yorumu yapılabilir. Ayrıca, bu tez çalışmasında M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar DMF tedavisinden hemen önce başlayan ve tedavinin 6.ayında tamamlanan bir süre boyunca takip edilmiştir. Bu bağlamda, literatürdeki çalışmalara kıyasla daha kısa olan bu sürede nötrofillerdeki ER stres belirteçlerinin REL değerlerinde anlamlı bir fark görülmemesi, hastaların henüz ER stresi tetikleyecek kadar uzun süreli enflamasyona maruz kalmamasıyla da ilişkilendirilebilir.

M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi ncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında ER stres belirteçlerine ek olarak *BAX*, *BCL2* ve *CASP3* apoptoz belirteci genlerinin REL değerleri karşılaştırılmıştır



(Çizelge 3.6). Yapılan analizler sonucunda 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülürken (*BCL2*: $P=.034$, *CASP3*: $P=.034$), *BAX* geninin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmadığı ($P=.277$) görülmüştür.

BAX ve *BCL2* genleri arasında ifade seviyesine bağlı oluşan denge, hücrelerde apoptozun düzenlenmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır (Alberts vd., 2006). *BAX* geninin ifadelenmesi sonucunda sentezlenen Bax proteini, proapoptotik bir şekilde apoptoz sürecini başlatırken, *BCL2* ifadesine bağlı sentezlenen Bcl2 proteini ise antiapoptotik bir şekilde hücre ölümünü engeller. Bu iki protein arasında gelişen denge, hücrenin hayatta kalması veya apoptoza gitmesi açısından verilecek kararı belirleyen temel faktörlerden biridir (Abad vd., 2019; Khan vd., 2023). Ayrıca, MS’de görülen enflamasyona bağlı olarak nötrofillerin sayısının arttığı bilinmektedir (Demirci vd., 2016). MS’de uygulanan DMT tedavisinin ise nötrofillerin sayısında düşüş meydana getirebileceği de bilinmektedir (Scutera vd., 2020). Bu durumda, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesinde (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturdukları gruplar arasında apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin karşılaştırılması sonucunda 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde görülen artışın ($P=.034$), hem MS’de görülen enflamasyon tepkisinin hem de DMF’nin immün sistem üzerindeki modülasyon etkisinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı söylenebilir.

Nörodejeneratif karakterli Huntington hastalığında DMF tedavisi ve ER stres ilişkisinin araştırıldığı *in vivo* bir çalışmada, DMF’nin IRE1 ve PERK üzerinde AKT/mTOR sinyal mekanizmasını kullanarak etki gösterdiği ve KPY tepkisine bağlı ER stres gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (Hassab vd., 2023). Ayrıca, ER stres baskılayan DMF’nin Bcl2/Bax dengesini apoptozdan uzaklaştıracak şekilde düzenlediği ve Kaspaz-3 proteinini baskıladığı da yine aynı çalışmada gösterilmiştir (Hassab vd., 2023). Ek olarak, nörodejenerasyon sürecinin aydınlatılması için Alzheimer hastalığına yönelik bir fare modelinin oluşturulduğu çalışmada DMF’nin *BCL2* gen ekspresyonunda artışa sebep olabileceği de gösterilmiştir (Babaei vd., 2023). Ancak, DMF her zaman apoptozu baskılamaz ve çeşitli koşullar altında apoptozun indüklenmesine de sebep olur.

Otoimmün bir şekilde karakterize edilen sedef hastalığında, DMF'nin apoptotik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada çeşitli interlökinlerle uyarılan T hücrelerinde DMF maruziyeti sonrasında Bcl2 protein seviyesinde düşüş görülmüştür (Treumer vd., 2003). DMF'nin apoptotik etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise DMF'ye maruz bırakılan mast hücrelerinde *CASP9* geninin ifadesinde artış görülmüştür (Förster vd., 2013).

Her ne kadar, Förster vd., tarafından yapılmış çalışmada *CASP3* geninin ifadenme seviyesinde bir değişim görüldüğü bildirilmemiş olsa dahi, hücrelerin içsel apoptoz yolağında *CASP9* geninin kaspaz ilişkili yoğun sinyalleşme sürecinde başlatıcı etkisinin varlığı gözetildiğinde, DMF tarafından hücrel apoptozun *CASP* gen ailesi aracılığıyla tetiklendiği görülebilmektedir.

DMT grubu bir ilaç olan DMF ise proenflamasyonu antienflamasyon yönünde kaydırmak üzere immün sistem hücrelerinde modülasyon etkisi göstermektedir (Mrowietz vd., 2018). DMF'nin etki mekanizması, MSS'de Nrf2 bağımlı ve bağımsız antioksidan yolların aktivasyonu ve apoptoz ile ilişkili olarak lenfosit sayısında azalmaya neden olan temel bir mekanizmayı içermektedir (Montes Diaz vd., 2018). Ayrıca, DMF'nin *CASP9* geni üzerindeki etkisinin gösterildiği bir çalışma (Förster vd., 2013) ve tedavi sürecinin lenfopeni, nötropeni gibi yan etkilerinin gösterildiği araştırmaların literatürde var olduğu bilinmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Goldman vd., 2020). DMF'nin immün sistem hücrelerinde apoptotik etki gösterebildiği bu çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu durumda, 0A, 3A ve 6A grupları arasında artan hastalık aktivitesini baskılamak amacıyla DMF'nin nötrofiller üzerinde *CASP3* geninin REL değerinde görülen anlamlı artışa ($P=.034$) sebep olacak şekilde etki gösterdiği söylenebilmektedir. Ek olarak, *BCL2* ve *CASP3* genlerinde görülen REL değeri artışının yorumlanmasında bu genlere ait mRNA'ların nötrofillerden elde edildiğinin de unutulmaması gerekmektedir. Nötrofillerin yarı ömürleri 24 saatten daha azdır ve bu süreç içerisinde nötrofiller doğal yollarla apoptoza uğrarlar. Ancak çeşitli durumlarda, özellikle enflamasyon görülen bölgelerde nötrofiller daha uzun süre hayatta kalırlar (Moulding vd., 2001). Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-KUF), G-KUF, çeşitli interferonlar ve sitokinler aracılığıyla nötrofillerin apoptozu geciktirilebilmektedir ve ayrıca enflamatuvar tepkiye bağlı bir şekilde *BCL2* aracılığıyla nötrofillerde apoptozun

geciktirildiğini gösteren çalışmalar literatürde



mevcuttur (Brannigan vd., 2000; Carrington vd., 2021). Bu durumda, 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* geninde görülen anlamlı artışın ($P=.034$) bir sebebi de nötrofillerde enflamasyona bağlı geciktirilen apoptoz süreci olabilecektir.

Özellikle M grubunu oluşturan RRMS'li hastalarının DMF tedavisi altında oluşturdukları 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan analizler değerlendirildiğinde, bu hastalarının nötrofillerinde REL değerleri incelenen ER stres belirteçlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıkla karşılaşılmamıştır. Bu nedenle apoptoz belirteci olan *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde görülen istatistiksel olarak anlamlı artışın, ER stresten bağımsız bir şekilde geliştiği görülmektedir. Ayrıca, MS'nin enflamatuar doğası gereği immün sistemin sürekli aktif oluşuna karşın, DMF'nin kendi mekanizması doğrultusunda bu enflamasyonu baskılamaya yönelik bir şekilde apoptotik etkiler gösterdiği bilinmektedir (Förster vd., 2013; Goldman vd., 2020). Bu bağlamda, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların nötrofillerinde gözlenen *BCL2* ve *CASP3* REL değerinde görülen artış, DMF ve MS'nin ayrı ayrı oluşturdukları etkinin bir sonucu olarak da değerlendirilebilecektir. Ayrıca, DMF'nin nötrofiller üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, DMF'nin nötrofillerin efektör fonksiyonları üzerinde tek başına olan etkisinin belirlenmesi için daha fazla araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, bu çalışmada DMF'nin hidrolize edilmesiyle oluşan MMF'nin de nötrofiller üzerindeki etkisinin araştırılmasının gerektiğinin altı çizilmiştir (Morrison vd., 2021). Bu duruma ek olarak, nötrofiller ve DMF arasında görülen etkileşimin aydınlatılması için nötrofillerin fonksiyonlarına bağlı olarak immün sistem içerisinde yer alan kontrol mekanizmaları da incelenmelidir.

İmmün sistem, antijen sunumu, lenfosit gelişimi ve enflamatuar molekülleri düzenleme işlevlerinde hücrel otofajiyi de kullanmaktadır (Andhavarapu vd., 2019). Otofaji, hücrelerdeki anormal bileşenleri ve materyalleri hücre dışına çıkarmayı veya bu materyalleri ortadan kaldırmayı amaçlayan bir bozunma sürecidir (Li & Ma 2020). Değişen otofafik işlevler kişinin otoimmün hastalıklara olan yatkınlığını artırır ve MS'de otofaji belirteçlerinin yüksek seviyede olduğu bilinmektedir. Örneğin, EAE fare modeliyle yapılan bir çalışmada, otofaji belirteçlerinin düşük seviyede bulunması T hücrelerinde azalan aktivasyonla ilişkilendirilmiştir (Bhattacharya vd., 2014). Başka bir çalışmada ise otofajik ve

apoptotik proteinler olan Bax ve Bcl2'nin tedaviye bağı



olarak EAE’li farelerin beyaz ve gri maddelerinde daha yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir. ER stres ve otofaji arasındaki etkileşim düşünüldüğünde, ER stresin başlatıcısı olan KPY tepkisinin hücrel koruyucu etkisinin değerlendirilmesi gerekir.

Oligodendrositler, mikroglialar ve astrositlerde KPY tepkisinde görülen artış, özellikle oligodendrositlerin fonksiyonu için gereklidir (Lin & Stone, 2020; Al-Kuraishy vd., 2024). Ayrıca, otofajinin baskılanmasının, mitokondri üzerinde işlev bozukluğu meydana getirdiği ve bu bozukluk sonucu ortaya çıkan oksidatif stresle beraber MS gelişim riskini arttırdığı da bilinmektedir (Hassanpour vd., 2020). ER stres aracılı bir şekilde tetiklenen apoptozun immün sistemde otofaji aracılığıyla da kontrol edilebildiği bilinmektedir (Andhavarapu vd., 2019). Sonuç olarak, ER stres apoptozu düzenleyen tek mekanizma olmadığı için apoptozu düzenleyen diğer mekanizmaların MS ile olan ilişkisi de araştırılmayı hak edecek kadar dikkat çekicidir. RRMS’li hastaların DMF tedavisine karşı apoptoz belirteci genlerinin REL değerlerinde görülen anlamlı artışın ER stresten bağımsız bir şekilde geliştiği düşünüldüğünde, DMF’nin tedavi yanıtı kapsamında otofaji sürecine ek olarak farklı apoptotik belirteçlerin de incelenmesi faydalı olacaktır. Örneğin içsel ve dışsal apoptoz yollarında başlatıcı olarak kabul edilen veya anahtar görev alan diğer apoptoz belirteci genlerde veya bu genlerin proteinlerinde (p53, TNF α , FasL vb.) görülecek REL değişimlerinin de araştırılması gerekmektedir. Tıpkı MS gibi oto-immün bir hastalık olan ve tedavisinde DMF kullanılan sedef hastalığına dair yapılan bir çalışmada, ilacın oksidatif stres üzerinde Glutasyon-S-transferaz P enzimi (glutathione-S-transferase P enzyme-GSTP) aracılığıyla da etki gösterdiği ortaya konmuştur (Campioni vd., 2022). Ayrıca, farklı bir çalışmada ise GSTP’nin hücrel redoks sistemini baz alarak Ca aracılı diğer proteinleri de kullanarak KPY tepkisine dahil olarak ER’deki homeostazi yeniden sağladığı da gösterilmiştir (Ye vd., 2017). Hücrel ROS sisteminde görev alan genlerde görülen polimorfizmlerin MS patolojisindeki önemi de bilindiğine göre, MS’de tedavi yanıtının özellikle DMF ve ER stres kapsamında yapılacak olan araştırmalarında *GSTP* geninin REL değerinin de incelenmesi çeşitli mekanizmaların aydınlatılmasında önemli bir rol oynayacaktır.

Sonuç olarak, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) yapılan değerlendirmeler sonucunda DMF tedavisi altında takip edildikleri 6 aylık süre boyunca ER stres belirteçlerinin

nötrofillerde henüz tedavi yanıtını yansıtacak bir değişim göstermediği söylenebilmektedir. Buna rağmen, bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, RRMS'li hastaların nötrofillerindeki *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde 6A grubunda 0A grubuna kıyasla görülen anlamlı artış ($P=.034$) DMF tedavi yanıtına dair potansiyel bir biyobelirteç olma noktasında umut vaat etmektedir. Ancak bu artışın klinik parametrelerle de desteklenmesi gerekmektedir.

4.3.1 M Grubunda ER Stresi ve Apoptoz Belirteci Genlerin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Klinik Verilere Göre Değerlendirilmesi

MS'de tedavinin, atak sıklığı ve şiddetini önlemedeki amacı göz önüne alındığında, bu hedefin MS semptomlarıyla ilişkisi önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, EDSS puanındaki artış veya azalış ile lezyon sayılarındaki değişim derecesi, tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kritik parametrelerdir. Bu durumda, klinik parametrelerde görülen değişim açısından oluşturulan gruplar arasında ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde görülecek değişimin bu genlerin tedavi yanıtı açısından değerlendirilmesinde ek bir destekleyici olabilecektir. Nitekim, bu tez çalışması kapsamında, M grubunu oluşturan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A dönemlerinde ER stresi ve apoptoz belirteci genlerinden elde edilen REL değerleri; EDSS puanları, kontrast tutan lezyon varlığı ve atak durumu açısından incelenmiştir.

EDSS puanının 3 veya 4'e ulaşma süresinin bireyler arasında farklılık göstermesine rağmen 6 ve üzeri puana ulaşmanın, EDSS puan ölçeğinde 3 puana ulaşma süresinden ya da relaps periyodunun süresinden bağımsız olduğu bilinmektedir. Ayrıca, EDSS puanı 3 ve üzerine çıkmadan önce etkin bir tedaviye başlanması da EDSS puanının ivmeli artışının önüne geçmektedir (Confavreux vd., 2003; Leray vd., 2010). Bu bağlamda, M grubunu oluşturan RRMS'li hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) hekimler tarafından belirlenen EDSS puanlarına göre ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değişimleri incelenmiştir. Yapılan bu inceleme kapsamında, öncelikle EDSS puanları açısından bir sınır değeri belirlenmiş ve RRMS'li hastalar bu EDSS puan sınırına göre iki gruba ayrılmıştır. 0A, 3A ve 6A gruplarındaki ham EDSS puanları ve ortalama EDSS puanları (Çizelge 3.2) incelenerek EDSS puanları için sınır değeri 1.5 olarak belirlenmiştir. Belirlenen sınır

değeri takip edilerek, 0A, 3A ve 6A dönemlerindeki EDSS puanlarına göre, M grubundaki RRMS'li hastalar $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır.

Çizelge 3.2 incelendiğinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($P=.036$). Ancak EDSS'nin subjektif bir değerlendirme olması nedeniyle gruplar arasında görülen uyum sorunu, EDSS puanlarında görülen anlamlı farklılığın hangi gruplar arasında olduğu cevabının elde edilmesini engellemektedir (Çizelge 3.3). Fakat temelde M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların EDSS puan ortalamaları 0A, 3A ve 6A grupları arasında değerlendirildiğinde puanların DMF tedavisi boyunca düşme eğilimi sergilediği görülmektedir (Çizelge 3.2). MS'de artan hastalık aktivitesinin EDSS puanında artış meydana getireceği (Efendi & Yandım Kuşçu 2018) düşünülürse, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların, tek başına EDSS parametresi üzerinden, DMF tedavisinde hastalık aktivitelerinde artış görülmediği söylenebilir. Nitekim, bu durumda 0A, 3A ve 6A dönemlerinde, EDSS puanı açısından oluşturulan gruplardaki RRMS hastalarının sayısı incelenmek istendiğinde tedavi süreci açısından beklenene uygun bir şekilde $EDSS > 1.5$ grubunda 3A ve 6A dönemlerinde (her iki dönem için de $n=3$) 0A dönemine kıyasla daha fazla RRMS hastası ($n=6$) bulunmaktadır (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10, Çizelge 3.11, Çizelge 3.12, Çizelge 3.13, Çizelge 3.14, Çizelge 3.15, Çizelge 3.16).

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A dönemlerinde belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında gerçekleştirilen karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, RRMS hastalarında ER stres ve apoptoz belirteci genlerin, DMF tedavisine karşı verilen yanıtı yansıtmaya potansiyeline sahip bir biyobelirteç adayı olup olmadıklarını değerlendirmektir. Bu nedenle, ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinin EDSS puanlarına göre incelenmesine benzer şekilde, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların kontrast tutan lezyon varlığına göre ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişim de araştırılmıştır. Yapılan bu araştırma için M grubunu oluşturan RRMS hastalarından

0A, 3A ve 6A dönemlerinde kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler belirlenerek bir gruplandırma



yapılmıştır. Kronik demiyelinizasyon sonucu oluşan T2 lezyonlarından farklı olarak, kontrast tutan lezyonlar aktif enflamasyonla ilişkilidir. Bu bağlamda, akut hastalık aktivitesini yansıtan kontrast tutan lezyonlar, diğer MSS lezyonlarından MRG tetkiklerinde gadolinyum kontrast maddesiyle oluşturdukları parlak alanlar sayesinde ayırt edilir (Gupta vd., 2017). M grubunu oluşturan RRMS hastalarında kontrast tutan lezyonu var olan kişilerin sayısı (n=4) kontrast tutan lezyonu olmayan kişilere göre (n=16) daha azdır (Çizelge 3.17). Kontrast tutan lezyon varlığının artan hastalık aktivitesiyle olan doğru orantısı göz önüne alındığında, tez çalışması kapsamında takip edilen M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların, yalnızca kontrast tutan lezyon varlığı açısından, yüksek hastalık aktivitesine sahip olmadıkları görülebilir. Kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan kişiler arasında ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri karşılaştırıldığında, yalnızca 6A grubunda, kontrast tutan lezyonu olan kişilerde olmayan kişilere kıyasla *eIF2α* REL değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P=.038$) (Çizelge 3.17). Literatüre bakıldığında artan *eIF2α* seviyesinin enflamatuvar lezyonlarla ilişkili olduğu görülmektedir (Panzhinskiy vd., 2021). 6A grubunda kontrast tutan lezyonu olan hastaların olmayanlara göre daha aktif bir enflamatuvar yanıt geliştirdikleri düşünüldüğünde, bu artan enflamasyona bağlı immün sistem hücrelerinde proenflamatuvar moleküllerin veya gen ürünlerinin ifade seviyesinde görülecek olan artış *eIF2α* geni tarafından başlatılan translasyon süreciyle ortaya konacaktır. Nötrofillerin enflamasyon sürecinde KBB'yi geçebildiği de düşünüldüğünde (Aratani, 2018), translasyon ihtiyacının karşılanması için *eIF2α* geninde ifade seviyesini arttırıcı bir şekilde düzenleme yapılması, REL değerindeki bu artışı açıklayıcı nitelikte olabilecektir. Ayrıca, kontrast tutan lezyonlar üzerinde ER stresten bağımsız bir şekilde *eIF2α* seviyesi için yapılacak araştırmaların, kontrast tutan lezyonların enflamasyon sürecine ilişkin daha fazla bilgi sunacağı da düşünülmektedir.

EDSS puanları ve kontrast tutan lezyonların incelenmesine ek olarak M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların atak durumları da bu tez çalışması kapsamında takip edilmiştir. M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 ile (3A) 6.ay1 (6A) olmak üzere hekimler tarafından yapılan muayenelerinde yalnızca bir hastada alevlenme ya da bir diğer deyişle atak öyküsü izlenmiştir (Çizelge 3.18). RRMS'li hastaların ER stres ve apoptoz belirteci genlerinin

REL değerlerinin, atak öyküsü bulunan ve bulunmayan bireyler arasında karşılaştırılmasının yalnızca bir hastada atak öyküsü bulunması nedeniyle sağlıklı olmayacağı göz önünde bulundurulmuştur. Bu sebeple, atak olgusu ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinden bağımsız bir şekilde yalnızca DMF'nin atak önlemedeki etkisi üzerinden değerlendirilmiştir. DMF, MS tedavisinde kullanılan diğer birinci basamak DMT grubu ilaçlarına göre daha düşük relaps riskiyle ilişkilendirilmektedir (Bosco-Lévy vd., 2022). Bu tez çalışmasının, M grubunu oluşturan 20 RRMS hastasının 6 ay boyunca aldıkları DMF tedavisi açısından bakıldığında yalnızca bir hastada görülen alevlenme, DMF'nin bu hasta grubunda tedavi stratejisinde başarılı olduğu yorumunun yapılmasını da sağlamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde görülen değişimlerin araştırıldığı tüm analizlerin birlikte değerlendirilmesi, incelenen REL değerlerinin potansiyel biyobelirteç olma durumunu yorumlamak açısından gereklidir. K grubu ve M grubu arasında ya da M grubunu oluşturan 0A, 3A ve 6A alt grupları arasında ER stres belirteçlerinin REL değerleri için yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Literatürde yer alan ve MS ya da otoimmün karakterli diğer hastalıklarda ER stres belirteçlerinin ifade seviyesinde görülen artışın anlatıldığı çalışmalar incelendiğinde bu durumun sebebi açık bir şekilde görülecektir. Örneğin, MS ve ER stres ilişkisini gösteren çalışmalardan birinde PPMS, SPMS ve RRMS hastalarının frontal loblarının beyaz maddelerinde demiyelinizasyonun görüldüğü beyin dokuları postmortem dönemde alınarak incelenmiştir (Antony vd., 2007). Yapılan bu çalışmada sağlıklı kontrollere karşı ER stres belirteçlerinde artış görülen MS hastalarının; EDSS puanlarının 7 ile 9 arasında değiştiği ve daha kötü nöropatolojik durumlara sahip olduğu yani hastalığın daha progresif alt tiplerinde değerlendirildikleri görülmüştür (Antony vd., 2007). Ayrıca, MS'de ER stres belirteçlerinin seviyesinde artış görüldüğünü anlatan diğer çalışmalar incelendiğinde, çalışmalarda genel olarak postmortem dokular üzerinde inceleme yapıldığı ve özellikle McMahon vd. tarafından yapılan çalışmada biyopsi örnekleri alınan 16 MS hastasından 6 kişinin MS'ye ek sebeplerle öldüğü belirtilirken 3 kişinin ölüm sebebi tek başına MS olarak belirtilmiştir (McMahon vd., 2012). Genel olarak bakıldığında, literatürde ER stresin yüksek progresyonla ilişkili olduğu görülmektedir.

Hastalık progresyonu ve ER stres arasındaki ilişkiyi yansıtabacak olan bu yorum yalnızca MS'ye özgü de değildir. SLE hastalarında ER stres belirteçlerinin incelendiği bir çalışmada, SLE hastalarının nötrofillerinde sağlıklı kontrollere kıyasla artan ER stres seviyesi ile karşılaşmıştır (Tumurkhuu vd., 2022). Ancak bu hastaların artan akciğer hasarına sahip olduğu belirtilmiş ve bu durumun hastalığın şiddetli, ilerlemeci bir aktiviteye sahip olduğunu da gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, SLE hastalarının katılımıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada (Cheng vd., 2014) ER stres belirteçlerinde artış görülen hastaların SLE'de hastalık aktivitesini tanımlayan hibrit sistemik lupus eritematozus hastalık aktivite indeksi (hybrid systemic lupus erythematosus disease activity index-hSLEDAI) puanlarının 12 ve üstü olduğu bildirilmiştir. Otoimmün karakteri, immün sistem hücrelerinde görülen değişimler açısından MS ile benzerlik gösteren diyabet hastalığıyla ER stres arasındaki ilişkinin modellendiği *in vitro* bir çalışmada ise nötrofillerin kalıcı ER stres altında hastalığın progresyonunu tetikleyici bir şekilde çeşitli mekanizmalar üzerinde birtakım düzenlemelere sebep olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2022). Diyabet üzerinde yapılan bir çalışmada, PERK geninde çeşitli manipülasyonlarla gerçekleştirilen aşırı miktarda aktivasyonun pankreas B (beta) hücrelerinde ER stres gelişimine bağlı olarak tip 1 diyabet gelişmesine sebep olabildiği gösterilmiştir (Harding vd., 2001).

Bu tez çalışması kapsamında, M grubunu oluşturan MS'li hastaların, önceki çalışmalarda değerlendirilen PPMS ve SPMS hastalarına göre MS'nin daha az progresyon görülen klinik alt tipi olan RRMS grubunda değerlendirildikleri veya RRMS üzerinden yapılan diğer çalışmalardaki EDSS puanlarına göre hafif derecede engelliliği gösteren EDSS puanlarına sahip oldukları bilinmektedir. DMF tedavisine karşı gelişen yanıt sürecini değerlendirmek için M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar, DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6. ayında (6A) takip edilmiştir. Bu takip esnasında 0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanında görülen düşüş eğilimi, T2 lezyonlarında 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla görülen düşüş (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$) (Çizelge 3.2) ve bu hastalardan yalnızca bir kişinin 6 aylık süreçte atak öyküsüne sahip olması, M grubunu oluşturan RRMS'li hastalarda hızlı bir progresyon görülmediğinin göstergeleridir.

Dolayısıyla, hem MS hem de diğer otoimmün hastalıklara yönelik yapılan

Çalışmaların ortak bulguları doğrultusunda, MS'li hastalarda hızlı progresyonun grlmemesi, ER



stres belirteçlerinde artışın tespit edilmemesinin nedeni olabilir. Hali hazırda, EDSS puanları ya da kontrast tutan lezyon varlığı üzerinden oluşturulan gruplar arasında herhangi bir ER stres ve apoptoz belirteci genin REL değerinde anlamlı bir fark olmayışı, hastalık progresyonuyla ER stresin ilişkisini anlatan yorumu destekler niteliktedir. Ayrıca, bu noktada, ER stres yolağının bir parçası olarak görev alan *eIF2α* REL değerlerinin kontrast tutan lezyonu olan kişilerde olmayan kişilere göre gösterdiği artışın ($P=.038$) ER stresinden ziyade enflamasyonun bir tepkisi olarak ortaya çıktığı düşüncesi de anlam kazanacaktır.

4.4 Bcl2 ve Kaspaz-3 Proteinlerinin Rölatif Ekspresyon Seviyelerinin Yorumlanması

M grubunu oluşturulan RRMS hastalarının, *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL seviyelerinde 6 aylık süreyle DMF tedavisi aldıkları dönemde (6A) naif oldukları döneme kıyasla (0A) görülen istatistiksel artışa bağlı olarak yapılan WB deneylerinden elde edilen bant kalınlıkları karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.16). 0A, 3A ve 6A grupları arasında Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait ortalamalarda azalma eğilimi görülse dahi bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır (Bcl2: $P=.915$, Kaspaz-3: $P=.462$). Her ne kadar DMF tedavisinin *BCL2* ve *CASP3* REL değerlerinde yarattığı değişim yapılan analizler sonucunda ortaya konmuş olsa da Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesinin hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede birçok nedeni olabilir.

Transkripsiyon sonrasında RNA üzerinde gerçekleştirilen ekzon/intron düzenlemesi, mikroRNA'ların (miRNA) mRNA'lar üzerindeki etkisi ve translasyon sonrasında görülen etkiler sebebiyle gen seviyesinde görülen artış veya düşüş miktarı her zaman protein miktarıyla uyumlu olmamaktadır (Alberts vd., 2006). Değişen bu uyumluluk durumu, çeşitli farmakolojik ajanların PTM süreçlerine dahil olmasıyla açıklanabilmektedir (Alberts vd., 2006).

DMF tarafından etkilenen miRNA'ların apoptoz yollarının düzenlenmesinde görev aldıkları bilinmektedir. Örneğin, miR-21 ve miR-146a hem DMF tarafından etkilenen hem de apoptoz yollarının düzenlenmesinde görev alan miRNA'lardır (Giuliani vd., 2021). miR-21 hücrelerde anti-apoptotik bir etki göstermektedir ve

RRMS hastalarının



T hücrelerinde fumarik asit ester tedavisine bağlı bir şekilde mir-21 seviyesindeki artışı gösteren bir çalışma literatürde yer almaktadır (Buscaglia vd., 2011; Ntranos vd., 2019). Apoptozu tetikleme özelliğiyle de bilinen miR-146a, DMF tedavisi alan RRMS hastalarında naif RRMS hastalarına kıyasla daha az bulunmaktadır.

Ayrıca, proapoptotik bir miRNA olan miR-155'in, DMF tedavisi sonrasında, plazma seviyesinde düşüş gösterdiği bilinmektedir (Giuliani vd., 2021). Genel olarak bakıldığında, DMF apoptoz sürecini tek başına gen ifade seviyesinde değişim yaratarak değil, genlerin ürünlerini de etkileyerek düzenlemektedir.

Bu durumda, DMF tedavisi sonucunda *BCL2* ve *CASP3* genlerinde görülen REL değişimlerini yansıtacak mRNA'ların, transkripsiyon aşamasından translasyon sürecine geçişte daha farklı moleküller veya mekanizmalar tarafından etkilenebileceği görülmektedir. Nitekim bu etki sonucunda gen ifadesinde görülen değişimin protein ifadesinde anlamlılık oluşturabilecek kadar etkili olmadığı da söylenebilecektir.

Öte yandan, M grubunu oluşturan RRMS hastalarının nötrofillerinden izole edilen bu proteinler, aslında, izole edildikleri nötrofillerin doğal yaşam döngülerini de yansıtmaktadır. Nötrofiller, yaşamsal fonksiyonları gereğince, doğal yollarla apoptozda giderler. Özellikle nötrofillerde görülen apoptoz sürecinde Bcl2 ailesinde yer alan gen ve proteinlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, Bcl2, Bax ve Bad proteinlerinin mRNA'larında ifade değişimi görülmüştür (Moulding vd., 2001). Ancak mRNA seviyesinde görülen değişimin protein seviyesinde karşılanmadığı görülmüştür. Apoptoz süreci tek başına hem hücre döngüsü gereğince etki gösterebileceği gibi çeşitli ajanlar ya da hücre içerisindeki çeşitli düzenlemelerden de etkilenebilir (Hsieh vd., 1997; Moulding vd., 2001). Bu durum da apoptoz sürecini hızlandırılabilir ya da geciktirilebilecektir. Özellikle çözilemeyen enflamasyon tepkisinde apoptozda görülen gecikmenin doku hasarına sebep olduğu da söylenmektedir (Hsieh vd., 1997). Bir diğer yandan bakıldığında ise proapoptotik genlerin nötrofillerde apoptozu hızlandırması da enflamasyonu baskılayarak bir homeoastazın kurulmasını sağlayacaktır. Bu sebeple proapoptotik ve antiapoptotik genlerin nötrofiller üzerinde oluşturduğu etkiler daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmalıdır. Proapoptotik bir gen olan *BCL2* mRNA seviyeleri, apoptozu geciktirecek olan antiapoptotik genler tarafından kontrol

edilebilir ya da translasyona geçiş süreçlerinde yavaşlama görölebilir. Hücre döngüsü temelinde bakıldığında



apoptoz süreci yalnızca antiapoptotik genlerin değil yaşamsal genlerin ifadesinden de etkilenmektedir.

Nötrofillerde yapılan çalışmalarda, proapoptotik genlerin mRNA'larında hücre içerisinde birikim görüldüğü ve bu birikim sonucunda artan mRNA seviyesinin artan transkripsiyondan kaynaklanmayıp hücrede görülen stabilizasyonun bir sonucu olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Moulding vd., 2001). Ayrıca, yaşamsal veya apoptotik genlerin sürekli ifadesinin olmaması durumunda, karşılaştırılan bu iki gen grubundan ifade seviyesinde artış görülen gen ürününün ifadesi hızlıca baskılanarak stabil dengenin yeniden sağlanması amacıyla çeşitli düzenleyici mekanizmaların da etki gösterdiği görülmüştür (Moulding vd., 2001; Ruvo vd., 2001).

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde anlamlı farklılık görülmemesinin DMF'nin miRNA'larla olan ilişkisindeki gibi çeşitli posttranskripsiyonel etkiler göstermesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, proapoptotik ve antiapoptotik özelliklere sahip *BCL2* ve *CASP3* genlerinde görülen ifadenin artışı, bu genlerin mRNA'larında görülen stabilizasyonla ilişkili olup artan transkripsiyondan kaynaklanmayacak şekilde protein düzeyinde bir karşılık bulmamış olması mümkündür. Bu durum, Bcl-2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında anlamlı bir fark oluşmamasını açıklayabilecektir.

Ek olarak, DMF'nin ROS ve antioksidan mekanizmalarla etkileşimi açısından apoptoz belirteçlerindeki değişimlerin incelendiği *in vitro* bir çalışmada, kolon kanseri hücre hatlarının DMF'ye maruz bırakılması sonrasında Bax, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bunun yerine, DMF'nin apoptozu değil, nekroptozu indüklediği bildirilmiştir (Xie vd., 2015). Bu bağlamda, bu tez çalışması sonucunda Bcl-2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleri açısından elde edilen sonuçların, hem nötrofillerin yaşam döngüsü hem de DMF'nin yer aldığı translasyonel ve transkripsiyonel mekanizmalar açısından literatürle uyumlu olduğu düşüncesine ek olarak, bu proteinlerin REL değerlerinde 0A, 3A ve 6A grupları arasında anlamlı bir fark görülmemesi nekroptozun da bir göstergesi olabilir.

4.5 M Grubunda Yapılan Korelasyon Analizleri

ER stresi ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değerleri ve Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimlerin EDSS puanı, total lezyon ve T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle ilişkisi incelenmiştir.

M grubunu oluşturan 0A, 3A ve 6A gruplarının her birine ait verilerin, grup içinde yapılan korelasyon analizleri incelendiğinde, üç grup içinde de ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri arasında, sinyal yolağının çalışma mekanizmasına uygun bir şekilde korelasyon olduğu görülmektedir (Çizelge 3.20, Çizelge 3.21, Çizelge 3.22). Korelasyon analizleri, ER stresi ve apoptoz belirteci genlerde görülen REL değerleri ve Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleriyle klinikten gelen EDSS puanı, total lezyon ve T2 lezyon sayısındaki değişimler açısından değerlendirildiğinde yalnızca 3A grubunda *ATF4* REL değeriyle total lezyon sayısı parametresi arasında, pozitif ilişki olmak üzere, korelasyon olduğu görülmüştür ($\rho=.555$, $P=.017$) (Çizelge 3.21). ER stres belirteci olan *ATF4* seviyesinin MS'li hastaların lezyonlarında daha fazla olduğu göz önüne alındığında (Cunnea vd., 2011) bulunan sonucun literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Boylamsal bir çalışma olan bu tez çalışmasından elde edilen her bir sonucun tekrarlı ölçümlere ait olduğu bilinmektedir. Bu durumda gerçekleştirilecek olan korelasyon analizlerinde birden fazla kez ölçülen değerlerin ortak değişimine dair ilişkisi, yalnızca basit korelasyon analizleriyle değil bireylerin farklı ölçüm dönemlerindeki değişimlerini de yansıtacak olan tekrarlı ölçümler korelasyonu da (repeated measures correlation-rmcorr) yansıtılmalıdır. Bu durumun en temel sebebi, Pearson ve Spearman korelasyon testlerinin gözlemler arasında bağımsızlık olduğunu varsaymasından kaynaklanır (Cohen vd., 2003; Bakdash & Marusich vd., 2017). Rmcorr analizi ise diğer korelasyon testlerinden farklı olarak bireyler arasındaki değişkenliğe bağlı varyansı kaldırılır. Böylece, her bir bireyin kendi tekrarlı ölçüm değerine dair en iyi doğrusal uyum belirlenmiş ve ölçümlerin bağımlı kabul edilmesi sağlanmış olur (Bakdash & Marusich vd., 2017).

ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin tedavi yanıtı kapsamında değerlendirildiği bu tez çalışmasında, özellikle bu belirteçlerin ifadenme seviyelerinde görülen değişimlerin,

klınikte tedavi yanıtı açısından değerlendirilen EDSS puanı, total lezyon ve T2 lezyon sayılarında görülen değişimlerle arasındaki ilişkinin araştırılması oldukça önemlidir.

Bu sayede elde edilen deneysel sonuçların klinikten gelen parametrelerle olan ilişkisinin ortak uyum dereceleri hakkında tedavi yanıtı kapsamında yorum yapabilmek mümkün hale gelecektir.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi ncesi (0A) ve tedavinin 3.ayını (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında klinik parametrelerde görülen değişimlerle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin ve proteinlerin REL değerlerinde görülen değişimlerin arasındaki ortak ilişkinin araştırılması amacı ile Rmcorr analizleri yapılmıştır (izelge 3.24, izelge 3.25, izelge 3.26, izelge 3.27, izelge 3.28).

0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanında görülen değişimle; *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinde görülen REL değişimi arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu görülürken, Kaspaz-3 proteininin REL değişimi arasında ise pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür (*ATF4*: $r=-.429$, $P=.005$, *BCL2*: $r=-.346$, $P=.026$, *CHOP*: $r=-.310$, $P=.011$, *PERK*: $r=-.392$, $P=.011$, Kaspaz-3: $r=.326$, $P=.037$) (izelge 3.23,

Çizelge 3.24). M grubunu oluşturan RRMS hastalarının 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda, EDSS puanlarında görülen istatistiksel olarak anlamlı düşüş ($P=.036$) her ne kadar post-hoc analizleri sonucunda kaybolda da hastaların EDSS puanlarında azalma olduğu bilinmektedir (izelge 3.2).

Rmcorr analizleri sonucunda, ER stres belirteçleri olan *ATF4*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerlerindeki değişimlerle EDSS puanındaki değişimler arasında negatif yönlü bir korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, 0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanında gözlenen düşüş eğilimine bağlı olarak, ilgili genlerin REL değerlerinde bir artış oluşması beklenmektedir. Benzer şekilde, Kaspaz-3 proteininin REL değişimi ile EDSS puanındaki değişim arasında saptanan pozitif yönlü ilişkiye bağlı olarak 0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanında gözlenen düşüş eğilimine karşı Kaspaz-3 proteininin REL değerinde bir artış oluşması gerektiği öngörülmektedir. Ancak 0A, 3A ve 6A grupları arasında *ATF4*,

CHOP ve *PERK* genlerinin REL değerlerinde (Çizelge 3.6) ve Kaspaz-3 proteininin REL değerinde (Çizelge 3.19) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemiştir (*ATF4*: $P=.204$,



CHOP: $P=.698$, *PERK*: $P=.135$, Kaspaz-3: $P=.462$). *BCL2* geninde görülen REL değeri değişimleriyle EDSS puanında görülen değişimler arasında oluşan negatif yönlü korelasyonda ise 0A, 3A ve 6A grupları arasında EDSS puanlarında görülen düşüş eğilimine karşın *BCL2* REL değerlerinde artış görülmesi beklenecektir. Nitekim, 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* REL değerinde görülen artış ($P=.034$) bu beklentiyi karşılamaktadır (Çizelge 3.6).

Bu noktada EDSS puanlarının subjektif bir değerlendirme yöntemi olmasının yanı sıra, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarının gruplar arasındaki karşılaştırmalarında görülen anlamlı farklılığın ($P=.036$), post-hoc analizlerinde anlamlı bir fark tespit edilememesi sonucunda yapılan uyum değerlendirmelerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. EDSS puanları için 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan uyum değerlendirmelerinde gruplar arasında düşük bir uyum ve yeterince büyük olmayan bir farkla karşılaşılmıştır (0A-3A: Cohen's $d=.320$, 3A-6A: Cohen's $d=.170$, 0A-6A: Cohen's $d=.170$, 0A-3A-6A Kendall's $W: W=.166$) (Çizelge 3.3).

Rmcorr analizleri sonucunda hesaplanan korelasyon katsayısının (r) mutlak değerinin 0 ve 1 arasında olması ve bu değer 1'e yakın olmasının incelenen ilişkinin güçlü olduğunu gösterdiği bilinmektedir. Bu durumda, olası bir ek açıklama olarak, EDSS puanındaki değişimler ile *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değişimleri ve Kaspaz-3 proteininin REL seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren Rmcorr analizlerinden elde edilen düşük korelasyon katsayısının (*ATF4*: $r=-.429$, *BCL2*: $r=-.346$, *CHOP*: $r=-.310$, *PERK*: $r=-.392$, Kaspaz-3: $r=.326$) 0A, 3A ve 6A grupları arasındaki EDSS puanı uyumu ve farklılık derecelerinden de etkilenmiş olabileceği söylenebilir. Rmcorr analizleri ile hesaplanan korelasyon katsayılarının (r) 0 ve 1 arasında 0'a daha yakın olduğu da görülmüş ve bu nedenle EDSS puanlarında görülen değişimle nötrofillerdeki *ATF4*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değişimleri ve Kaspaz-3 proteininin REL değişimi arasındaki ilişkinin güçlü olmadığı veya bu parametrelerinin tek başına oluşturduğu değişime ek olarak EDSS puanlarıyla beraber olan ilişkisinin farklı parametreler üzerinden araştırılması ya da ek analizlerle doğrulanması gerektiği düşünülebilir.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) görülen T2 lezyon sayılarındaki değişimle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişim ve Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelenmesi için de Rmcorr analizleri yapılmıştır (Çizelge 3.25, Çizelge 3.26). 0A, 3A ve 6A gruplarında görülen T2 lezyon sayısındaki değişimle ER stresi ve apoptoz belirteci genler içinden yalnızca *BCL2* geninde görülen REL değeri değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönlü bir korelasyon ($r=-.318$, $P=.042$) görülmüştür. Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değişimleriyle T2 lezyon sayısında görülen değişim arasında ise pozitif yönlü bir korelasyon olduğu görülmüştür (Bcl2: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$).

Bu çalışmada 6A grubunda 0A grubuna kıyasla hem *BCL2* REL değerinde anlamlı bir artış ($P=.034$) olduğu (Çizelge 3.6) hem de T2 lezyon sayılarında anlamlı bir düşüş ($P=.001$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Ayrıca, yine T2 lezyon sayılarında 3A grubunda 0A grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş ($P<.001$) olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2). M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin

3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) T2 lezyon sayılarındaki değişimle *BCL2* REL değerlerindeki değişimi yansıtan Rmcorr analizlerinden elde edilen sonuç ($r=-0.318$, $P=.042$), her iki parametrenin ayrı ayrı değerlendirildiği analiz sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, T2 lezyon sayısındaki anlamlı düşüşle *BCL2* REL değerindeki anlamlı artış arasında Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen negatif korelasyon açıklanabilmektedir. T2 lezyon sayılarında 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla görülen anlamlı düşüş (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$) hastalık aktivitesinde bir düşüş olarak kabul edilebilir. Antiapoptotik bir gen olan *BCL2* geninin REL değerinin nötrofillerde 6A grubunda 0A grubuna kıyasla artış göstermesi ($P=.034$) ise nötrofillerde enflamasyonun devam etmesi sonucu geciktirilen apoptozu yansıtıyor olabilir (Hsieh vd., 1997).

T2 lezyon sayılarında görülen değişimle Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleri arasındaki değişimi yansıtan anlamlı ve pozitif yönlü korelasyon (Bcl2: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$) her bir parametrenin ayrı ayrı incelendiği analiz sonuçlarıyla birlikte de değerlendirilmiştir. M grubunu oluşturan RRMS'li

hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile tedavinin 6.ayında (6A) belirlenen Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değeri gruplar arasında



karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı görülmüştür (Bcl2: $P=.915$, Kaspaz-3: $P=.462$). Daha önce de belirtildiği üzere RRMS'li hastaların T2 lezyon sayılarında 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$) görülmektedir (Çizelge 3.2). Bu durumda, 3A ve 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla T2 lezyon sayılarındaki anlamlı düşüşe karşılık, Rmcorr analizi sonucunda görülen pozitif korelasyonu (Bcl2: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$) yansıtabilecek biçimde Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde 0A, 3A ve 6A gruplarında anlamlı bir düşüş oluşması beklenecektir. Ancak, yukarıda da belirtildiği gibi proteinlerin REL değerleri arasında anlamlı fark görülmezken iki proteinin de REL değerlerinin ortalamalarında bir düşüş eğilimi olması dikkat çekicidir (Çizelge 3.19). T2 lezyon sayılarında görülen anlamlı düşüşün 0A grubuna kıyasla 3A ve 6A gruplarında olmasına benzer biçimde Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerine ait ortalamalar da 3A ve 6A grubunda 0A grubuna kıyasla düşüş eğilimi göstermektedir (Çizelge 3.19). Ortalama değerlerde görülen bu eğilim, direkt olarak REL değerlerinde görülen değişimi yansıtmasa dahi T2 lezyon sayılarındaki değişimle Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimin arasında oluşan pozitif korelasyonu destekler niteliktedir.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayında (3A) ile 6. ayında (6A) gerçekleştirilen MRG tetkikleri sonucunda belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimle ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerindeki değişim ve Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinde görülen REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelenmesi için de Rmcorr analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.27, Çizelge 3.28).

Yapılan analizler değerlendirildiğinde total lezyon sayısındaki değişimlerin ER stres ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değerlerinde görülen değişim arasında anlamlı bir ilişkiye sahip olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.27). Total lezyon sayılarında görülen değişim ile Bcl2 proteininin REL değerinde görülen değişim arasında anlamlı bir ilişki görülmezken ($r=.219$, $P=.167$), total lezyon sayılarında görülen değişim ile Kaspaz-3 proteininin REL değeri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür ($r=.370$, $P=.017$). M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında yapılan analizlerde hem total lezyon sayılarında ($P=.144$) hem de

Kaspaz-3 REL değerinde ($P=.462$)



anlamli bir fark oluşmadığı görülmektedir ( izelge 3.2,  izelge 3.19). Ancak her iki parametrenin 0A, 3A ve 6A grupları için hesaplanan ortalama değerlerinde düşüş eğilimi görülmektedir. Bu durumda hem total lezyon sayıları hem de Kaspaz-3 REL değerleri için hesaplanan ortalamalarda görülen düşüş eğilimi bu iki parametrenin değişimleri arasında oluşan pozitif korelasyonu açıklayıcı bir değerlendirme olarak kabul edilebilecektir.

Bu tez çalışması kapsamında, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi  ncesi (0A) ile tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. aylarına (6A) ait deneysel veriler ve klinik parametreler (EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı) arasındaki ilişkiyi belirlemek için gerçekleştirilen Rmcorr analizleri, ER stres ve apoptoz belirteci genler ile Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin DMF tedavisine yanıtını değerlendirmedeki potansiyel biyobelirteç olma durumlarını da değerlendirmektedir. Yapılan Rmcorr analizlerinde, 0A, 3A ve 6A gruplarında T2 lezyon sayıları ve total lezyon sayılarında görülen değişimlerle ER stres belirteci genlerin REL değerlerinde görülen değişimler arasında herhangi bir ilişki bulunmazken EDSS puanlarında görülen değişimin ER stres belirteçlerinden *ATF4*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerlerinde görülen değişimle arasında anlamlı bir korelasyon oluştuğu, fakat bu korelasyonun yeterince göçü bir ilişkiyi yansıtmadığı görülmektedir ( izelge 3.23,  izelge 3.25,  izelge 3.27). ER stres belirteçlerinin MS'de engellilik üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, EAE farelerinin dorsal kök ganglionlarındaki ER stres belirteçlerinde görülen artışın engelliliği arttırıcı yönde olduğu gösterilmiştir (Yousuf vd., 2020). Aynı zamanda, bu çalışmada yer alan araştırmacılar ER stresin artmasıyla klinik semptomlarla beraber EDSS puanında da artış görülebileceğini belirtmişlerdir.

Nitekim, literatürde yer alan ve MS'li hastaların gri madde lezyonlarındaki ER stres belirteçlerinin arttığını bildiren bir çalışmada (McMahon vd., 2012) hastaların yüksek EDSS puanına sahip olduğu da bilinmektedir. Bu durumda yüksek EDSS puanlarıyla ER stres belirteçlerinde görülen artış arasında pozitif bir korelasyon olduğu söylenebilir. Bu tez çalışması kapsamında M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar, 0A, 3A ve 6A dönemlerinde gerçekleşen klinik muayenelerinde düşük sakatlık derecesine karşılık gelecek EDSS puanlarına sahiptir. Bu bağlamda, ER stres belirteçlerinin REL değerlerindeki değişimle EDSS puanlarında görülen değişim

arasında güçlü bir ilişki olmaması, hali hazırda düşük olan EDSS puanlarının 0A, 3A ve 6A grupları arasında



da düşüş eğilimi göstermesiyle açıklanabilecektir. Ayrıca, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayıları ve T2 lezyon sayılarında artış görülmemesi (Çizelge 3.2) EDSS puanlarındaki düşüşle beraber bu hastalarda nispeten aktif bir progresyon olmadığını düşündürmektedir. Bu bağlamda, ER stres belirteçlerinin hastalık progresyonuyla olan ilişkisi baz alınarak T2 lezyon sayılarında ve total lezyon sayılarında görülen değişimin ER stres belirteçlerinin REL değerlerindeki değişimle anlamlı bir ilişkiye sahip olmaması da M grubunun sahip olduğu hastalık aktivitesinin derecesiyle açıklanabilecektir. Bu durumda RRMS hastalarının nötrofillerindeki ER stres belirteci genlerin REL değerlerindeki değişimlerin henüz erken evrede DMF tedavisine karşı geliştirilen yanıtı yansıtmada düşük hastalık progresyonuna bağlı olarak yetersiz kaldığı söylenebilir.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puan değişimleriyle *BCL2* REL değeri değişimleri arasında oluşan negatif yönlü korelasyon ($r=-.346$, $P=.026$), her iki parametrenin ayrı ayrı değerlendirildiği analizlerle de örtüşmektedir. Ayrıca, apoptoz belirteçleri ve EDSS puanı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada hastalık alevlenmesi olarak görülen atak dönemlerinde apoptotik genlerin REL değerlerinde görülen değişimle EDSS puanlarında görülen değişim arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Achiron vd., 2007). GA tedavisi altında apoptotik belirteçlerin tedavi yanıtını yansıtmaya potansiyelinin incelendiği bir çalışmada ise RRMS hastalarının PBMC'lerinde atak döneminde *BCL2* seviyelerinde görülen artışın EDSS puanıyla negatif bir korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir (Anselmo vd., 2020).

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların EDSS puanlarında görülen değişimle *BCL2* REL değerlerindeki değişim arasında oluşan negatif yönlü korelasyon sonucunun literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Apoptotik belirteçlerin immün sistem hücrelerinde görülen ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler doğrudan enflamasyonla ilişkilendirilmektedir. Ancak bu değişimin tek başına nöronal apoptozu tetiklemediği ya da MSS'de lezyon oluşumuna katkı sağlamadığı bilinmektedir (DeBiasi vd., 2002; Banisor & Kalman 2004).

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen RRMS'li hastalardaki T2 lezyon

sayılarındaki değişimle *BCL2* REL değerlerindeki değişimler arasında negatif

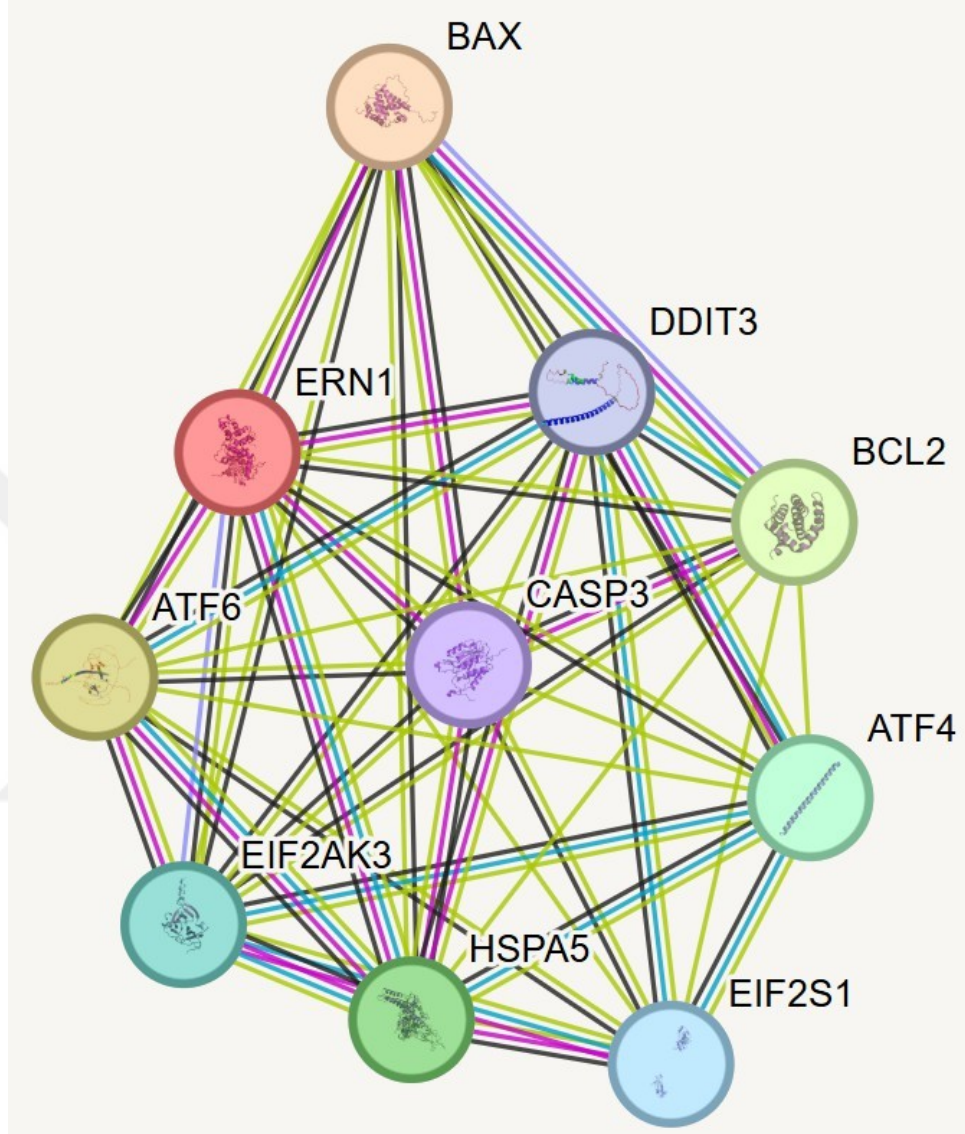


korelasyon, Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişim arasında pozitif korelasyon ve ayrıca total lezyon sayılarında görülen değişimle Kaspaz-3 proteini REL değerinde görülen değişim arasında pozitif bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda, RRMS'li hastalardaki T2 lezyon sayılarında görülen değişim ve total lezyon sayılarında görülen değişimin nötrofillerden elde edilen apoptotik belirteçlerin REL değerlerindeki değişimle arasında doğrudan olmayan bir etkileşim sergilenmektedir. Nötrofillerin, NHDT gibi fonksiyonlarında enflamasyona bağlı görülen artış ve sonlanmayan enflamasyonda geciktirilen apoptoz sürecinin geciktirilmesi gibi süreçlerle doku hasarına sebep olması ve ayrıca RRMS'li hastalarda daha fazla bulunmasına ek olarak KBB'yi geçmeleri bu doğrudan olmayan etkileşimi değerlendirmede önemli ipuçları sunmaktadır (Hsieh vd., 1997; Naegel vd., 2012; De Bondt vd., 2020).

4.6 *In silico* Analizler

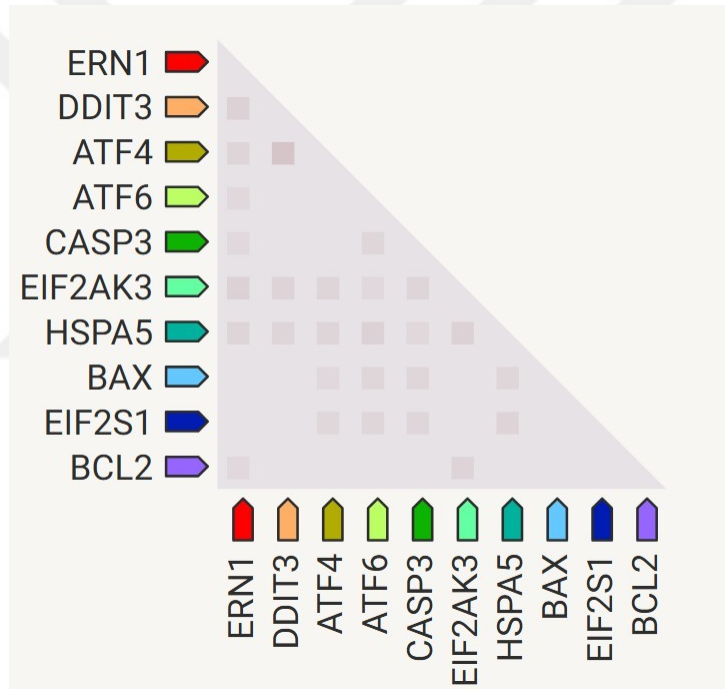
Bu tez çalışması kapsamında REL değişimleri incelenen ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin birbirleriyle olan ilişkisinin incelendiği *in silico* analizler STRING veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. STRING veri tabanı üzerinden çoklu protein sekmesi seçilerek bu tez çalışması kapsamında incelenen ER stresi ve apoptoz belirteçlerine dair bir haritalandırma (Şekil 4.1) yapılmıştır. Şekil 4.1'de de görülebileceği gibi ER stres mekanizmasında yer alan proteinlerin apoptoz sürecine dahil olan proteinlerle de ilişkisi bulunmaktadır. Görülen bu ilişki proteinlerin birbirlerine bağlandıkları çizgilerin renklerine göre açıklanmaktadır. STRING veri tabanı kullanılarak oluşturulan bu haritada; mavi renk proteinlerin kurduğu etkileşimleri araştıran global veri tabanı ağlarından elde edilen bilgileri içermektedir. Şekil 4.1'de pembe renk ile gösterilen etkileşim ağları, literatürden gelen deneysel veriler aracılığıyla etkileşimlerin daha çok tahminlere dayandırıldığını, siyah renkte yapılan incelemeler bu proteinlerin aynı anda, ortak bir şekilde ifade edildiğini bildirir. Bcl2, Kaspaz-3 ve Bax proteinleri apoptoz sürecinde bir arada çalışan proteinlerdir. Dolayısıyla, bu proteinler arasında pembe renkli etkileşim ağının görülmesi beklenen bir durumu yansıtmaktadır. Proapoptotik bir protein olan Chop ile Atf6 arasında görülen etkileşim ise KPY tepkisine bağlı tetiklenen ER stres mekanizması içerisinde yer almaktadır. Bu durum hali hazırda literatürde, artan *ATF6* ekspresyon seviyesine bağlı olarak *CHOP*

transkripsiyonunda düzenleme yapıldığını gösteren bir çalışma ile de örneklenmiştir (Walter vd., 2018). Ayrıca, *ATF4* mRNA'sının translasyonunda görülen artışa eşit bir şekilde *CHOP* geninde de ifade artışı görüldüğü bilinmektedir (Schöntal vd., 2012).



Şekil 4.1: STRING veri tabanı üzerinden ER stresi ve apoptoz belirteci olan proteinlerin birbirleriyle olan ilişkilerini gösteren harita. (ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4, ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6, BAX: Bcl2 ilişkili X proteini (Bcl2 associated X protein), BCL2: B hücreli lenfoma 2 (B cell leukemia 2), CASP3: Kaspaz-3 (Caspase-3), DDIT3: DNA hasarı tetiklenebilir transkript 3 (DNA Damage Inducible Transcript 3- CHOP olarak da bilinmektedir), EIF2AK3: ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2-alfa kinaz 3 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 - PERK olarak da bilinmektedir), EIF2S1: ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eukaryotic translation initiation factor 2), ERN1: ER'den çekirdeğe sinyal iletimi 1 - endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 – IRE1 olarak da bilinmektedir), HSPA5: ısı şoku proteini ailesi A üye 5 (heat shock protein family A member 5-GRP78 olarak da bilinmektedir) (URL-1)

Protein-protein etkileşimine göre literatür üzerinden de örneklendiği üzere grupların içerisinde yer alan ER stresi ve apoptoz belirteci proteinlerin birbirleri arasında oluşturdukları etkileşim STRING veri tabanında çizdirilen haritanın da doğruluğunu belirtmektedir. Ayrıca, gösterilen bu etkileşimlere ek olarak, Şekil 4.1 içerisinde siyah renkli etkileşim ağları aynı anda ifadelenen proteinlerin olduğunu göstermektedir. Ancak bu ortak ifadelenme durumunu yalnızca etkileşim ağlarıyla açıklamak yeterli olmayacaktır. STRING veri tabanında yer alan bir diğer özellik ortak etkileşimleri olan proteinler arasında bir ısı haritası (heatmap) oluşturulmasıdır (Şekil 4.2). Oluşturulan bu haritalandırma sayesinde her bir proteinin ortak ifadelenme ihtimallerine dair bir skor hesaplatmak da mümkündür (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2: STRING veri tabanı üzerinden oluşturulan ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin ortak ifadelenme durumlarını yansıtan ısı haritası. ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4, ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6, BAX: Bcl2 ilişkili X proteini (Bcl2 associated X protein), BCL2: B hücreli lenfoma 2 (B cell leukemia 2), CASP3: Kaspaz-3 (Caspase-3), DDIT3: DNA hasarı tetiklenebilir transkript 3(DNA Damage Inducible Transcript 3- CHOP olarak da bilinmektedir), EIF2AK3: ökaryotik translayon başlatıcı faktör 2-alfa kinaz 3 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 - PERK olarak da bilinmektedir), EIF2S1: ökaryotik translayon başlatıcı faktör 2 (eukaryotic translation initiation factor 2), ERN1: ER'den çekirdeğe sinyal iletimi 1 - endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 – IRE1 olarak da bilinmektedir), HSPA5: ısı şoku proteini A ailesi (heat shock protein family A- GRP78 olarak da bilinmektedir) (URL-2)

Şekil 4.2’de verilen ortak ifadelenme ısı haritasında üçgenin içerisinde yer alan koyu renkteki noktalar ortak ifadelenme skorunun daha yüksek olduğunu söylemektedir. Tüm hedef belirteçler için elde edilen ortak ifadelenme skoru Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1: ER stresi ve apoptoz belirteçlerinin STRING veri tabanından elde edilen ortak ifadelenme skoru

Belirteçler	Ortak İfadelenme Skoru
Atf4-Bax	.042
Atf4-Chop	.187
Atf4-eIF2 α	.045
Atf4-Ire1	.056
Atf4-Perk	.057
Atf6- Kaspaz-3	.049
Atf6-Bax	.049
Atf6-eIF2 α	.060
Atf6-Grp78	.074
Atf6-Ire1	.044
Atf6-Perk	.042
Bax- Kaspaz-3	.049
Bax-Grp78	.049
Bcl2-Ire1	.055
Bcl2-Perk	.073
Chop-Grp78	.057
Chop-Perk	.073
Grp78- eIF2 α	.094
Ire1- Kaspaz-3	.059
Ire1-Chop	.084
Ire1-Grp78	.057
Ire1-Perk	.128
Perk- eIF2 α	.049
Perk-Grp78	.088
Perk-Kaspaz-3	.069

Ortak ifadelenme skor değerinin 1’e olan yakınlığı bir arada değerlendirilen genlerin veya proteinlerin ortak ifadelenme gücünü yansıtacaktır. Genler veya proteinler için ortak ifadelenme süreçlerinin değerlendirilmesi hastalıkların karakteristik özelliklerini

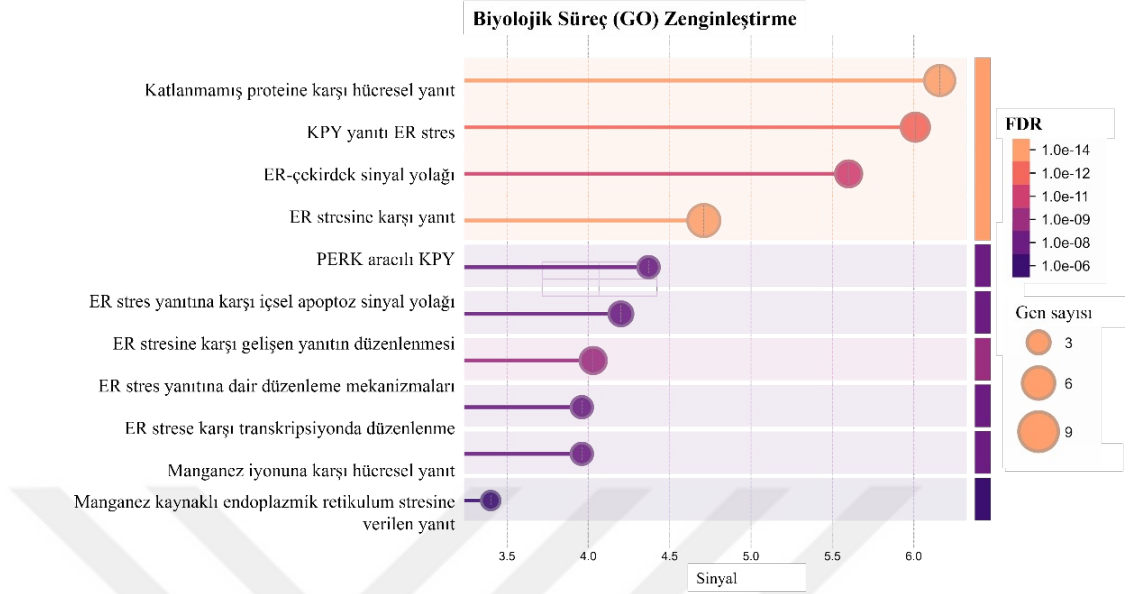
veya özellikle kompleks organizmalarda protein-protein etkileşimlerini anlamada bir araç olarak kullanılmaktadır (Vella vd., 2017). Ancak bu etkileşimleri anlamak için tek başına ortak ifadelenme analizleri yapmak yeterli olmayacaktır.

Biyoinformatik değerlendirmelerden biri olan gen ontolojisi (gene ontology-GO); biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlar ve hücre bileşenlerini tanımlamak üzere kullanılan bir sistemdir (Thomas vd., 2019). Şekil 4.2’de verilen ortak ifadelenme ısı haritasında üçgenin içerisinde yer alan koyu renkteki kareler ortak ifadelenme skorunun daha yüksek olduğunu söylemektedir. Tüm hedef belirteçler için elde edilen ortak ifadelenme skoru Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Ortak ifadelenme skor değerinin 1’e olan yakınlığı bir arada değerlendirilen genlerin veya proteinlerin ortak ifadelenme gücünü yansıtacaktır. Bu durumda Çizelge 4.1 incelendiğinde en yüksek ortak ifadelenme skorunun Atf4 ve Chop proteinleri arasında (.187) olduğu görülmektedir.

Genler veya proteinler için ortak ifadelenme süreçlerinin değerlendirilmesi hastalıkların karakteristik özelliklerini veya özellikle kompleks organizmalarda protein-protein etkileşimlerini anlamada bir araç olarak kullanılmaktadır (Vella vd., 2017).

STRING veri tabanı aracılığıyla bu tez çalışması kapsamında hedeflenen ER stresi ve apoptoz belirteçleri için çeşitli GO değerlendirmelerinden elde edilen ve biyolojik süreçlerle ilişkilendirilen bir görsel model elde edilmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen biyolojik zenginleştirme verilerine ek olarak, sinyal yolağı içerisinde yer alan proteinlerin birbirleriyle kurdukları etkileşimler için de STRING veri tabanında yer alan zenginleştirme analizlerine dair P değerine ulaşılmıştır ($P < 1.0E^{-16}$) (Şekil 4.2). Protein-protein etkileşimlerine dair elde edilen bu değer ($P < 1.0E^{-16}$) gerçekleşen etkileşimlerin anlamlı bir şekilde kurulduğunu göstermektedir (Wu vd., 2009; Thomas 2019). Nitekim, bu tez çalışması kapsamında hedeflenen genler, temelde KPY sonrasında tetiklenen ER stres ve stres durumunun baskılanmamasının sonucu olarak tetiklenen apoptoz sürecini anlatan büyük ve kapsamlı bir sinyal yolağında yer almaktadır. Dolayısıyla, tüm bu proteinler arasında kurulan etkileşim ağları (Şekil 4.1) ya da bu proteinler için hesaplanan ortak ifadelenme dereceleri çoklu testler sonucunda hesaplanan değerleri belirtir. Bu bağlamda, çoklu hipotez testlerinde görülebilecek

yanlış pozitif sonuçları kontrol etmek için yanlış keşif oranı (false discovery rate-FDR) hesaplanır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: STRING veri tabanı üzerinden elde edilen biyolojik süreç (GO) zenginleştirme analizlerinden elde edilen görsel (GO: gen ontoloji-gene ontology, FDR: yanlış keşif oranı- false discovery rate) (URL-3)

Şekil 4.3 incelendiğinde, STRING veri tabanı tarafından biyolojik zenginleştirmenin istatistiksel olarak doğruluğunu gösteren FDR'nin sunulduğu görülmektedir. Yapılan biyolojik zenginleştirme analizlerinde FDR değerinin ≤ 0.05 olması bu analizlerin istatistiksel olarak güvenilir sonuç verdiğini gösterir (Nano vd., 2022).

Bu tez çalışmasında, M grubunda yer alan 20 RRMS hastasının ER stres genlerinin REL değerleriyle apoptoz belirteci genlerinin REL değerleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan korelasyon testlerinde iki gen grubunun REL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür (Çizelge 3.20, Çizelge 3.21, Çizelge 3.22).

Temel olarak, STRING veri tabanı üzerinden elde edilen değerlendirmeler sonucunda gerçekleşen bu etkileşimlerin rastgele olmadığı görülürken deneysel verilerin kullanıldığı korelasyon analizlerinden gelen sonuçların veri tabanından elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu söylenebilir.

4.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasının amacı, ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin RRMS'li hastalarda DMF tedavisine karşı gelişen yanıtı erken evrede yansıtmada biyobelirteç olma potansiyellerinin değerlendirilmesidir.

Bu amaçla, öncelikle M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar, DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin REL değerleri 0A, 3A ve 6A grupları arasında karşılaştırılmıştır. Bu analizler sonucunda 6A grubunda 0A grubuna kıyasla *BCL2* ve *CASP3* genlerinde görülen istatistiksel olarak anlamlı artışa ($P=.034$) bağlı bir şekilde Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerleri yine 0A, 3A ve 6A grupları arasında karşılaştırılmıştır. Sonrasında ise ER stresi ve apoptoz belirteci genler ve Bcl2, Kaspaz-3 proteinlerinin potansiyel biyobelirteç olma durumlarını değerlendirmek için bu parametrelerin REL değerlerinde görülen değişimlerle EDSS puanları, T2 lezyon sayıları ve total lezyon sayılarında görülen değişimler arasındaki ilişkiyi belirlemek adına, her bir parametre için ayrı ayrı olmak üzere Rmcorr analizleri yapılmıştır.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A grupları arasında gerçekleştirilen analizler sonucunda ER stres belirteçlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (*ATF4*: $P=.204$, *ATF6*: $P=.238$, *CHOP*: $P=.698$, *PERK*: $P=.135$, *eIF2 α* : $P=.837$, *IRE1*: $P=.341$, *GRP78*: $P=.540$). Ayrıca, ER stres belirteçlerinin REL değerlerindeki değişimle EDSS puanlarında görülen değişim, T2 lezyon sayılarında görülen değişim ve total lezyon sayılarında görülen değişim arasında anlamlı bir korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.25, Çizelge 3.27, Çizelge 3.29).

Bu tez çalışması kapsamında oluşturulan M grubunda yer alan RRMS'li hastaların 0A, 3A ve 6A grupları arasında yapılan EDSS puanı, T2 lezyon ve total lezyon sayılarında yapılan karşılaştırmalar neticesinde, EDSS puanında görülen anlamlı düşüş ($P=.036$) ve T2 lezyon sayılarında 3A ile 6A gruplarında 0A grubuna kıyasla görülen anlamlı düşüş (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$) bu hastaların hastalık progresyonunun düşük olduğuna dair bir yansıma olarak kabul edilebilir. Ayrıca, M grubunu oluşturan 20 RRMS hastasının DMF tedavisi öncesi ve tedavinin 6.ayına kadar takip edildikleri süre boyunca yalnızca birinde atak öyküsünün görülmesi de

yapılan bu progresyon



yorumunu destekleyecektir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında M grubunu oluşturan hastaların toplamda 6 ay süreyle takip edilmesi ve bu sürede görülen düşük hastalık progresyonu ER stres belirteçlerinin erken evrede tedavi yanıtını yansıtmada yetersiz olduğunu göstermektedir. M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların *BCL2* ve *CASP3* genlerinin DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen REL değerlerinde 6A grubunda 0A grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği görülmektedir ($P=.034$). Elde edilen bu sonuçlar, literatürde yer alan artan enflamasyonun nötrofillerde apoptozu geciktirmek amacıyla *BCL2* seviyesinde meydana getirdiği artış (Carrington vd., 2021) ve DMF'nin enflamasyonu baskılayacak şekilde *CASP* gen ailesini tetiklemesiyle (Förster vd., 2013) uyumludur. Nötrofillerin yaşamsal genler ve apoptotik genler arasında hücre içerisinde oluşturduğu stabilizeye bağlı olarak apoptotik genlerin mRNA seviyesinde görülen artışın veya düşüşün her zaman transkripsiyondan kaynaklanmıyor oluşu (Moulding vd., 2001; Ruvolo vd., 2001) ya da DMF'nin posttranskripsiyonel etkisi sebebiyle (Buscaglia vd., 2011; Giuliani vd., 2021) Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği düşünülmektedir (Bcl2: $P=.915$, Kaspaz-3: $P=.462$).

Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar neticesinde *BCL2* REL değerlerinde görülen değişimle EDSS puanlarında görülen değişim arasında negatif korelasyon görülmüştür ($r=-.346$, $P=.026$). Bu sonuca ek olarak, T2 lezyon sayılarında görülen değişimle *BCL2* geninin REL değerlerinde görülen değişim arasında negatif korelasyon görülmüştür ($r=-.318$, $P=.042$). Ayrıca, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinde görülen REL değerlerinin değişimiyle T2 lezyon sayılarında görülen değişim arasında pozitif korelasyon oluşmuştur (Bcl2: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$). Ek olarak, total lezyon sayılarında görülen değişimle Kaspaz-3 proteininin REL değerlerindeki değişim arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğu da görülmüştür ($r=.370$, $P=.017$). Sonuç olarak *BCL2* geninde görülen REL değişimleri klinik parametrelerde görülen (EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı) değişimler arasındaki ilişkinin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca, Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde görülen değişimlerin klinik parametrelerde görülen (EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı)

değişimler arasındaki ilişkinin ise ek moleküllerin analiziyle doğrulanması gerekecektir.

Genel olarak M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6. ayında (6A) belirlenen apoptoz belirteci REL değerleri üzerinden yapılan analizler değerlendirildiğinde, 6A grubunda 0A grubuna kıyasla nötrofillerde görülen *BCL2* REL artışı ($P=.034$) MS'deki enflamasyon sürecinin devam ettiğini düşündürürken, *CASP3* REL değerinde görülen artışın ($P=.034$) ise DMF'nin nötrofillerdeki apoptozu tetikleyerek enflamasyonu baskılamak üzere oluşturduğu etkiyi yansıttığı yorumu yapılabilir. Aynı zamanda, DMF tedavisi sonucunda hastaların EDSS puanlarında ve T2 lezyon sayılarında görülen düşüş, yalnızca 1 hastanın atak geçirmesi DMF tedavisinin klinik parametreler üzerindeki erken dönemde oluşan olumlu etkileri olarak da görülürse apoptoz belirteçlerinin RRMS'de erken evrede tedavi yanıtını yansıtmada umut vaat ettiği görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

MS, gelişen otoimmünite ve demiyelinizasyon sonucunda MSS’de görülen nöroenflamatuar ve nörodejeneratif bir hastalıktır (Polman vd., 2011; Filippi vd., 2018). MS tedavisinde, hastalığın kesin bir çözümle sonlandırılmasından ziyade hastalık seyrini etkileyen DMT grubu ilaçlarla hastalığın semptomatik etkilerinin baskılanması ya da kümülatif birikiminin önüne geçilmesi hedeflenir (Dobson & Giovanni, 2019; McGinley vd., 2021). Bu kapsamda, hastalık süresince görülen atakların sıklığı ve şiddeti DMT grubu ilaçların immün sistemi baskılaması ya da modüle etmesiyle azaltılmaya çalışılır. MS’de tedavi yanıtının değerlendirilmesi oldukça önemli bir unsurdur. Daha önce belirtildiği gibi, EDSS puanlarında ani ve geri döndürülemez bir ilerleme meydana gelmeden önce hastaların uygun tedaviye yönlendirilmesi gerekmektedir (Leray vd., 2010).

Günümüzde klinik uygulamalarda, atak sıklığının takibi, MRG tetkikleri, tam kan ve biyokimya testleri gibi değerlendirmelerin yanı sıra Nab’lar ve L-selektin ifade seviyesi gibi biyobelirteçler de MS’de tedavi yanıtını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Bielekova & Martin, 2004; Housley vd., 2015). Ancak erken evrede tedavi yanıtını yansıtacak ek biyobelirteçlerin araştırılmasına günümüzde hala ihtiyaç duyulmaktadır (Yang vd., 2022).

Nötrofillerin MS patogeneze katkı sağladıkları bilinmektedir (Naegle vd., 2012). ER stres nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen bir parametredir (Ma vd., 2013) ve MS’li hastaların lezyonlarında ER stres belirteçlerinin ifadelerinde artış olduğu bilinmektedir (Mhaille vd., 2008; Cunnea vd., 2011; McMahon vd. 2012; Ní Fhlathartaigh vd., 2013). ER stres ve enflamasyon arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmalarda T hücreleri, oligodendrositler ve mikrogliyalarda ER stres belirteçlerinin seviyelerinde artış görülmüştür. Ayrıca, ER stres nörodejeneratif hastalıklar dışında otoimmün hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Lee vd., 2015; Ahmadiany vd., 2019).

DMT grubu ilaçların 1.basamağında yer alan DMF, immünmodülatör özellikte bir ilaçtır. Nöroprotektif özelliğine ek olarak, Nrf2 ilişkili bir şekilde antioksidan sinyal

mekanizmasını düzenleme ve hücrel apoptozu indüklemeye özelliklerine sahiptir. Ayrıca, nötrofillerin doğal fonksiyonlarından biri olan NDHT oluşumunu inhibe eder. DMF'nin immün sistem ile ilişkili etkilerine ek olarak, ER streste modülasyon etkisi gösterdiği ve gelişen strese bağlı olarak apoptoz yollarında aktivasyon meydana getirdiği bilinmektedir (Yadav vd., 2019; Müller vd., 2016; Yao vd., 2016).

Bu tez çalışmasının amacı; RRMS hastalarının nötrofillerinde görülen ER stres ve apoptoz belirteci olan genlerin REL değerlerinin DMF tedavisine karşı gelişen yanıtı erken evrede yansıtmaya potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Bu kapsamda, bu tez çalışmasında M grubunu oluşturan RRMS'li hastalar DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayını (3A) 6.ayında (6A) takip edilerek tekrarlı ölçümlerin oluşturulması sağlanmış ve çalışmanın boylamsal yapısı oluşturulmuştur.

Bu kapsamda, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar özetlenerek aşağıda sıralanmıştır:

- M grubunu oluşturan RRMS hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) v tedavinin 3.ayını (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanları, 0A, 3A ve 6A grupları arasında karşılaştırıldığında puanlarda anlamlı bir düşüş görülmüştür ($P=.036$).
- M grubunu oluşturan RRMS hastalarının T2 lezyon sayıları 0A, 3A ve 6A grupları arasında karşılaştırıldığında ise DMF tedavisine bağlı zaman noktalarına karşılık oluşturulan 3A ve 6A gruplarında DMF tedavisi öncesini belirten 0A grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmüştür (3A: $P<.001$, 6A: $P=.001$).
- Bu tez çalışması kapsamında K (kontrol) grubunu oluşturan sağlıklı bireylerden ve M grubunu oluşturan RRMS hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) alınan kanlarından izole edilen nötrofillerindeki ER stresi ve apoptoz belirteci genlerinin REL değerleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($ATF4$: $P=.785$, $ATF6$: $P=.453$, BAX : $P=.215$, $BCL2$: $P=.629$, $CASP3$: $P=.701$, $CHOP$: $P=.237$, $PERK$: $P=.312$, $eIF2\alpha$: $P=.649$, $IRE1$: $P=.590$, $GRP78$: $P=.609$).
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayını (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen ER stres belirteci genlerinin REL değerleri 0A, 3A ve 6A grupları arasında karşılaştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıkla karşılaşılmamıştır ($ATF4$: $P=.204$,

ATF6: $P=.238$, *BAX*: $P=.277$, *CHOP*: $P=.698$, *PERK*: $P=.135$, *eIF2 α* : $P=.837$, *IRE1*: $P=.341$, *GRP78*: $P=.540$).

- Apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde görülen değişimin saptanması için M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) oluşturulan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde 6A grubunda 0A grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (*BCL2*: $P=.034$, *CASP3*: $P=.034$).
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarına göre oluşturulan $EDSS \leq 1.5$ ve $EDSS > 1.5$ grupları arasında ER stres ve apoptoz belirteci genlerin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisinin 6.ayını ifade eden 6A grubunda, kontrast tutan lezyonu olan kişilerde kontrast tutan lezyonu olmayanlara kıyasla *eIF2 α* REL değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($P=.038$).
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastalarının DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında oluşturulan gruplar arasında Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı (Bcl2: $P=.915$, Kaspaz-3: $P=.462$) görülmüştür.
- DMF tedavisinin hastaların klinik değerlendirmeleriyle olan ilişkisinin incelenmesi amacıyla yapılan korelasyon analizlerinde öncelikle 0A, 3A ve 6A grupları tek tek değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda yalnızca 3A grubunda *ATF4* REL değeriyle total lezyon parametresi arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($\rho=.555$, $P=.017$).
- Rmcorr analizleri sonucunda, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay (3A) ile 6.ayında (6A) EDSS puanında görülen değişimle *ATF4*, *BCL2*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerlerindeki değişim arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (*ATF4*: $r=-.429$, $P=.005$, *BCL2*: $r=-.346$, $P=.026$, *CHOP*: $r=-.310$, $P=.011$, *PERK*: $r=-.392$, $P=.011$).

- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarında görülen değişimle Kaspaz-3 proteinin REL değerindeki değişim arasında ise pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür (Kaspaz-3: $r=.326$, $P=.037$).
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) T2 lezyon sayılarında görülen değişimle *BCL2* REL değerinde görülen değişim arasında negatif yönde bir korelasyon ($r=-.318$, $P=.042$) olduğu görülmüştür. 0A, 3A ve 6A grupları arasında T2 lezyon sayısında görülen değişimin Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerlerindeki değişimle arasında ise pozitif yönlü bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Bcl2: $r=.364$, $P=.019$, Kaspaz-3: $r=.332$, $P=.033$).
- M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ay1 (3A) ile 6.ayında (6A) total lezyon sayılarında görülen değişimle Kaspaz-3 proteinin REL değeri değişimi arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r=.370$, $P=.017$).

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, nötrofillerdeki ER stresi ve apoptoz belirteci genlerin RRMS hastalarının DMF tedavisine verdikleri yanıtın yansıtılmasında potansiyel biyobelirteç olma durumları açısından literatürle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Literatürde ER stres ve MS ilişkisini anlatan çalışmalarda, genel olarak EDSS puanı yüksek olan PPMS ve SPMS'li hastaların veya hastalık süresi minimum 8 yıl olan hastalardan postmortem dönemde alınan lezyonlarının kullanıldığı ya da MS'nin deneysel bir modeli olan EAE'li fareler üzerinde çalışmalar yapıldığı görülmüştür (Mhaille vd., 2008; Cunnea vd., 2011; McMahon vd. 2012; Ní Fhlathartaigh vd., 2013). Ayrıca, EDSS puanı ve ER stres arasındaki ilişkinin ortaya konduğu bir çalışmada da ER stres belirteçlerinde görülen artışın artan engellilikle ilişkili olduğu gösterilmektedir (Yousuf vd., 2020). Bu tezde M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisinin 3. ayı (3A) ile 6. ayında (6A) takip edildikleri süre boyunca EDSS puanlarında ve T2 lezyon sayılarında görülen düşüş veya toplamda 6 ay süren bu takip sürecinde yalnızca 1 hastanın atak öyküsünün olması hastalığın yavaş progresyon göstermesi olarak yorumlanabilir. Bu bağlamda, çalışmamızdaki M grubunun ER stres belirteçlerinde artış tespit edilmemesinin nedeni hastaların progresyon göstermemesi veya tedaviye yanıt vermesi olarak görülebilir.

Potansiyel biyobelirteç adayı olarak değerlendirilen moleküllerin, MS'nin klinik seyri sırasında ortaya çıkan sakatlık düzeyinin değerlendirildiği EDSS puanı ve MSS'de görülen lezyonlarla da ilişkisinin incelenmesi ilgili biyobelirtecine tedavi yanıtını yansıtmaya gücünü belirlemeye katkı sağlayacaktır (Yang vd., 2022). M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisinin 3. ayında oluşturdıkları 3A grubunda *ATF4* REL değerinin total lezyon parametresiyle arasında görülen pozitif korelasyon literatürle uyumludur. Ancak, *ATF4*, *CHOP* ve *PERK* REL değerlerinin M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3. ayı (3A) ile

6. ayında (6A) gösterdikleri değişimle EDSS puanında görülen değişim arasındaki negatif korelasyon ilişkisinin gücünü arttırmak için daha büyük gruplarda ek incelemeler yapılmalıdır. Nitekim, ER stres belirteçlerinde artış tespit edilememesi ve ER stres belirteçlerinde görülen değişimin klinik parametrelerle olan ilişkisinin düşük güçte olması, çalışmamızdaki RRMS hastaları için ER stres belirteçlerinin erken evrede tedavi yanıtını yansıtmada yetersiz kaldığını gösteriyor olabilir.

M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisinin 6. ayına karşılık gelen 6A grubunda naif oldukları veya yeni teşhis aldıkları zaman noktasına karşılık gelen 0A grubuna kıyasla *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($P=0.034$). MS'li hastaların PBMC'lerinde *BCL2* gen ifadesinde görülen artışın EDSS puanıyla negatif korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca literatürdeki bir çalışmaya göre MS'li hastaların atak periyotlarında EDSS puanlarında görülen değişimin apoptotik genlerin ifade seviyesindeki değişimle ilişkili olduğu bilinmektedir (Achiron vd., 2007; Anselmo vd., 2020). Fakat immün sistem elemanlarında görülen apoptotik genlerde meydana gelen değişimlerin doğrudan enflamasyonla ilişkili olduğu ve MSS'de lezyon oluşumuna direkt katkı sağlamadıkları da bilinmektedir (DeBiasi vd., 2002; Banisor & Kalman 2004). Bu bağlamda, çalışmamızda elde ettiğimiz klinik parametrelerde (EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı) görülen değişimle nötrofillerdeki *BCL2* REL değerinde görülen değişim arasındaki ilişkinin literatürle olan uyumu dikkat çekmektedir. Ancak, nötrofillerdeki *CASP3* REL değerinde görülen değişimle klinik parametrelerde (EDSS puanı, T2 lezyon sayısı ve total lezyon sayısı) görülen değişim arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Rmcorr analizleri sonucunda nötrofillerdeki Bcl2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin REL değerinde görülen değişimlerle EDSS puanı ve T2 lezyon

sayılarında görülen değişim arasında



istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerin var olduğu saptanmıştır. Bu durumda *CASP3* geninin REL değişimi ve Kaspaz-3 proteininin REL değişimine ait Rmcorr analizlerinin sonuçlarındaki farklılıkları açıklamak için PTM süreçlerini de kapsayan ek yolak analizlerinin yapılması faydalı olacaktır. Ayrıca, ek apoptotik belirteçlerin incelenmesi veya çeşitli miRNA'ların ifade seviyelerinin ya da nötrofiller üzerindeki etkisinin araştırılması RRMS'li hastaların nötrofillerinde DMF tedavisi altında değişen apoptotik dengenin daha iyi anlaşılmasına ışık tutacaktır.

Literatürde daha önce RRMS'li hastaların nötrofillerinde ER stres ve apoptoz belirteci genlerin ifade seviyelerini araştıran ve bu parametrelerin DMF'nin tedavi yanıtıyla ilişkisinin bir arada değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda, bu tez çalışması RRMS'li hastalarda DMF tedavisine verilen yanıtı yansıtmada nötrofillerdeki ER stres ve apoptoz belirteci genlerin biyobelirteç olma potansiyelleri incelemesi yönünden özgün bir değere sahiptir. Bu çalışma, *BCL2* ve *CASP3* genlerinin REL değerleri ile *BCL2* geni, Kaspaz-3 ve Bcl2 proteinlerinin klinik parametrelerle gösterdiği anlamlı ilişkinin önemine ve apoptoz belirteçlerinin tedavi yanıtını yansıtan potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilmesine işaret etmektedir.

Temel olarak çalışmamızda elde edilen sonuçlara dair gelecekte daha geniş kapsamlı ve daha büyük bir popülasyonda gerçekleştirilecek olan araştırmalar, MS hastalarında tedavi yanıtına dair potansiyel biyobelirteç adaylarının belirlenmesinde önem arz edecektir. Ayrıca, bu kapsamda yapılan çalışmalardan elde edilecek olan sonuçlar hastalığın ilerleyen yıllarda gelişme ihtimali olan progresyonunun daha önceden tahmin edilmesine de katkı sağlayacaktır. Yapılacak olan ek çalışmalarla ortaya çıkarılacak olan biyobelirteçlerin vücut içerisinde takibinin yapılmasında çeşitli biyosensörlerin oluşturulması veya gelecekte MS tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek olan akıllı ilaç teknolojilerinde hedeflemenin yapılmasını mümkün hale getirebilecektir. Sonuç olarak, bu tez çalışması RRMS'li hastaların nötrofillerinde ER stres ve apoptoz belirteci genlerin DMF tedavi yanıtı kapsamında incelendiği ilk çalışma olup, MS'de tedavi etkinliğinin erken dönemde belirlenmesinde biyobelirteç, tanı kiti ve biyosensör geliştirme stratejileri açısından Biyomedikal Mühendisliği alanına katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, K. A., Lichtman, H. A., & Pillai, S.** (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8.Baskı).
- Abad, A. S. S., Falanji, F., Ghanbarabadi, M., Rad, A., Nazemi, S., Pejhan, A., & Amin, B.** (2019). Assessment of anti-nociceptive effect of allopurinol in a neuropathic pain model. *Brain Research*, 1720, 146238.
- Abd El-Fatah, I. M., Abdelrazek, H. M., Ibrahim, S. M., Abdallah, D. M., & El-Abhar, H. S.** (2021). Dimethyl fumarate abridged tauo-/amyloidopathy in a D-Galactose/ovariectomy-induced Alzheimer's-like disease: Modulation of AMPK/SIRT-1, AKT/CREB/BDNF, AKT/GSK-3 β , adiponectin/Adipo1R, and NF- κ B/IL-1 β /ROS trajectories. *Neurochemistry International*, 148, 105082.
- Abdallah, D. S. A., Egan, C. E., Butcher, B. A., & Denkers, E. Y.** (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International Immunology*, 23(5), 317–326. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr007>
- Achiron, A., Feldman, A., Mandel, M., & Gurevich, M.** (2007). Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107(1), 155- 167.
- Ahmadiany, M., Alavi-Samani, M., Hashemi, Z., Moosavi, M. A., & Rahmati, M.** (2019). The increased RNase activity of IRE1 α in PBMCs from patients with rheumatoid arthritis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(3), 505.
- Al-Kuraishy, H. M., Jabir, M. S., Al-Gareeb, A. I., Saad, H. M., Batiha, G. E. S., & Klionsky, D. J.** (2024). The beneficial role of autophagy in multiple sclerosis: yes or no?. *Autophagy*, 20(2), 259-274.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P.** (2006). *Molecular Biology of The Cell* (19.sayı, 5.Baskı).
- Allen, C., Thornton, P., Denes, A., McColl, B. W., Pierozynski, A., Monestier, M., Pinteaux, E., Rothwell, N. J., & Allan, S. M.** (2012). Neutrophil Cerebrovascular Transmigration Triggers Rapid Neurotoxicity through Release of Proteases Associated with Decondensed DNA. *The Journal of Immunology*, 189(1), 381–392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200409>

- Alter, A., Duddy, M., Hebert, S., Biernacki, K., Prat, A., Antel, J. P., Yong, V. W., Nuttall, R. K., Pennington, C. J., Edwards, D. R., & Bar-Or, A. (2003).** Determinants of Human B Cell Migration Across Brain Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*, 170(9), 4497–4505. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4497>
- Andhavarapu, S., Mubariz, F., Arvas, M., Bever Jr, C., & Makar, T. K. (2019).** Interplay between ER stress and autophagy: a possible mechanism in multiple sclerosis pathology. *Experimental and molecular pathology*, 108, 183-190.
- Anselmo, F., Tatomir, A., Boodhoo, D., Mekala, A. P., Nguyen, V., Rus, V., & Rus, H. (2020).** JNK and phosphorylated Bcl-2 predict multiple sclerosis clinical activity and glatiramer acetate therapeutic response. *Clinical Immunology*, 210, 108297.
- Antony, J. M., Ellestad, K. K., Hammond, R., Imaizumi, K., Mallet, F., Warren, K. G., & Power, C. (2007).** The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *The Journal of Immunology*, 179(2), 1210-1224.
- Appleman, L. J., Puijenbroek, A. A. F. L. Van, Shu, K. M., Nadler, L. M., & Boussiotis, V. A. (2002).** CD28 Costimulation Mediates Down-Regulation of p27. *Cell Cycle*, 1.
- Aratani, Y. (2018).** Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 640(December 2017), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Arnold, D. L., Li, D., Hohol, M., Chakraborty, S., Chankowsky, J., Alikhani, K., ... & Kremenchutzky, M. (2015).** Evolving role of MRI in optimizing the treatment of multiple sclerosis: Canadian Consensus recommendations. *Multiple Sclerosis Journal—Experimental, Translational and Clinical*, 1, 2055217315589775.
- Babaei, H., Kheirollah, A., Ranjbaran, M., Cheraghzadeh, M., Sarkaki, A., & Adelipour, M. (2023).** Preconditioning adipose-derived mesenchymal stem cells with dimethyl fumarate promotes their therapeutic efficacy in the brain tissues of rats with Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 672, 120-127.
- Bäärnhielm, M., Hedström, A. K., Kockum, I., Sundqvist, E., Gustafsson, S. A., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2012).** Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: No interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *European Journal of Neurology*, 19(7), 955–962. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03650.x>

- Baguley, T.** (2009). Standardized or simple effect size: What should be reported? *British journal of psychology*, 100(3), 603-617.
- Banisor, I., & Kalman, B.** (2004). Bcl-2 and its homologues in the brain of patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 10(2), 176-181.
- Bankoti, J., Apeltsin, L., Hauser, S. L., Allen, S., Albertolle, M. E., Witkowska, H. E., & Von Büdingen, H. C.** (2014). In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Annals of Neurology*, 75(2), 266–276. <https://doi.org/10.1002/ana.24088>
- Bakdash, J. Z., & Marusich, L. R.** (2017). Repeated measures correlation. *Frontiers in Psychology*, 8(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00456>
- Bashir, S., Banday, M., Qadri, O., Bashir, A., Hilal, N., Nida-i-Fatima, Rader, S., & Fazili, K. M.** (2021). The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sciences*, 265(November 2020), 118740. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118740>
- Beauvillain, C., Cunin, P., Doni, A., Scotet, M., Jaillon, S., Loiry, M. L., Magistrelli, G., Masternak, K., Chevailler, A., Delneste, Y., & Jeannin, P.** (2011). CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*, 117(4), 1196–1204. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254490>
- Becklund, B. R., Severson, K. S., Vang, S. V., & DeLuca, H. F.** (2010). UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6418–6423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001119107>
- Benz, F., & Liebner, S.** (2020). Structure and Function of the Blood–Brain Barrier (BBB). In *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 3–31).
- Berer, K., Mues, M., Koutrolas, M., AlRasbi, Z., Boziki, M., Johnner, C., Wekerle, H., & Krishnamoorthy, G.** (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479(7374), 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10554>
- Bhattacharya, A., & Eissa, N. T.** (2015). Autophagy as a stress response pathway in the immune system. *International reviews of immunology*, 34(5), 382-402.
- Bielekova, B., & Martin, R.** (2004). Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, 127(7), 1463–1478. <https://doi.org/10.1093/brain/awh176>

- Boise, L. H., Boise, L. H., Minn, A. J., Minn, A. J., Noel, P. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Accavitti, M. A., Lindsten, T., Lindsten, T., & Thompson, C. B.** (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3(1), 87–98. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7621080&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/9115F254-4810-4F23-A5F1-579A7102DE75>
- Bomprezzi, R.** (2015). Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 8(1), 20-30.
- Booth, L., Cruickshanks, N., Tavallai, S., Roberts, J. L., Peery, M., Poklepovic, A., & Dent, P.** (2014). Regulation of dimethyl-fumarate toxicity by proteasome inhibitors. *Cancer Biology and Therapy*, 15(12), 1646–1657. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.967992>
- Bosco-Lévy, P., Debouverie, M., Brochet, B., Guillemin, F., Louapre, C., Maillart, E., ... & Droz-Perroteau, C.** (2022). Comparative effectiveness of dimethyl fumarate in multiple sclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(3), 1268-1278.
- Bøyum, A.** (1976). Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 5, 9–15. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.1976.TB03851.X>
- Brannigan, A. E., O'Connell, R. P., Hurley, H., O'Neill, A., Brady, H. R., Fitzpatrick, J. M., ... & Watson, G.** (2000). Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock*, 13(5), 361-366.
- Bretscher, P. A.** (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 185–190. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.185>
- Brewer, J. W., & Diehl, J. A.** (2000). PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12625–12630. <https://doi.org/10.1073/pnas.220247197>
- Briukhovetska, D., Dörr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C. A., & Kobold, S.** (2021). Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(8), 481–499. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00363-z>
- Brownlee, W. J., & Miller, D. H.** (2014). Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(12), 2065–2071. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.02.026>

- Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I. M., Åkesson, E., Palmgren, J., & Hillert, J.** (2007). HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 2(7), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000664>
- Bugl, S., Wirths, S., Müller, M. R., Radsak, M. P., & Kopp, H. G.** (2012). Current insights into neutrophil homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266(1), 171–178. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06607.x>
- Buscaglia, L. E. B., & Li, Y.** (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer*, 30(6), 371.
- By Jo Van Damme, Jozef Van Beeumen, Ghislain Opdenakker, A., & Billiau, A.** (1988). A Novel, NH2-Terminal Sequence-Characterized Human Monokine Possessing Neutrophil Chetactic, Skin Reactive, And Granuloytosis-Promoting Activity. 167(April), 1364–1376.
- Campione, E., Mazzilli, S., Di Prete, M., Dattola, A., Cosio, T., Lettieri Barbato, D., ... & Bianchi, L.** (2022). The role of glutathione-S transferase in psoriasis and associated comorbidities and the effect of dimethyl fumarate in this pathway. *Frontiers in Medicine*, 9, 760852.
- Caramelo, J. J., Castro, O. A., De Prat-Gay, G., & Parodi, A. J.** (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46280–46285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408404200>
- Caramelo, J. J., & Parodi, A. J.** (2008). Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10221–10225.
- Carrington, E. M., Louis, C., Kratina, T., Hancock, M., Keenan, C. R., Iannarella, N., ... & Lew, A. M.** (2021). BCL-XL antagonism selectively reduces neutrophil life span within inflamed tissues without causing neutropenia. *Blood Advances*, 5(11), 2550–2562.
- Cassan, C., & Liblau, R. S.** (2007). Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: From animal models to MS patients. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), 883–892. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04270.x>
- Chard, D. T., Griffin, C. M., McLean, M. A., Kapeller, P., Kapoor, R., Thompson, A. J., & Miller, D. H.** (2002). Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain*, 125(10), 2342–2352. <https://doi.org/10.1093/brain/awf240>
- Charil, A., & Filippi, M.** (2007). Inflammatory demyelination and neurodegeneration in early multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 259(1–2), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.08.017>

- Chastain, E. M. L., Duncan, D. S., Rodgers, J. M., & Miller, S. D.** (2011). The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.008>
- Chen, Yani, & Brandizzi, F.** (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in Cell Biology*, 23(11), 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005>
- Chen, Yunzi, Liu, W., Sun, T., Huang, Y., Wang, Y., Deb, D. K., Yoon, D., Kong, J., Thadhani, R., & Li, Y. C.** (2013). 1,25-Dihydroxyvitamin D Promotes Negative Feedback Regulation of TLR Signaling via Targeting MicroRNA-155– SOCS1 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3687–3695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203273>
- Cheng, Q., Wang, X., Shen, Y., Shen, Y., Zu, B., Xu, J., ... & Wang, J.** (2014). Deficiency of IRE1 and PERK signal pathways in systemic lupus erythematosus. *The American journal of the medical sciences*, 348(6), 465–473.
- Chitnis, T., & Prat, A.** (2020). A roadmap to precision medicine for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(5), 522–532. <https://doi.org/10.1177/1352458519881558>
- Chou, Y. T., Zhan, G., Zhu, Y., Fenik, P., Panossian, L., Li, Y., ... & Veasey, S.** (2013). C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model. *Sleep*, 36(4), 481–492.
- Comi, G., Bar-Or, A., Lassmann, H., Uccelli, A., Hartung, H. P., Montalban, X., Sørensen, P. S., Hohlfeld, R., & Hauser, S. L.** (2021). Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Annals of Neurology*, 89(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/ana.25927>
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreu, T., & Adeline, P.** (2003). RELAPSES AND PROGRESSION OF DISABILITY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *The New England Journal of Medicine*, 337(12), 1–7.
- Cosh, A., & Carslaw, H.** (2014). Multiple sclerosis: Symptoms and diagnosis. *Clinical Pharmacist*, 1(11), 435–442. <https://doi.org/10.1177/175573801455161>
- Croxford, A. L., Lanzinger, M., Hartmann, F. J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B. E., Jung, S., Greter, M., & Becher, B.** (2015). The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*, 43(3), 502–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.010>

- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A.** (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003>
- Cunnea, P., Mháille, A. N., McQuaid, S., Farrell, M., McMahon, J., & Fitzgerald, U.** (2011). Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(7), 808–818. <https://doi.org/10.1177/1352458511399114>
- C. Stefani, I., Wright, D., M. Polizzi, K., & Kontoravdi, C.** (2012). The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, 9(3), 373-387.
- Dalton, C. M., Chard, D. T., Davies, G. R., Miskiel, K. A., Altmann, D. R., Fernando, K., Plant, G. T., Thompson, A. J., & Miller, D. H.** (2004). Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain*, 127(5), 1101–1107. <https://doi.org/10.1093/brain/awh126>
- Danilczyk, U. G., Cohen-Doyle, M. F., & Williams, D. B.** (2000). Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 13089–13097. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.13089>
- DeBiasi, R. L., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Richardson-Burns, S., & Tyler, K. L.** (2002). Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *The Journal of infectious diseases*, 186(11), 1547-1557.
- De Bondt, M., Hellings, N., Opdenakker, G., & Struyf, S.** (2020). Neutrophils: Underestimated players in the pathogenesis of multiple sclerosis (ms). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms21124558>
- De Masi, R., & Orlando, S.** (2021). GANAB as a Novel Biomarker in Multiple Sclerosis: Correlation with Neuroinflammation and IFI35. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1195.
- Demir, S., Toğrol, R. E., Sonkaya, A. R., & Tuncel, T.** (2015). A Case Followed as Having Multiple Sclerosis but Diagnosed with Secondary Brain Lymphoma. *Türk Nöroloji Dergisi*, 21(3), 131–134. <https://doi.org/10.4274/tn.70845>
- Demirci, S., Demirci, S., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H. R., & Yurekli, V. A.** (2016). The clinical significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in multiple sclerosis. *International Journal of Neuroscience*, 126(8), 700-706.

- Dobson, R., & Giovannoni, G.** (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Dziedzic, A., Michlewska, S., Jóźwiak, P., Dębski, J., Karbownik, M. S., Łaczmański, Ł., ... & Saluk, J.** (2024). Quantitative and structural changes of blood platelet cytoskeleton proteins in multiple sclerosis (MS). *Journal of Autoimmunity*, 145, 103204.
- Efendi, H., & Yandım Kuşçu, D.** (2018). Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2018. In *Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu* (Vol. 1). www.galenos.com.tr
- Eldh, M., Lötvall, J., Malmhäll, C., & Ekström, K.** (2012). Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, 50(4), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.02.001>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G., & Lang, A. G., & Buchner, A.** (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175–191.
- Fites, J. S., Gui, M., Kernien, J. F., Negoro, P., Dagher, Z., Sykes, D. B., Nett, J. E., Mansour, M. K., & Klein, B. S.** (2018). An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007073>
- Fitzgerald, K. C., Munger, K. L., Köchert, K., Arnason, B. G. W., Comi, G., Cook, S., Goodin, D. S., Filippi, M., Hartung, H. P., Jeffery, D. R., O'Connor, P., Suarez, G., Sandbrink, R., Kappos, L., Pohl, C., & Ascherio, A.** (2015). Association of Vitamin D levels with multiple sclerosis activity and progression in patients receiving interferon Beta-1b. *JAMA Neurology*, 72(12), 1458–1465. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2742>
- Förster, A., Preussner, L. M., Seeger, J. M., Rabenhorst, A., Kashkar, H., Mrowietz, U., & Hartmann, K.** (2013). Dimethylfumarate induces apoptosis in human mast cells. *Experimental dermatology*, 22(11), 719–724.
- Garcia, K. C., Degano, M., Pease, L. R., Huang, M., Peterson, P. A., Teyton, L., & Wilson, I. A.** (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science*, 279(5354), 1166–1172. <https://doi.org/10.1126/science.279.5354.1166>
- Gelfand, J. M.** (2014). Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 122, pp. 269–290). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00011-X>

- Gerwien, H., Hermann, S., Zhang, X., Korpos, E., Song, J., Kopka, K., Faust, A., Wenning, C., Gross, C. C., Honold, L., Melzer, N., Opdenakker, G., Wiendl, H., Schäfers, M., & Sorokin, L.** (2016). Imaging matrix metalloproteinase activity in multiple sclerosis as a specific marker of leukocyte penetration of the blood-brain barrier. *Science Translational Medicine*, 8(364), 1–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8020>
- Getts, M. T., Getts, D. R., Kohm, A. P., & Miller, S. D.** (2008). Endoplasmic reticulum stress response as a potential therapeutic target in multiple sclerosis. *Therapy*, 5(5), 631.
- Giovannoni, G., Turner, B., Gnanapavan, S., Offiah, C., Schmierer, K., & Marta, M.** (2015). Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(4), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.04.006>
- Giuliani, A., Lattanzi, S., Ramini, D., Graciotti, L., Danni, M. C., Procopio, A. D., ... & Sabbatinelli, J.** (2021). Potential prognostic value of circulating inflamma- miR-146a-5p and miR-125a-5p in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 54, 103126.
- Gold, R., Giovannoni, G., Phillips, J. T., Fox, R. J., Zhang, A., Meltzer, L., & Kurukulasuriya, N. C.** (2015). Efficacy and safety of delayed-release dimethyl fumarate in patients newly diagnosed with relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS). *Multiple Sclerosis Journal*, 21(1), 57–66.
- Goldman, M. D., Dwyer, L., Coleman, R., Sohn, M. W., & Stuve, O.** (2020). Patient-specific factors modulate leukocyte response in dimethyl fumarate treated MS patients. *PLoS ONE*, 15(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228617>
- Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J., & Pizzo, S. V.** (2009). GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(9), 2299–2306. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2568>
- Guarnieri, B., Lolli, F., & Amaducci, L.** (1985). Polymorphonuclear neutral protease activity in multiple sclerosis and other diseases. *Annals of Neurology*, 18(5), 620– 622. <https://doi.org/10.1002/ana.410180519>
- Gupta, A., Al-Dasuqi, K., Xia, F., Askin, G., Zhao, Y., Delgado, D., & Wang, Y.** (2017). The use of noncontrast quantitative MRI to detect gadolinium-enhancing multiple sclerosis brain lesions: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Neuroradiology*, 38(7), 1317–1322.

- Halliday, N., Williams, C., Kennedy, A., Waters, E., Pesenacker, A. M., Soskic, B., Hinze, C., Hou, T. Z., Rowshanravan, B., Janman, D., Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2020). CD86 Is a Selective CD28 Ligand Supporting FoxP3⁺ Regulatory T Cell Homeostasis in the Presence of High Levels of CTLA-4. *Frontiers in Immunology*, 11(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600000>
- Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J. P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B. J., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2009). IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell*, 138(3), 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2011). Smoking and multiple sclerosis: An updated meta-analysis. *PLoS ONE*, 6(1), 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
- Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., ... & Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular cell*, 7(6), 1153–1163.
- Hassab, L. Y., Abbas, S. S., Mohammed, R. A., & Abdallah, D. M. (2023). Dimethyl fumarate abrogates striatal endoplasmic reticulum stress in experimentally induced late-stage Huntington's disease: Focus on the IRE1 α /JNK and PERK/CHOP trajectories. *Frontiers in Pharmacology*, 14(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1133863>
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*, 133(12), 1380–1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Healy, B., Ali, E. N., Guttman, C. R., Chitnis, T., Glanz, B. I., Buckle, G., Houtchens, M., Stazzone, L., Moodie, J., Berger, A. M., Duan, Y., Bakshi, R., Weiner, H. L., & Alberto, A. (2009). Smoking and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*, 66(7), 858–864.

- Hedström, A. K., Bomfim, I. L., Barcellos, L., Gianfrancesco, M., Schaefer, C., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L.** (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*, 82(10), 865–872. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000203>
- Hedström, A. K., Sundqvist, E., Bäärnhielm, M., Nordin, N., Hillert, J., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L.** (2011). Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*, 134(3), 653–664. <https://doi.org/10.1093/brain/awq371>
- Hegen, H., Schleiser, M., Gneiss, C., Di Pauli, F., Ehling, R., Kuenz, B., Lutterotti, A., Berger, T., & Deisenhammer, F.** (2012). Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation. *Multiple Sclerosis Journal*, 18(5), 610–615. <https://doi.org/10.1177/1352458511426738>
- Hertwig, L., Pache, F., Romero-Suarez, S., Stürner, K. H., Borisow, N., Behrens, J., Bellmann-Strobl, J., Seeger, B., Asselborn, N., Ruprecht, K., Millward, J. M., Infante-Duarte, C., & Paul, F.** (2016). Distinct functionality of neutrophils in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(2), 160–173. <https://doi.org/10.1177/1352458515586084>
- Hirz, T., & Dumontet, C.** (2016). Neutrophil isolation and analysis to determine their role in lymphoma cell sensitivity to therapeutic agents. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(109), 1–9. <https://doi.org/10.3791/53846>
- Hoffmann, J. H. O., Schäkel, K., Hartl, D., Enk, A. H., & Hadaschik, E. N.** (2018). Dimethyl fumarate modulates neutrophil extracellular trap formation in a glutathione-and superoxide-dependent manner. *British Journal of Dermatology*, 178(1), 207-214.
- Hogquist, K. A., Baldwin, T. A., & Jameson, S. C.** (2005). Central tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 772–782. <https://doi.org/10.1038/nri1707>
- Hollifield, R. D., Harbige, L. S., Pham-Dinh, D., & Sharief, M. K.** (2003). Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity*, 36(3), 133-141.
- Hoozemans, J. J. M., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A. I., Rozemuller, J. M., & Scheper, W.** (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(3), 707–711. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.043>
- Hsieh, S. C., Huang, M. H., Tsai, C. Y., Tsai, Y. Y., Tsai, S. T., Sun, K. H., ... & Yu, C. L.** (1997). The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*, 233(3), 700-706.

- Huang, T., Long, M., & Huo, B.** (2010). Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 4(1), 271–278. <https://doi.org/10.2174/1874120701004010271>
- Hurwitz, B. J.** (2009). The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 12(4), 226–230. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.58276>
- Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A.** (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences*, 226(April), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022>
- Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K., & Glimcher, L. H.** (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-I. *Nature Immunology*, 4(4), 321–329. <https://doi.org/10.1038/ni907>
- Kalincik, T., Cutter, G., Spelman, T., Jokubaitis, V., Havrdova, E., Horakova, D., ... & Butzkueven, H.** (2015). Defining reliable disability outcomes in multiple sclerosis. *Brain*, 138(11), 3287–3298.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E.** (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Karagöz, G. E., Acosta-Alvear, D., Nguyen, H. T., Lee, C. P., Chu, F., & Walter, P.** (2017). An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *ELife*, 6, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.30700>
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., & Yamamoto, M.** (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells*, 6(10), 857–868.
- Khan, A., Shal, B., Khan, A. U., Bibi, T., Zeeshan, S., Zahra, S. S., ... & Khan, S.** (2023). Suppression of MAPK/NF-κB and activation of Nrf2 signaling by Ajugarin-I in EAE model of multiple sclerosis. *Phytotherapy Research*, 37(6), 2326–2343.
- Kim, H. Y.** (2015). Statistical notes for clinical researchers: effect size. *Restorative dentistry & endodontics*, 40(4), 328–331.
- Kostic, M., Dzopalic, T., Zivanovic, S., Zivkovic, N., Cvetanovic, A., Stojanovic, I., ... & Colic, M.** (2014). IL-17 and glutamate excitotoxicity in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Scandinavian journal of immunology*, 79(3), 181–186.
- Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R., & Meinl, E.** (2012). B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 8(11), 613–623. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.203>

- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L.** (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kurtzke, J. F.** (2015). Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.02.003>
- L Bishop, E., Ismailova, A., Dimeloe, S., Hewison, M., & White, J. H.** (2021). Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*, 5(1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10405>
- Lee, W. S., Sung, M. S., Lee, E. G., Yoo, H. G., Cheon, Y. H., Chae, H. J., & Yoo, W. H.** (2015). A pathogenic role for ER stress-induced autophagy and ER chaperone GRP78/BiP in T lymphocyte systemic lupus erythematosus. *Journal of Leucocyte Biology*, 97(2), 425–433.
- Lei, T., Yu, L., Qin, L., Xu, B., Zhou, L., Cheng, J., ... & Wan, Z.** (2016). Stress kinases, endoplasmic reticulum stress, and Alzheimer's disease related markers in peripheral blood mononuclear cells from subjects with increased body weight. *Scientific Reports*, 6(1), 30890.
- Legendre, P.** (2005). Species associations: the Kendall coefficient of concordance revisited. *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics*, 10, 226–245.
- Lehtinen, M. K., Zappaterra, M. W., Chen, X., Yang, Y. J., Hill, A. D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., D'Ercole, A. J., Wong, E. T., LaMantia, A. S., & Walsh, C. A.** (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron*, 69(5), 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.023>
- Leng, Q., & Bentwich, Z.** (2002). Beyond self and nonself: Fuzzy recognition of the immune system. *Scandinavian Journal of Immunology*, 56(3), 224–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01105.x>
- Leray, E., Yaouanq, J., Le Page, E., Coustans, M., Laplaud, D., Oger, J., & Edan, G.** (2010). Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*, 133(7), 1900–1913. <https://doi.org/10.1093/brain/awq076>
- Li, X., He, S., & Ma, B.** (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*, 19(1), 12.
- Lin, R., Cai, J., Kostuk, E. W., Rosenwasser, R., & Iacovitti, L.** (2016). Fumarate modulates the immune/inflammatory response and rescues nerve cells and neurological function after stroke in rats. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0733-1>

- Lin, W., & Stone, S.** (2020). Unfolded protein response in myelin disorders. *Neural regeneration research*, 15(4), 636-645.
- Linker, R. A., Lee, D. H., Ryan, S., van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., ... & Gold, R.** (2011). Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*, 134(3), 678-692.
- Litjens, N. H. R., Burggraaf, J., Van Strijen, E., Van Gulpen, C., Mattie, H., Schoemaker, R. C., Van Dissel, J. T., Thio, H. B., & Nibbering, P. H.** (2004). Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(4), 429-432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02145.x>
- Loma, I., & Heyman, R.** (2011). Multiple sclerosis: pathogenesis and models. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 75(3), 164. <https://doi.org/10.1007/s001090050100>
- Longbrake, E. E., Naismith, R. T., Parks, B. J., Wu, G. F., & Cross, A. H.** (2015). Dimethyl fumarate-associated lymphopenia: risk factors and clinical significance. *Multiple Sclerosis Journal—Experimental, Translational and Clinical*, 1, 2055217315596994.
- Louapre, C., & Lubetzki, C.** (2015). Neurodegeneration in multiple sclerosis is a process separate from inflammation: Yes. *Multiple Sclerosis Journal*, 21(13), 1626-1628. <https://doi.org/10.1177/1352458515587598>
- Lourenco, M. V., Clarke, J. R., Frozza, R. L., Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Batista, A. F., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Amaral, O. B., Silva, C. A., Freitas-Correa, L., Espírito-Santo, S., Campello-Costa, P., Houzel, J. C., Klein, W. L., Holscher, C., Carnevali, J. B., Silva, A. M., Velloso, L. A., ... De Felice, F. G.** (2013). TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metabolism*, 18(6), 831-843. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.002>
- Ma, T., Trinh, M. A., Wexler, A. J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D. R., & Klann, E.** (2013). Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nature Neuroscience*, 16(9), 1299-1305. <https://doi.org/10.1038/nn.3486>
- Macpherson, A. J., De Agüero, M. G., & Ganai-Vonarburg, S. C.** (2017). How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 508-517. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.58>
- Magyari, M., & Koch-Henriksen, N.** (2022). Quantitative effect of sex on disease activity and disability accumulation in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 93(7), 716-722.

- Mahmood, T., & Yang, P. C.** (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Marozzi, M.** (2014). Testing for concordance between several criteria. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 84(9), 1843–1850.
- Maqbool, M., Vidyadaran, S., George, E., & Ramasamy, R.** (2011). Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. *Medical Journal of Malaysia*, 66(4), 296–299.
- McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F.** (2019). Introduction to the Immune System. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2024, pp. 1–24). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1
- McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H., & Rae-Grant, A. D.** (2021). Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: a review. *Jama*, 325(8), 765–779.
- McMahon, J. M., McQuaid, S., Reynolds, R., & FitzGerald, U. F.** (2012). Increased expression of ER stress-and hypoxia-associated molecules in grey matter lesions in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 18(10), 1437–1447.
- Megiovanni Maria, A., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J. C., & Boudaly, S.** (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells : a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes and mutually influence the two leukocyte populations occurring upstream of the interactions between. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(May), 977–988. <https://doi.org/10.1189/jlb.0905526.1>
- Melchers, F., & Rolink, A. R.** (2006). B cell tolerance - How to make it and how to break it. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 305, pp. 1–23). https://doi.org/10.1007/3-540-29714-6_1
- Mercadante, A., & Tadi, P.** (2020). Neuroanatomy, Gray Matter. *Neuroanatomy*.
- Mhaille, A. N., McQuaid, S., Windebank, A., Cunnea, P., McMahon, J., Samali, A., & FitzGerald, U.** (2008). Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(3), 200–211. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318165b239>
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., & Filippi, M.** (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: Natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurology*, 4(5), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70071-5)
- Miossec, P.** (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and Infection*, 11(5), 625–630. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.003>

- Montes Diaz, G., Fraussen, J., Van Wijmeersch, B., Hupperts, R., & Somers, V.** (2018). Dimethyl fumarate induces a persistent change in the composition of the innate and adaptive immune system in multiple sclerosis patients. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26519-w>
- Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J.** (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *The Protein Society*, 27(12), 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>
- Morrison, P. J., Suhrkamp, I., Gerdes, S., & Mrowietz, U.** (2021). Oral dimethyl fumarate induces changes within the peripheral neutrophil compartment of patients with psoriasis that are linked with skin improvement. *British Journal of Dermatology*, 185(3), 605-615.
- Moslem, S., Ghorbanzadeh, O., Blaschke, T., & Duleba, S.** (2019). Analysing stakeholder consensus for a sustainable transport development decision by the fuzzy AHP and interval AHP. *Sustainability*, 11(12), 3271.
- Mostert, J. P., Koch, M. W., Steen, C., Heersema, D. J., De Groot, J. C., & De Keyser, J.** (2010). T2 lesions and rate of progression of disability in multiple sclerosis. *European journal of neurology*, 17(12), 1471-1475.
- Moulding, D. A., Akgul, C., Derouet, M., White, M. R., & Edwards, S. W.** (2001). BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, 70(5), 783-792.
- Mrowietz, U., Morrison, P. J., Suhrkamp, I., Kumanova, M., & Clement, B.** (2018). The Pharmacokinetics of Fumaric Acid Esters Reveal Their In Vivo Effects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.002>
- MSIF 2020.** (n.d.). <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>
- Mungan, S., Guzel, I., & Demirdogen, B. C.** (2023). Association between Expanded Disability Status Scale score and dietary antioxidant capacity in patients with multiple sclerosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 56, 1–5. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12776>
- Munger, K. L., Bentzen, J., Laursen, B., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Sørensen, T. I. A., & Baker, J. L.** (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: A long-term cohort study. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(10), 1323–1329. <https://doi.org/10.1177/1352458513483889>
- Müller, S., Behnen, M., Bieber, K., Möller, S., Hellberg, L., Witte, M., Hänsel, M., Zillikens, D., Solbach, W., Laskay, T., & Ludwig, R. J.** (2016). Dimethylfumarate impairs neutrophil functions. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), 117–126. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.361>

- Naegele, M., Tillack, K., Reinhardt, S., Schippling, S., Martin, R., & Sospedra, M.** (2012). Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *Journal of Neuroimmunology*, 242(1–2), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.11.009>
- Nano, J., Schöttker, B., Lin, J. S., Huth, C., Ghanbari, M., Garcia, P. M., ... & Thorand, B.** (2022). Novel biomarkers of inflammation, kidney function and chronic kidney disease in the general population. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37(10), 1916–1926.
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N.** (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Navikas, V., & Link, H.** (1996). Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research*, 45(4), 322–333.
- Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L.** (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host and Microbe*, 25(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
- Ní Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., & FitzGerald, U.** (2013). Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta neuropathologica communications*, 1, 1–15.
- Nikbin, B., Bonab, M. M., Khosravi, F., & Talebian, F.** (2007). Role of B Cells in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *International Review of Neurobiology*, 79(07), 13–42. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)79002-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)79002-5)
- Noseworthy, J. H.** (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*, 399(6738), A40–A47.
- Ntranos, A., Ntranos, V., Bonnefil, V., Liu, J., Kim-Schulze, S., He, Y., ... & Casaccia, P.** (2019). Fumarates target the metabolic-epigenetic interplay of brain-homing T cells in multiple sclerosis. *Brain*, 142(3), 647–661.
- Nuttall, F. Q.** (2015). Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. *Nutrition Today*, 50(3), 117–128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., & Dornmair, K.** (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 14(6), 688–693. <https://doi.org/10.1038/nm1714>

- Okuda, D. T., Kantarci, O., Lebrun-Frénay, C., Sormani, M. P., Azevedo, C. J., Bovis, F., ... & Pelletier, D.** (2023). Dimethyl fumarate delays multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome. *Annals of neurology*, 93(3), 604–614.
- Olerup, O., & Hillert, J.** (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: A critical evaluation. *Tissue Antigens*, 38(2), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1991.tb02029.x>
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L.** (2016). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), 26–36. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>
- Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Macías-Islas, M. Á., Flores-Alvarado, L. J., Mireles-Ramírez, M. A., González-Renovato, E. D., Hernández-Navarro, V. E., Sánchez-López, A. L., & Alatorre-Jiménez, M. A.** (2014). Role of the Blood-Brain Barrier in Multiple Sclerosis. *Archives of Medical Research*, 45(8), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.013>
- Panzhinskiy, E., Skovso, S., Cen, H. H., Chu, K. Y., MacDonald, K., Soukhatcheva, G., ... & Johnson, J. D.** (2021). Eukaryotic translation initiation factor 2A protects pancreatic beta cells during endoplasmic reticulum stress while rescuing translation inhibition. *bioRxiv*, 2021-02.
- Paré, A., Mailhot, B., Lévesque, S. A., & Lacroix, S.** (2017). Involvement of the IL- 1 system in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: Breaking the vicious cycle between IL-1 β and GM-CSF. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.146>
- Parker Harp, C. R., Archambault, A. S., Cheung, M., Williams, J. W., Czepielewski, R. S., Duncker, P. C., Kilgore, A. J., Miller, A. T., Segal, B. M., Kim, A. H. J., Randolph, G. J., & Wu, G. F.** (2019). Neutrophils promote VLA- 4-dependent B cell antigen presentation and accumulation within the meninges during neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(48), 24221–24230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909098116>
- Parodi, B., Rossi, S., Morando, S., Cordano, C., Bragoni, A., Motta, C., Usai, C., Wipke, B. T., Scannevin, R. H., Mancardi, G. L., Centonze, D., Kerlero de Rosbo, N., & Uccelli, A.** (2015). Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathologica*, 130(2), 279–295. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1422-3>
- Pender, M. P.** (2012). Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends in Immunology*, 24(11), 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.09.005>

- Pirko, I., Lucchinetti, C. F., Sriram, S., & Bakshi, R.** (2007). Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology*, 68(9), 634–642. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000250267.85698.7a>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S.** (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Pisetsky, D. S.** (2023). Pathogenesis of autoimmune disease. *Nature Reviews Nephrology*, 19(8), 509–524.
- Qu, J., Jin, J., Zhang, M., & Ng, L. G.** (2023). Neutrophil diversity and plasticity: Implications for organ transplantation. *Cellular and Molecular Immunology*, 20(9), 993–1001. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01058-1>
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G. C., Dörner, T., & Hiepe, F.** (2006). Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 741–750. <https://doi.org/10.1038/nri1886>
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., & Hänsch, G. M.** (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: Major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*, 101(4), 521–530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00140.x>
- Rana, S., Rogers, L. J., & Halliday, G. M.** (2011). Systemic low-dose UVB inhibits CD8 T cells and skin inflammation by alternative and novel mechanisms. *American Journal of Pathology*, 178(6), 2783–2791. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.016>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G.** (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Reimold, A. M., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., David, C. S., Strominger, J. L., & Glimcher, L. H.** (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *Journal of Experimental Medicine*, 183(2), 393–401. <https://doi.org/10.1084/jem.183.2.393>

- Ribbons, K. A., McElduff, P., Boz, C., Trojano, M., Izquierdo, G., Duquette, P., Girard, M., Grand'Maison, F., Hupperts, R., Grammond, P., Oreja-Guevara, C., Petersen, T., Bergamaschi, R., Giuliani, G., Barnett, M., van Pesch, V., Amato, M.-P., Iuliano, G., Fiol, M., & Lechner-Scott, J. (2015).** Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary Progressive MS. *PLOS ONE*, 10(6), e0122686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122686>
- Riek, A. E., Oh, J., Sprague, J. E., Timpson, A., De Las Fuentes, L., Bernal-Mizrachi, L., Schechtman, K. B., & Bernal-Mizrachi, C. (2012).** Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38482–38494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386912>
- Rieckmann, P., & Toyka, K. V. (1999).** Escalating immunotherapy of multiple sclerosis. *European Neurology*, 42(3), 121–127. <https://doi.org/10.1159/000008084>
- Romme Christensen, J., Börnsen, L., Hesse, D., Krakauer, M., Sørensen, P. S., Søndergaard, H. B., & Sellebjerg, F. (2012).** Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 9, 1-12.
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015).** Mechanisms of human autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>
- Sanchez, J. M. S., DePaula-Silva, A. B., Libbey, J. E., & Fujinami, R. S. (2022).** Role of diet in regulating the gut microbiota and multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 235(March 2020), 108379. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108379>
- Sandberg, L., Biström, M., Salzer, J., Vågberg, M., Svenningsson, A., & Sundström, P. (2016).** Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 22(8), 1027–1031. <https://doi.org/10.1177/1352458515606986>
- Sargsyan, S. A., Shearer, A. J., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Anderson, S., Hemmer, B., Stadelmann, C., Gattenlöhner, S., Owens, G. P., Gilden, D., & Bennett, J. L. (2010).** Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 74(14), 1127–1135. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d865a1>
- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019).** The Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: An Overview of Clinical Trials. *Cell Transplantation*, 28(12), 1507–1527. <https://doi.org/10.1177/0963689719873890>

- Schilling, S., Goelz, S., Linker, R., Luehder, F., & Gold, R.** (2006). Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clinical & Experimental Immunology*, 145(1), 101-107.
- Schmidt, T. J., Ak, M., & Mrowietz, U.** (2007). Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-l-cysteine-Preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(1), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.053>
- Schönthal, A. H.** (2012). Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.6064/2012/857516>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D.** (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Scutera, S., Musso, T., Cavalla, P., Piersigilli, G., Sparti, R., Comini, S., ... & Allizond, V.** (2020). Inhibition of human neutrophil functions in vitro by multiple sclerosis disease-modifying therapies. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), 3542.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., & Aloisi, F.** (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 2899–2912. <https://doi.org/10.1084/jem.20071030>
- Shen, J., & Prywes, R.** (2005). ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods*, 35(4), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.10.011>
- Simon, K. ., van der Mei, I. A. F., Munger, K. L., Ponsonby, A., Dicksinson, J., Sundström, P., & Ascherio, A.** (2010). Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology*, 75(8), 752. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181eee901>
- Simon, M. J., & Iliff, J. J.** (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
- Simpson, S., Blizzard, L., Otahal, P., Van Der Mei, I., & Taylor, B.** (2011). Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: A meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 82(10), 1132–1141. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2011.240432>

- Simpson, S., Stewart, N., van der Mei, I., Otahal, P., Charlesworth, J., Ponsonby, A. L., ... & 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 & Psychiatry*, 86(2), 200-207.
- Smith, A. L., Cohen, J. A., & Hua, L. H.** (2017). Therapeutic Targets for Multiple Sclerosis: Current Treatment Goals and Future Directions. *Neurotherapeutics*, 14(4), 952–960. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0548-5>
- Sozen, E., Karademir, B., & Ozer, N. K.** (2015). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.031>
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P.** (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>
- Stein, T., Bitsina, C., Seiler, M., Schmugge, M., & Franzoso, F. D.** (2024). Clusterin can mediate apoptosis-induced molecular mechanisms in immune thrombocytopenia. *Blood Vessels, Thrombosis & Hemostasis*, 1(3), 100012.
- Sun, Y., Abdul Aziz, A., Bowles, K., & Rushworth, S.** (2018). High NRF2 expression controls endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in multiple myeloma. *Cancer Letters*, 412, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.005>
- Sundström, P., Nyström, M., Ruuth, K., & Lundgren, E.** (2009). Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 215(1–2), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.08.004>
- Taing, K., Chen, L., & Weng, H. R.** (2023). Emerging roles of GPR109A in regulation of neuroinflammation in neurological diseases and pain. *Neural Regeneration Research*, 18(4), 763–768. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.354514>
- Takashima, A., & Yao, Y.** (2015). Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(4), 489–496. <https://doi.org/10.1189/jlb.1mr1014-502r>
- Thompson, A. J., Polman, C. H., Miller, D. H., McDonald, W. I., Brochet, B., Filippi, M., Montalban, X., & De Sá, J.** (1997). Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 120(6), 1085–1096. <https://doi.org/10.1093/brain/120.6.1085>

- Thomas, P. D., Hill, D. P., Mi, H., Osumi-Sutherland, D., Van Auken, K., Carbon, S., ... & Mungall, C. J.** (2019). Gene Ontology Causal Activity Modeling (GO- CAM) moves beyond GO annotations to structured descriptions of biological functions and systems. *Nature genetics*, 51(10), 1429-1433.
- Tillack, K., Naegele, M., Haueis, C., Schippling, S., Wandinger, K. P., Martin, R., & Sospedra, M.** (2013). Gender differences in circulating levels of neutrophil extracellular traps in serum of multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 261(1–2), 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.05.004>
- Toni, L. S., Garcia, A. M., Jeffrey, D. A., Jiang, X., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D., & Sucharov, C. C.** (2018). Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- Tracy, S. I., Kakalacheva, K., Lünemann, J. D., Luzuriaga, K., Middeldorp, J., & Thorley-Lawson, D. A.** (2012). Persistence of Epstein-Barr Virus in Self-Reactive Memory B Cells. *Journal of Virology*, 86(22), 12330–12340. <https://doi.org/10.1128/jvi.01699-12>
- Treumer, F., Zhu, K., Gläser, R., & Mrowietz, U.** (2003). Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *Journal of investigative dermatology*, 121(6), 1383-1388.
- Tumurkhuu, G., Laguna, D. E., Moore, R. E., Contreras, J., Santos, G. D. L., Akaveka, L., ... & Jefferies, C. A.** (2022). Neutrophils contribute to ER stress in lung epithelial cells in the pristane-induced diffuse alveolar hemorrhage mouse model. *Frontiers in Immunology*, 13, 790043.
- Van Bleek, G. M., & Nathenson, S. G.** (1991). The structure of the antigen-binding groove of major histocompatibility complex class I molecules determines specific selection of self-peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11032–11036. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11032>
- Van Der Mei, I. A. F., Lucas, R. M., Taylor, B. V., Valery, P. C., Dwyer, T., Kilpatrick, T. J., Pender, M. P., Williams, D., Chapman, C., Otahal, P., & Ponsonby, A. L.** (2016). Population attributable fractions and joint effects of key risk factors for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(4), 461–469. <https://doi.org/10.1177/1352458515594040>
- Vella, D., Zoppis, I., Mauri, G., Mauri, P., & Di Silvestre, D.** (2017). From protein- protein interactions to protein co-expression networks: a new perspective to evaluate large-scale proteomic data. *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 2017, 1-16.

- Vennegoor, A., Rispens, T., Strijbis, E. M. M., Seewann, A., Uitdehaag, B. M. J., Balk, L. J., Barkhof, F., Polman, C. H., Wolbink, G., & Killestein, J.** (2013). Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(5), 593–600. <https://doi.org/10.1177/1352458512460604>
- Venugopal, R., & Jaiswal, A. K.** (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14960–14965. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14960>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S.** (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Vono, M., Lin, A., Norrby-Teglund, A., Koup, A. R., Liang, F., & Lore, K.** (2017). Neutrophils Acquire the Capacity for Antigen Presentation to Memory CD4+ T Cells in Vitro and Ex Vivo. *Blood*, 101(7), 1509–1510. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001790>
- Walter, F., O'Brien, A., Concannon, C. G., Düssmann, H., & Prehn, J. H. M.** (2018). ER stress signaling has an activating transcription factor 6 (ATF6)-dependent “off-switch.” *Journal of Biological Chemistry*, 293(47), 18270–18284. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002121>
- Walter, P., & Ron, D.** (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *science*, 334(6059), 1081–1086
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P.** (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S.** (2009). Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(9), 2307–2316. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2485>
- Weinshenker, B. G.** (1998). The natural history of multiple sclerosis. *Handbook of Multiple Sclerosis, Third Edition*, 18(3), 433–447. <https://doi.org/10.1007/s100720070018>

- Werdenberg, D., Joshi, R., Wolfram, S., Merkle, H. P., & Langguth, P.** (2003). Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 24(6), 259–273. <https://doi.org/10.1002/bdd.364>
- White, J. H.** (2012). Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9195-z>
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C.** (2017). Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- Wingerchuk, D. M., & Carter, J. L.** (2014). Multiple sclerosis: Current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(2), 225–240. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.11.002>
- Wu, J., Vallenius, T., Ovaska, K., Westermarck, J., Mäkelä, T. P., & Hautaniemi, S.** (2009). Integrated network analysis platform for protein-protein interactions. *Nature methods*, 6(1), 75–77.
- Xie, X., Zhao, Y., Ma, C. Y., Xu, X. M., Zhang, Y. Q., Wang, C. G., ... & Dong, D. L.** (2015). Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway. *British Journal of Pharmacology*, 172(15), 3929–3943.
- Yadav, S. K., Soin, D., Ito, K., & Dhib-Jalbut, S.** (2019). Insight into the mechanism of action of dimethyl fumarate in multiple sclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 97(4), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01761-5>
- Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A. M., Cialic, R., Wu, P. M., Doykan, C. E., Lin, J., Cotleur, A. C., Kidd, G., Zorlu, M. M., Sun, N., Hu, W., Liu, L. P., Lee, J. C., Taylor, S. E., Uehlein, L., Dixon, D., ... Ransohoff, R. M.** (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1533–1549. <https://doi.org/10.1084/jem.20132477>
- Yang, J., Hamade, M., Wu, Q., Wang, Q., Axtell, R., Giri, S., & Mao-Draayer, Y.** (2022). Current and future biomarkers in multiple sclerosis. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5877.
- Yao, Y., Miao, W., Liu, Z., Han, W., Shi, K., Shen, Y., Li, H., Liu, Q., Fu, Y., Huang, D. R., & Shi, F. D.** (2016). Dimethyl Fumarate and Monomethyl Fumarate Promote Post-Ischemic Recovery in Mice. *Translational Stroke Research*, 7(6), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0496-0>

- Ye, Z. W., Zhang, J., Ancrum, T., Manevich, Y., Townsend, D. M., & Tew, K. D.** (2017). Glutathione S-transferase P-mediated protein S-glutathionylation of resident endoplasmic reticulum proteins influences sensitivity to drug-induced unfolded protein response. *Antioxidants & redox signaling*, 26(6), 247-261.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U.** (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1438–1444. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.96>
- Yousuf, M. S., Samtleben, S., Lamothe, S. M., Friedman, T., Catuneanu, A., Thorburn, K., ... & Kerr, B. J.** (2020). ER stress-mediated BK dysfunction in the DRG underlies pain in a model of multiple sclerosis.
- Yu, H. R., Kuo, H. C., Huang, H. C., Huang, L. T., Tain, Y. L., Chen, C. C., ... & Yang, K. D.** (2011). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a reliable internal control in Western blot analysis of leukocyte subpopulations from children. *Analytical biochemistry*, 413(1), 24-29.
- Yuan, Y. F., Das, S. K., & Li, M. Q.** (2018). Vitamin D ameliorates impaired wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice by suppressing endoplasmic reticulum stress. *Journal of Diabetes Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1757925>
- Zhang, J.-M., & An, J.** (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.
- Zhao, H., Zhang, Y., Shu, L., Song, G., & Ma, H.** (2019). Resveratrol reduces liver endoplasmic reticulum stress and improves insulin sensitivity in vivo and in vitro. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 1473–1485. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S203833>
- Zheng, Y., Manzotti, C. N., Liu, M., Burke, F., Mead, K. I., & Sansom, D. M.** (2004). CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2778–2784. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2778>
- Ziemssen, T., Akgün, K., & Brück, W.** (2019). Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 272.
- URL-1:** <https://stringdb.org/cgi/network?taskId=bD9n4cuczaBx&sessionId=bTDPD3HPmefl&allnodes=1>. Erişim tarihi: 23.02.2025
- URL-2:** <https://stringdb.org/cgi/coexpression?taskId=bD9n4cuczaBx&sessionId=bTDPD3HPmefl&allnodes=1>. Erişim tarihi: 23.02.2025
- URL-3:** <https://stringdb.org/cgi/network?taskId=bD9n4cuczaBx&sessionId=bTDPD3HPmefl&allnodes=>. Erişim tarihi: 24.02.2025

EKLER

EK-1: Çalışma Gruplarının Oluşturulması için Alınan Etik Kurul Onayı

EK-2: Kullanılan Malzemelerin Üretici Firmaları, Katalog Numaraları ve Üretim Yerleri,

EK-3: Kullanılan Cihazların Modelleri ve Üretim Yerleri

EK-4: Primer Dizileri ve Primerlere ait amplifikasyon ve erime eğrilerine ait

görseller EK-5: SDS-PAGE – WB deneylerinde hazırlanan solüsyonlar

EK-6: Total protein lizatları kullanılarak yapılan WB deneylerine ait membran görüntüleri

EK-7: 0A, 3A ve 6A gruplarında gerçekleştirilen basit korelasyon analizlerinin sonuçları

EK-8: Rmcorr analizlerinde kullanılan kod

EK-9: İstatistiksel olarak anlamlı sonuç vermeyen Rmcorr analizlerinden elde edilen grafikler



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 46418926

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ : 26 HAZİRAN 2018 SALI
TOPLANTI NO : 2018/9
PROJE/ KARAR NO : 18/206 (Değerlendirilme Tarihi:26.06.2018)

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliğinde görevli Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Şeref DEMİRKAYA, Uzm. Dr. Semih ALAY, Uzm. Dr. Nedime Tuğçe BİLBAY, Uzm. Dr. Nuriye KAYALI, Prof. Dr. Orhan ADALI, Doç. Dr. Serdar KARAKURT, Asistan Canan KOÇAN'ın yardımcı araştırmacı oldukları 18/206 kayıt numaralı, **"Nötrofil Endoplazmik Retikulum Stresi ile Plazma ve Nötrofil Fortilin Seviyesinin, Relapsing Remitting Multipl Sklerozda, Ataklarda Kortikosteroidlerin, Atak Önlemede 1 ve 2. Basamak Tedavilerin Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Biyobelirteç Olarak Kullanımının Araştırılması"** başlıklı proje önerisi, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

BAŞKAN

Ahmet COŞAR
Prof. Dr.

ÜYE

Ahmet GÖZÜBÜYÜK
Prof. Dr.

ÜYE

Ayhan KILIÇ
Prof. Dr.

ÜYE

Levent KENAR
Prof. Dr.

ÜYE

Cumhur SİPAHİ
Prof. Dr.

ÜYE

Cumhur AYDIN
Prof. Dr.

ÜYE

Cemal Nuri ELÇİN
Prof. Dr.

ÜYE

Kazım Emre KARAŞAHİN
Prof. Dr.

ÜYE

Murat ÇELİK
Doç. Dr.

ÜYE

Ceyhan ALTUN
Doç. Dr.

ÜYE

Dilek YILDIZ
Prof. Dr.

Bu tez çalışmasının bir kısmını içeren 218S578 kodlu TÜBİTAK çalışmasına ait Etik Kurul kararı.

Not: Islak imzalar silinmiştir.

Çizelge Ek.1: Kullanılan malzemelerin katalog numaraları, üretici firmaları ve üretim yerleri.

Malzeme	Katalog Numarası	Üretici Firma ve Üretim Yeri
LSM-A	LSM-A	Capricorn Scientific, Almanya
PBS	42595.01	Serva, Almanya
RBC Liziz Tamponu		
HBSS	BI02-018-1A	Biological Industries, ABD
Tripan Mavisi	03-102-1B	Biological Industries, ABD
Thoma Lamı	075.03.002	ISOLAB, Almanya
Qiazol	79306	Qiagen, Almanya
Kloroform	34854	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Izopropanol	67-63-0	ISOLAB, Almanya
Etanol	920.026	ISOLAB, Almanya
RIPA Tamponu	39244.01	Serva, Almanya
Proteaz İnhibtörü	39107.01	Serva, Almanya
Fosfotaz İnhibtörü	39055.01	Serva, Almanya
BCA Tahlil Kiti	T9300A	Takara, Japonya
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Biorad, ABD
iTaq Universal SYBR Green Super Mix	1725122	Biorad, ABD
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	4346906	Applied Biosystems, ABD
Hidroklorik asit (HCl)	07102	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Akrilamid	10678.02	Serva, Almanya
Bis-akrilamid	29195.02	Serva, Almanya
Tris (hidroksimetil) amino-metan	37180.05	Serva, Almanya
Glisin	23391.02	Serva, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich Co., Japonya
Sodyum klorür (NaCl)	31434	Sigma-Aldrich Co., Danimarka
PVDF Membran	1620177	Biorad, ABD
%5 Yağsız Süt Tozu	1706404	Biorad, ABD
Tween 20	1705017	Biorad, ABD
Protein Ladder	1610394	Biorad, ABD
B-aktin Antikoru	20536-1-AP	Proteintech, ABD
Bcl-2 Antikoru	12789-1-AP	Proteintech, ABD
Kaspaz-3 Antikoru	25546-1-AP	Proteintech, ABD
İkincil Antikor	SA-0001-2	Proteintech, ABD

Çizelge Ek.1 (devam): Kullanılan malzemelerin katalog numaraları, üretici firmaları ve üretim yerleri.

Malzeme	Katalog Numarası	Üretici Firma ve ÜretimYeri
TEMED	1610800	Biorad, ABD
APS	1610700	Biorad, ABD
Laemmli Tamponu	1610747	Biorad, ABD



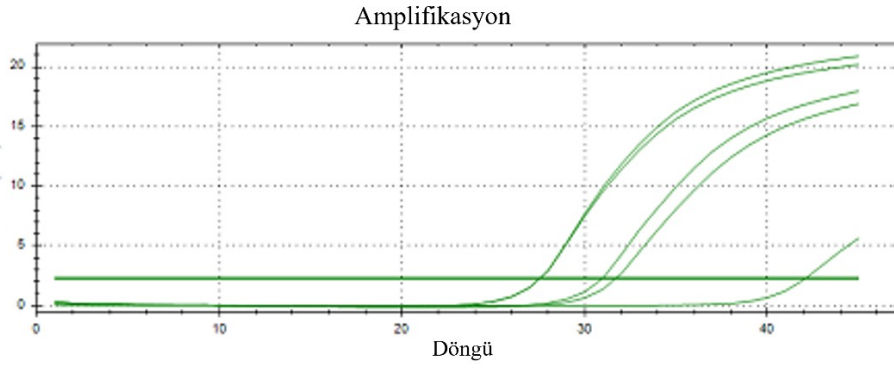
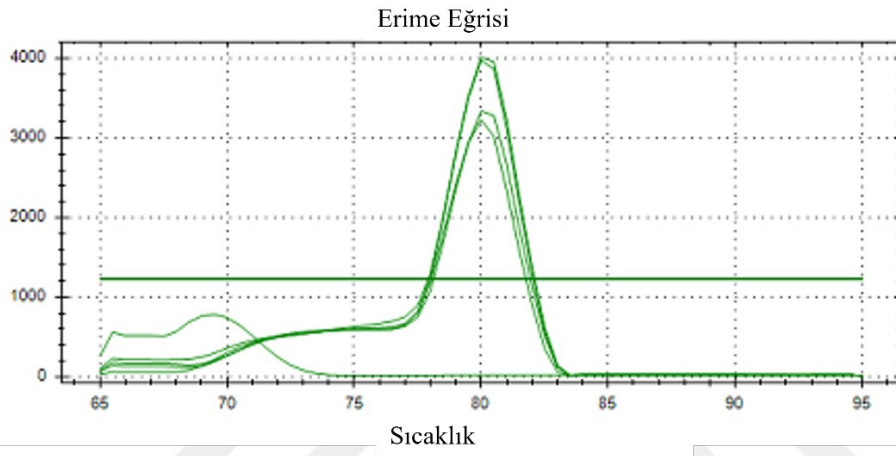
Çizelge Ek.2: Kullanılan cihazların modelleri, üretici firmaları ve üretim yerleri.

Cihaz	Model	Marka ve Üretim Yeri
-20°C Buzdolabı	LGex 3410 Index 22A/001	Liebherr, Almanya
+4°C Buzdolabı	LKv 3913 Index 20B/001	Liebherr, Almanya
-86°C Buzdolabı	MDF-U55V-PE	Panasonic, Japonya
Hassas tartı	PLJ 300	Kern, Almanya
Soğutmalı santrifuj	Universal 320R	Hettich, Almanya
Inverted Mikroskop	MC170 HD	Leica, Almanya
qRT- PCR cihazı	StepOne Plus	Applied Biosystems, ABD
Saf su cihazı	Minipure	MES Medikal, Türkiye
Otoklav	MLS-3751L	Panasonic, Japonya
Biyogüvenlik kabini	S2020 1.2	Thermo Scientific™, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	ArecX	Velp Scientifica, İtalya
Mikro santrifuj	MiniSpin®	Eppendorf, Almanya
PCR cihazı	Mastercycler® Nexus	Eppendorf, Almanya
pH metre	pH 1100 L	VWR, ABD
Nanodrop/ UV-Vis Spektrofotometre	NanoDrop™ One/OneC	Thermo Scientific™, ABD
Vorteks	622.01.001	ISOLAB, Almanya
Kuru Blok	Bio TDB-100	BioSan, Letonya
SDS-PAGE Dikey Elektroforez Sistemi (Mini Protean® Dörtlü Sistem)	1658001FC	Biorad, ABD
PowerPac™ Güç Kaynağı	1645050	Biorad, ABD

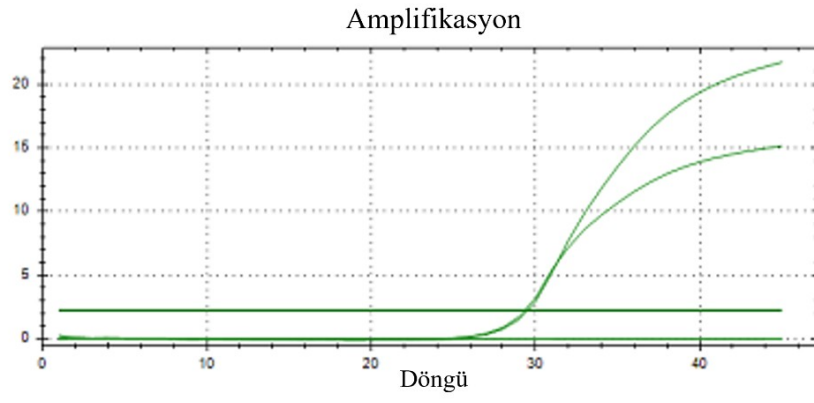
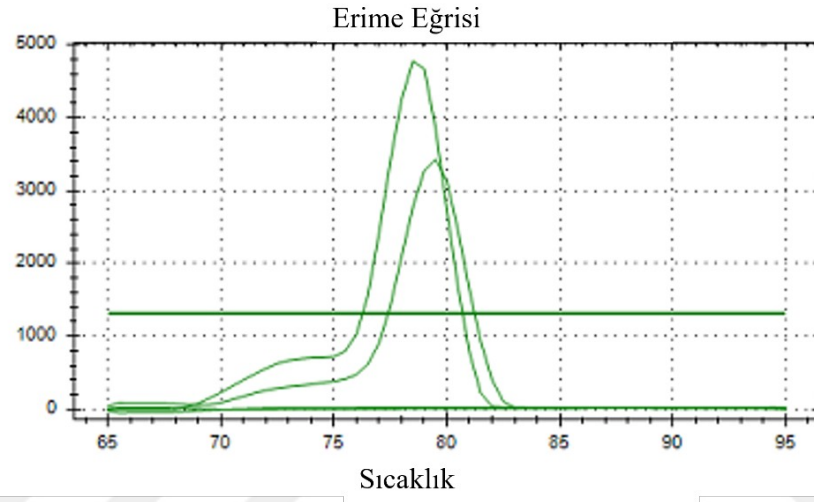
EK-4

Çizelge Ek.3: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primer dizileri

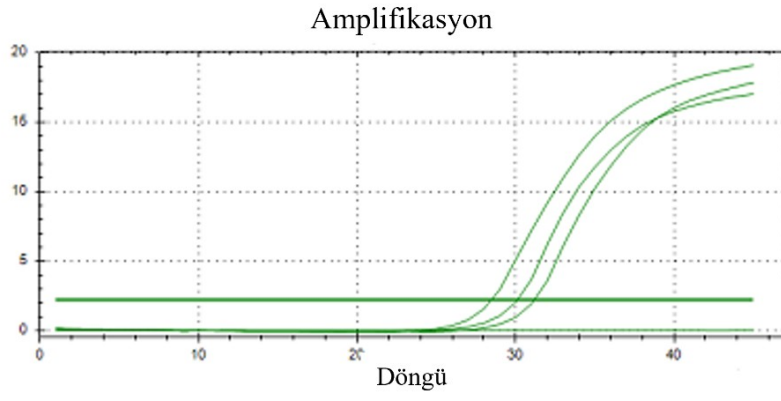
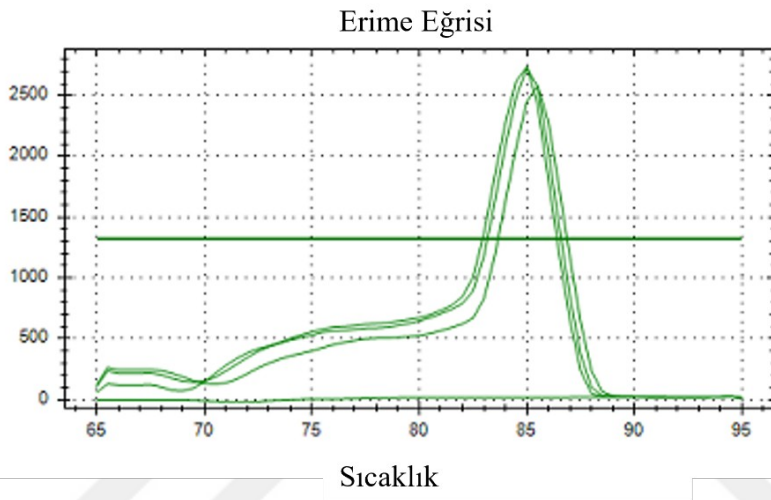
Gen İsmi-Primer Adı	Primer Dizisi	
<i>B-aktin</i> (ACTB)	İleri Primer	5'-GAT GAG ATT GGC ATG GCT TT -3'
	Geri Primer	5'-CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT -3'
<i>ATF4</i>	İleri Primer	5'- CCC CCT TCA CCT TCT TAC AA -3'
	Geri Primer	5'- AAG GGG TGT CTT CCT CCT TT -3'
<i>ATF6</i>	İleri Primer	5'- AAG AGC AGG TGA GCA AAA TG -3'
	Geri Primer	5'- CCA GGT AAC ACT GGA GGA TG -3'
<i>BAX</i>	İleri Primer	5'- GCT GGA CAT TGG ACT TCC TC -3'
	Geri Primer	5'- CTC AGC CCA TCT TCT TCC AG -3'
<i>BCL2</i>	İleri Primer	5'- AGA TGG GAA CAC TGG TGG AG -3'
	Geri Primer	5'- CTT CCC CAA AAG AAA TGC AA -3'
<i>CASP-3</i>	İleri Primer	5'- CCC CTG GAT CTA CCA GCA TA -3'
	Geri Primer	5'- TGT CTC TGC TCA GGC TCA AA -3'
<i>CHOP</i> (DDIT)	İleri Primer	5'- AGA GCC CTC ACT CTC CAG AT -3'
	Geri Primer	5'- TTG AGC CGT TCA TTC TCT TC -3'
<i>PERK</i> (eIF2AK)	İleri Primer	5'- ATA TTG GCA ACC ATT GTG CT -3'
	Geri Primer	5'- TCG TCC ATT CAT CCA GTC TT -3'
<i>eIF2a</i> (eIF2S1)	İleri Primer	5'- GCC TTT CTG TCC TCA GTC AA -3'
	Geri Primer	5'- ATT GGA CTC TGT TTC CCA CA -3'
<i>IRE1</i> (ERN1-5)	İleri Primer	5'- CCT CGG GAT TTT TGG AAG TA -3'
	Geri Primer	5'- GGC TGC CAT CAT TAG GAT CT -3'
<i>GRP78</i> (HSPA-5)	İleri Primer	5'- CTG GAA CTA TTG CTG GCC TA -3'
	Geri Primer	5'- GCT GGT CAA AGT CTT CTC CA -3'

A**B**

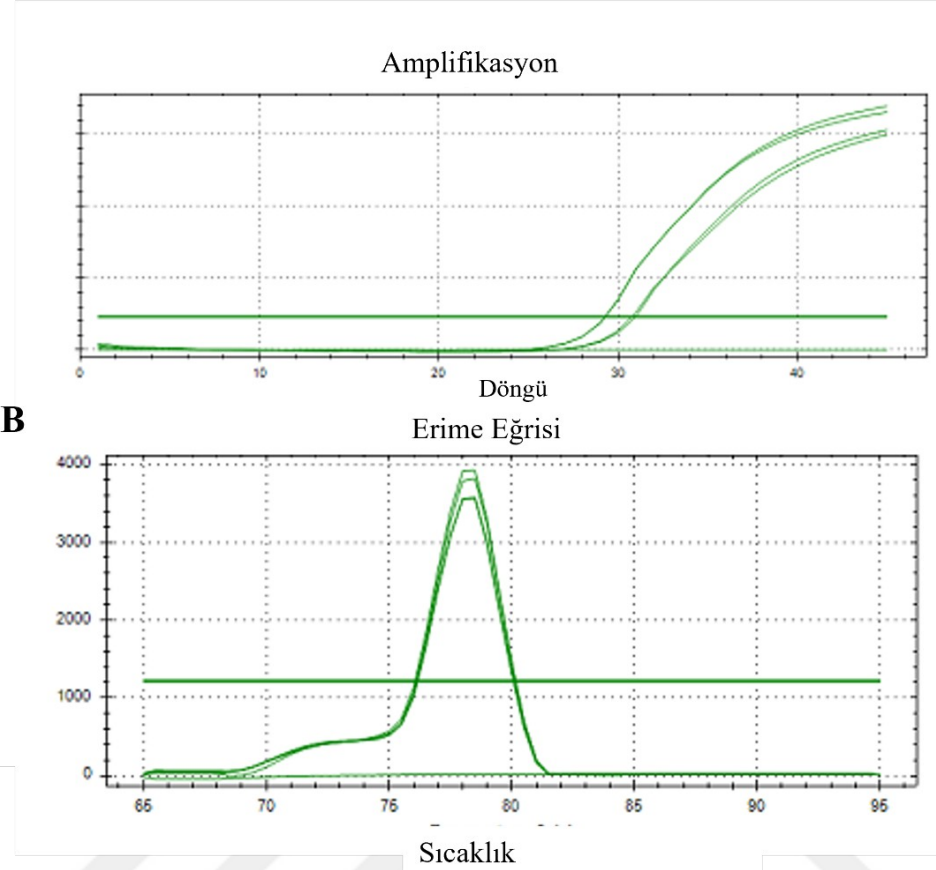
Şekil Ek 1: *ATF-4* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

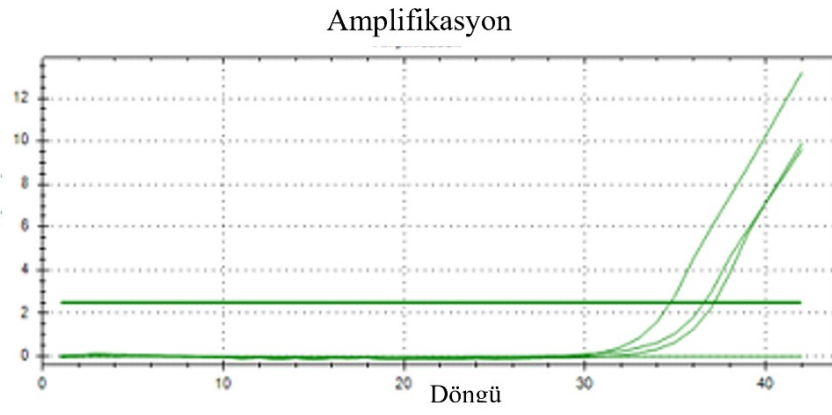
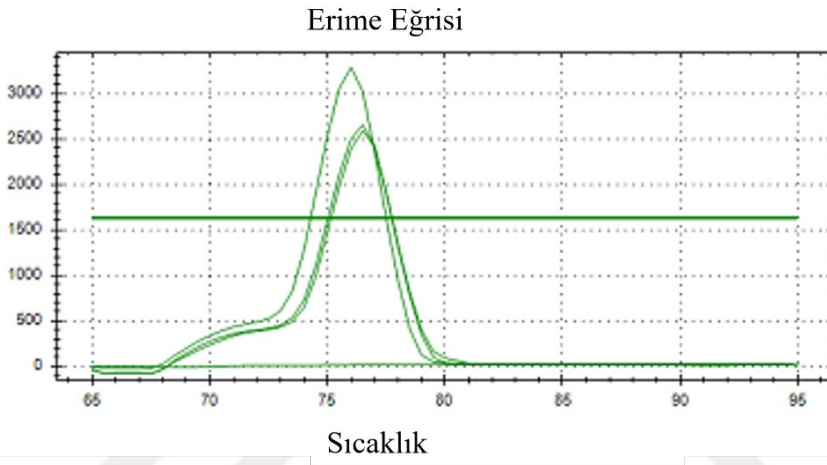
Şekil Ek 2: *ATF-6* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

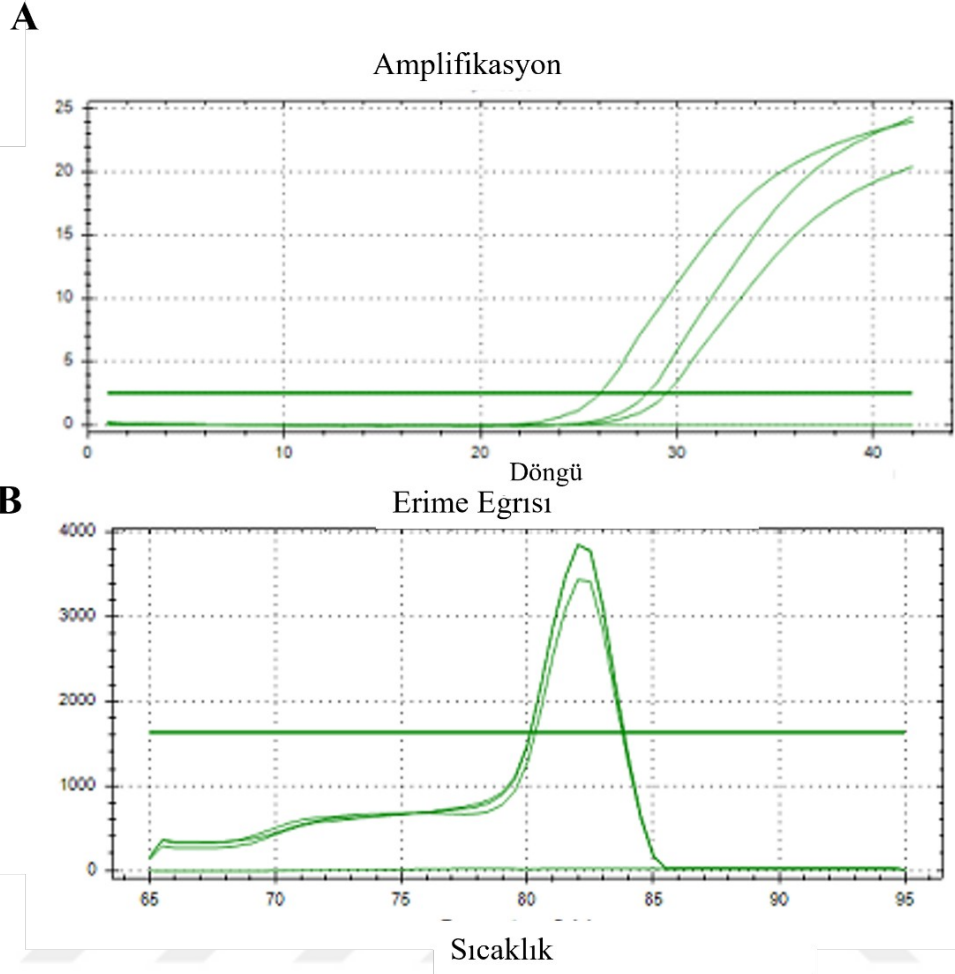
Şekil Ek 3: *BAX* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A

Şekil Ek 4: *BCL-2* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

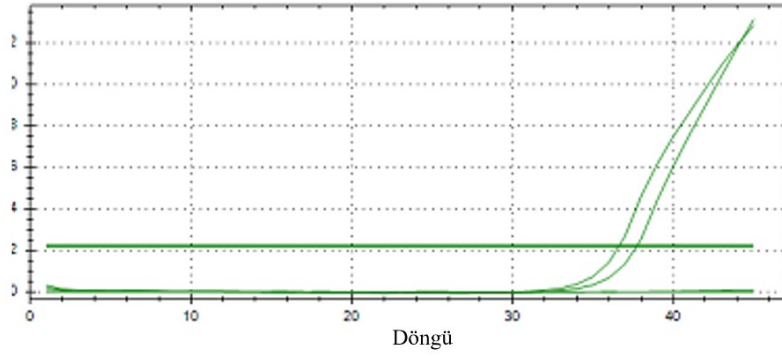
Şekil Ek 5: *CASP-3* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri



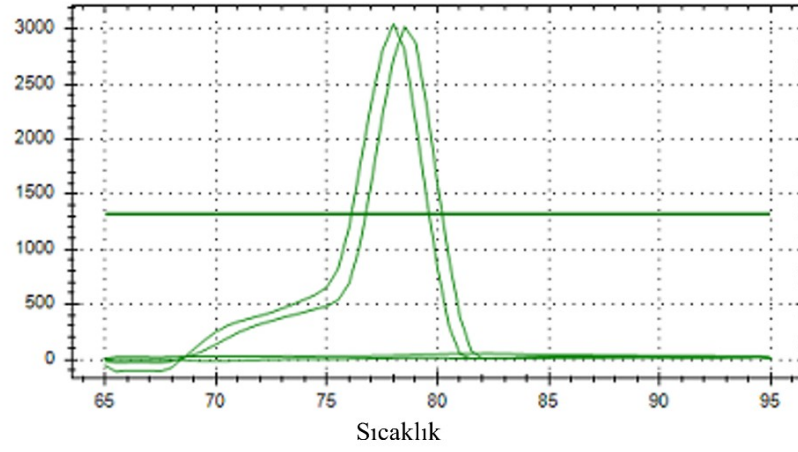
Şekil Ek 6: *CHOP* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A

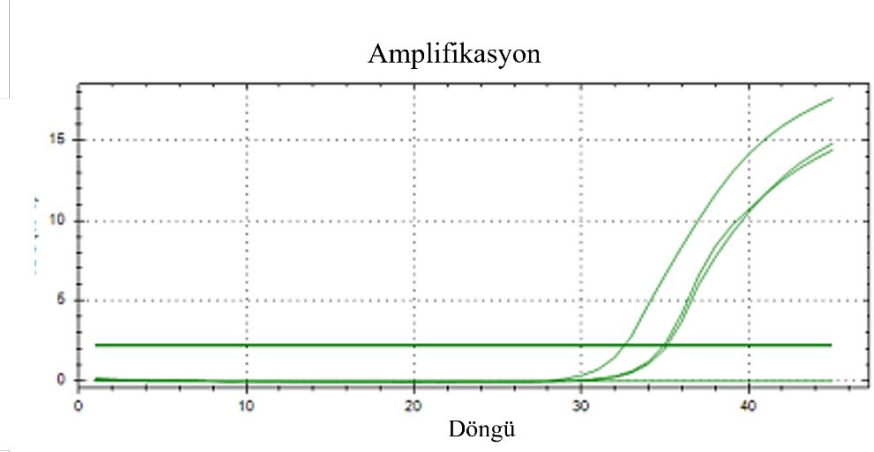
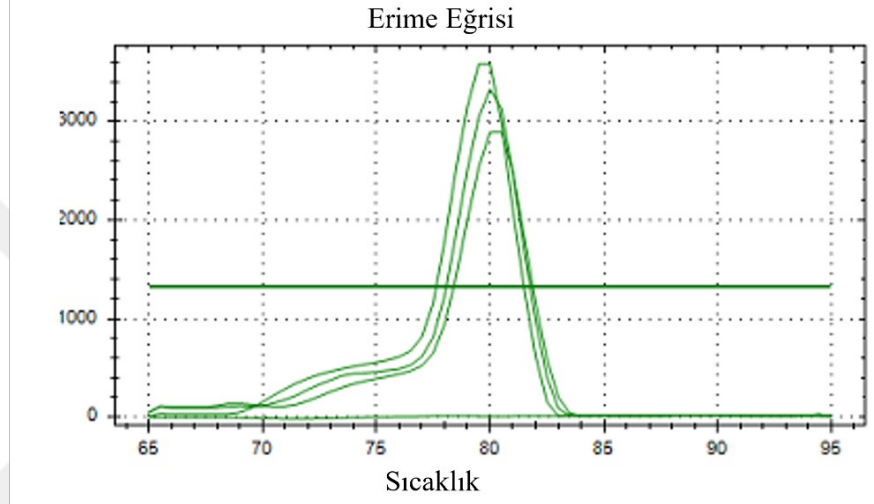
Amplifikasyon

**B**

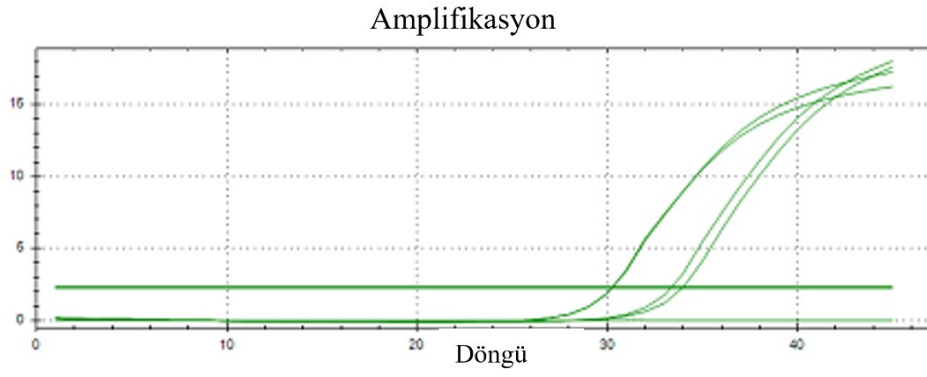
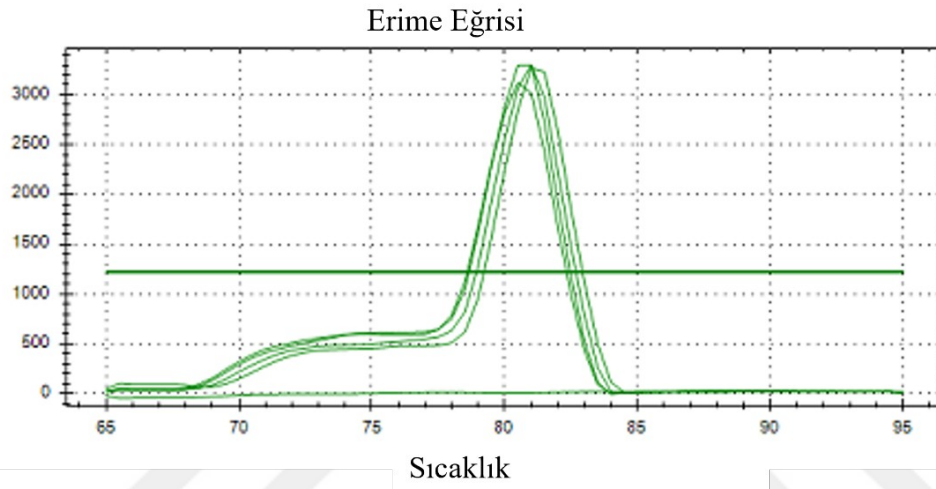
Erime Eğrisi



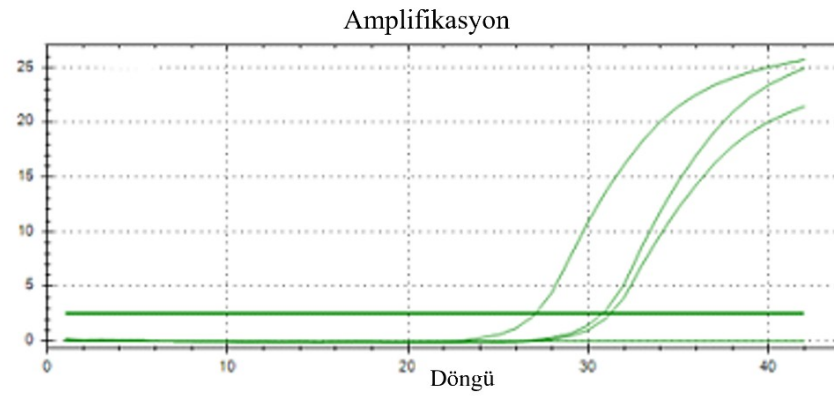
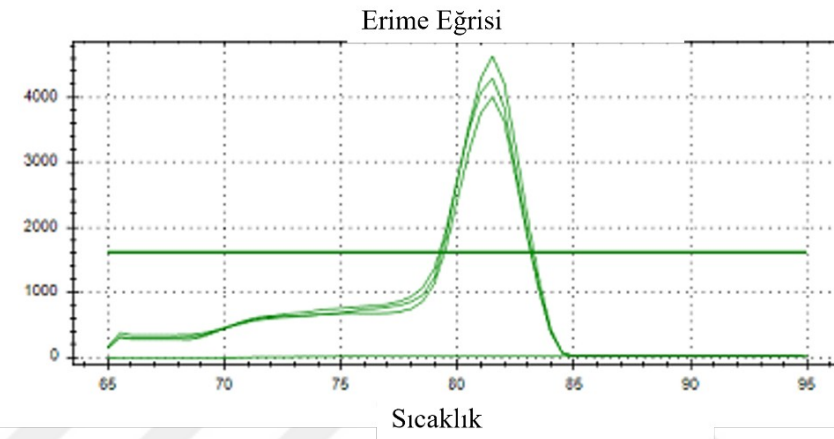
Şekil Ek 7: *PERK* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

Şekil Ek 8: *eIF2 α* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

Şekil Ek 9: *IRE1* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

A**B**

Şekil Ek 10: *GRP78* geni için elde edilen A) amplifikasyon ve B) erime eğrileri

EK-5: SDS-PAGE deneyinde kullanılan solüsyonlar

Jel Solüsyonu Akrilamid/Bisakrilamid (%30 T, %2,67 C, 50 mL)

$$\%T = [g \text{ akrilamid} + g \text{ bis-akrilamid} / \text{total hacim} \times 100]$$

$$\%C = [g \text{ bis-akrilamid} / (g \text{ akrilamid} + g \text{ bisakrilamid})] \times 100]$$

Jel Solüsyonu (%30 T, %2,67 C, 50 mL)

Akrilamid 14,6 g

Bisakrilamid 0,4 g

Tartılan akrilamid ve bisakrilamid 50 mL suda çözülür ve karanlık bir şekilde 4°C’de saklanır.

Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris HCl, 100 mL)

Tris (Mw: 121,14) 18,15 g

dH₂O 60 mL

Tartılan Tris 60 mL dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen bir şekilde çözdürülür. Solüsyonun pH değerinin 8,8 olması için 10 M HCl kullanılır. pH ayarlanması tamamlandıktan sonra solüsyon hacmi 100 mL’ye tamamlanır ve hazırlanan tampon 4°C’de saklanır.

İstifleme Jel Tamponu (0,5 M Tris HCl, 100 mL)

Tris (Mw: 121,14) 6 g

dH₂O 60 mL

Tartılan Tris 60 mL dH₂O içerisinde homojen hale getirilir. Ardından 10 M HCl kullanılarak solüsyonun pH değeri 6,8 olacak şekilde ayarlanır. Uygun pH değerinin elde edilmesi ile solüsyon hacmi 100 mL’ye tamamlanır ve çözelti 4°C’de saklanır.

%10 SDS (Ağırlıkça/Hacimce)

SDS (Mw:288,38)	1 g
dH ₂ O	10 mL

%10 APS (Ağırlıkça/Hacimce)

SDS (Mw:228,20)	100 mg
dH ₂ O	1 mL

10X Yürütme Tamponu (1L)

Tris (Mw: 121,14)	30 g
Glisin (Mw: 75,07)	144 g
dH ₂ O	1000 mL

Hazırlanan bu 10X konsantrasyonlu çözelti stok çözeltidir. Çözeltinin SDS-PAGE deneyinde kullanılabilmesi için 1X konsantrasyonda olması ve SDS içermesi gerekmektedir. 1X yürütme tamponu hazırlamak için 10X tampondan 100 mL alınır, hacmin %1'i olacak kadar SDS tartılır ve hacim 1 L'ye tamamlanacak şekilde üzerine dH₂O eklenir.

1X Transfer Tamponu (1L)

Tris (Mw: 121,14)	3,02 g
Glisin (Mw: 75,07)	14,41 g
Metanol (MetOH)	200 mL

Transfer tamponu hazırlamak için öncelikle Tris ve glisin tartılır. Tartılan bu tuzlar 500 mL dH₂O içerisinde çözündürülür. Ardından MetOH sisteme eklenir ve tampon

homojen yapı kazanana kadar karıştırılır. Homojen yapı elde edildikten sonra hacim 1L'ye tamamlanır.

TBST (1L)

Tris (Mw: 121,14)	6,05 g
NaCl (Mw: 58,44)	8,76 g
Tween-20	1 mL

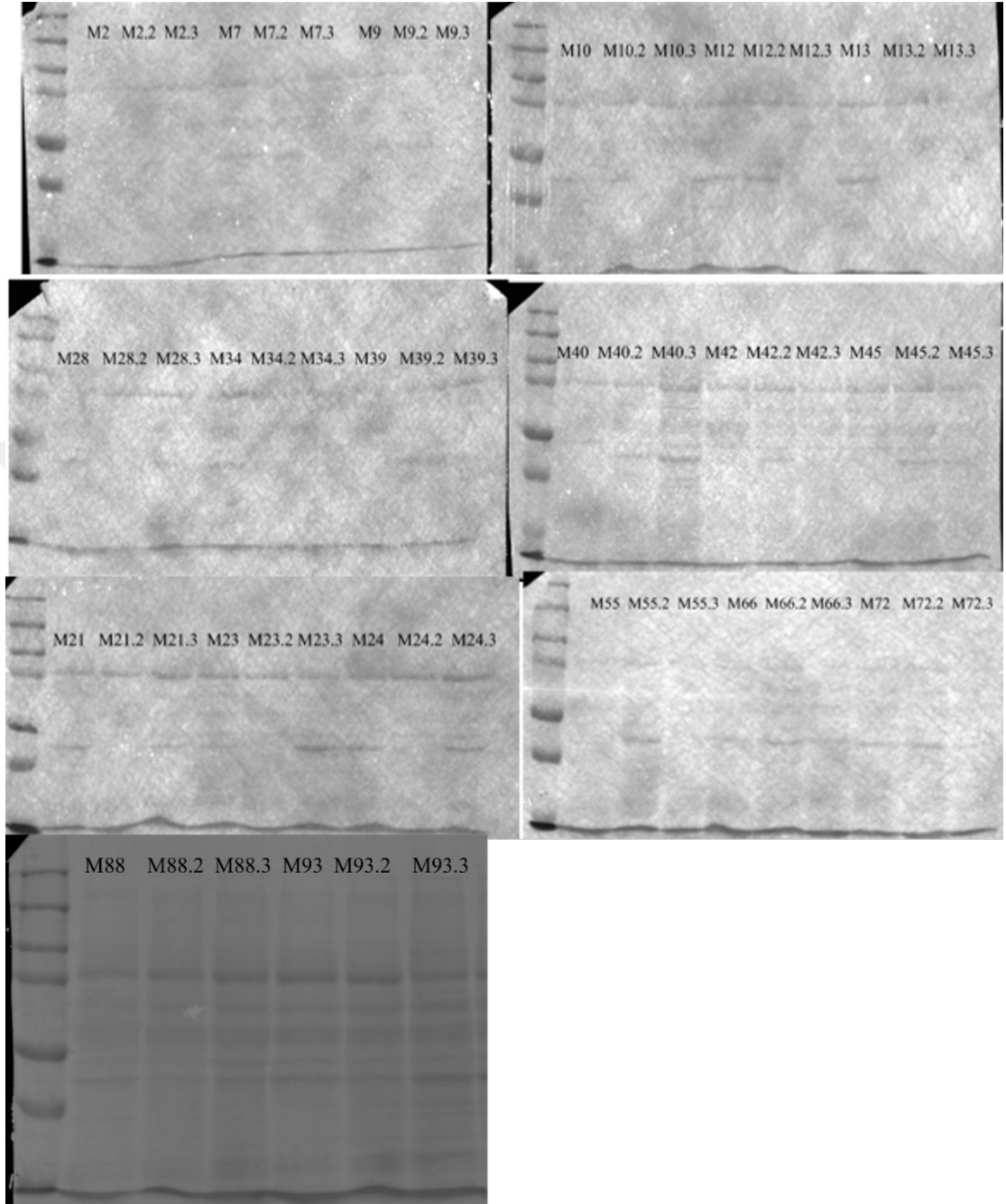
Tris ve NaCl tartılır ve 400 mL dH₂O içerisinde çözülür. 1M HCl kullanılarak solüsyon pH=7.5 olacak şekilde ayarlanır ve ardından tween-20 eklenir. Homojen yapı kazandığından emin olunan solüsyon hacmi 1L'ye tamamlanır.

Bloklama ve Antikor Seyreltme Tamponu (100 mL)

Yağsız Süt Tozu	5 g
-----------------	-----

5 g yağsız süt tozu tartılır ve 100 mL TBST içerisinde homojen bir şekilde çözülür. Hazırlanan bu tampon hem membranların bloklanmasında hem de antikorların seyreltilmesinde kullanılır.

EK-6: Total protein lizatları kullanılarak yapılan WB deneylerine ait membran görüntüleri



Ek Şekil 1: M grubu örneklerinin tamamını içeren ve total protein lizatları kullanılarak yapılan WB deneylerine ait membran görüntüleri

EK-7: 0A, 3A ve 6A gruplarında gerçekleştirilen basit korelasyon analizlerinin sonuçları

Ek Çizelge 1: 0A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2a</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
<i>ATF4</i>	Spearman's ρ	1.000	.725**	.711**	.827**	.730**	.711**	.461*	.661**	.753**	.483**	.024	.209	-.048	-.049	-.102
	<i>P</i>	.	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	.041	.002	<.001	.031	.920	.378	.840	.837	.668
<i>ATF6</i>	Spearman's ρ	.725**	1.000	.747**	.743**	.702**	.718**	.584**	.790**	.735**	.573**	.105	.239	.036	-.350	-.365
	<i>P</i>	<.001	.	<.001	<.001	.001	<.001	.007	<.001	<.001	.008	.658	.309	.879	.131	.114
<i>BAX</i>	Spearman's ρ	.711**	.747**	1.000	.541*	.575**	.582**	.422	.532*	.603**	.467*	-.181	.142	.199	-.145	-.166
	<i>P</i>	<.001	<.001	.	.014	.008	.007	.064	.016	.005	.038	.446	.550	.399	.541	.483
<i>BCL2</i>	Spearman's ρ	.827**	.743**	.541*	1.000	.642**	.755**	.592**	.859**	.744**	.713**	-.056	.051	-.064	-.243	-.206
	<i>P</i>	<.001	<.001	.014	.	.002	<.001	.006	<.001	<.001	<.001	.816	.830	.787	.302	.383
<i>CASP3</i>	Spearman's ρ	.730**	.702**	.575	.642**	1.000	.617**	.724**	.703	.560*	.402	.476*	.265	.010	.071	.080
	<i>P</i>	<.001	.001	.008	.002	.	.004	<.001	.001	.010	.079	.034	.259	.966	.766	.738
<i>CHOP</i>	Spearman's ρ	.711**	.718**	.582**	.755	.617**	1.000	.512*	.722**	.959**	.634**	.003	.198	-.134	-.242	-.288
	<i>P</i>	<.001	<.001	.007	<.001	.004	.	.021	<.001	<.001	.003	.989	.402	.574	.305	.218
<i>PERK</i>	Spearman's ρ	.461*	.584**	.422	.592**	.724**	.521**	1.000	.760**	.497*	.564**	.329	.263	.089	.041	.212
	<i>P</i>	.041	.007	.064	.006	<.001	.021	.	<.001	.026	.010	.156	.262	.710	.884	.369
<i>eIF2a</i>	Spearman's ρ	.661**	.790**	.532*	.859**	.703**	.722**	.760**	1.000	.686**	.700**	.058	.040	.156	-.142	-.118
	<i>P</i>	.002	<.001	.016	<.001	<.001	<.001	<.001	.	<.001	.001	.809	.867	.511	.550	.621

Ek Çizelge 1 (devam): 0A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2α</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
<i>IRE1</i>	Spearman's ρ	.753**	.735**	.603**	.744**	.560*	.959**	.497*	.686**	1.000	.649**	-.071	.297	-.121	-.221	-.284
	<i>P</i>	<.001	<.001	.005	<.001	.010	<.001	.026	<.001	.	.002	.767	.204	.611	.349	.226
<i>GRP78</i>	Spearman's ρ	.483**	.573**	.467*	.713**	.402	.634**	.564**	.700**	.649**	1.000	-.250	.127	-.149	-.102	-.114
	<i>P</i>	.031	.008	.038	<.001	.079	.003	.010	.001	.002	.	.289	.595	.530	.668	.632
<i>Bcl2</i>	Spearman's ρ	.024	.105	-.181	-.056	.476*	.003	.329	.058	-.071	-.250	1.000	.067	-.033	.058	.079
	<i>P</i>	.920	.658	.446	.816	.034	.989	.156	.809	.767	.289	.	.779	.889	.807	.740
<i>Kaspaz-3</i>	Spearman's ρ	.209	.239	.142	.051	.265	.198	.263	.040	.297	.127	.067	1.000	-.087	-.024	-.028
	<i>P</i>	.378	.309	.550	.830	.259	.402	.262	.867	.204	.595	.779	.	.714	.920	.906
<i>EDSS</i>	Spearman's ρ	-.048	.036	.199	-.064	.010	-.134	.089	.156	-.121	.611	-.033	-.087	1.000	.186	.173
	<i>P</i>	.840	.879	.399	.787	.966	.574	.710	.511	.611	-.149	.889	.714	.	.432	.465
<i>T2 Lezyon</i>	Spearman's ρ	-.049	-.350	-.145	-.243	.071	-.242	.041	-.142	-.221	-.102	.058	-.024	.186	1.000	.873**
	<i>P</i>	.837	.131	.541	.302	.766	.305	.884	.550	.349	.668	.807	.920	.432	.	<.001
<i>Total Lezyon</i>	Spearman's ρ	-.102	-.365	-.166	-.206	.080	-.288	.212	-.118	-.284	-.114	.079	-.028	.173	.873**	1.000
	<i>P</i>	.668	.114	.483	.383	.738	.218	.369	.621	.226	.632	.740	.906	.465	<.001	.

*: *P* değeri .05 seviyesinde anlamlıdır. **: *P* değeri .01 seviyesinde anlamlıdır.

Ek Çizelge 2: 0A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2a</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
<i>ATF4</i>	Spearman's ρ	1.000	.424	.761**	.642**	.600**	.584**	.648**	.578**	.192	.502*	-.138	.268	.081	-.145	.555*
	<i>P</i>	.	.062	<.001	.002	.005	.007	.002	.008	.418	.024	.561	.254	.733	.542	.017
<i>ATF6</i>	Spearman's ρ	.424	1.000	.220	.359	.420	.699**	.427	.224	.303	.789**	-.367	-.282	.209	-.326	.223
	<i>P</i>	.062	.	.350	.120	.065	.001	.060	.342	.194	<.001	.112	.228	.377	.160	.373
<i>BAX</i>	Spearman's ρ	.761**	.220	1.000	.541*	.468*	.518*	.552*	.609**	.485*	.485*	-.278	.257	.124	-.006	.463
	<i>P</i>	<.001	.350	.	.014	.037	.019	.012	.004	.030	.030	.236	.273	.601	.978	.053
<i>BCL2</i>	Spearman's ρ	.642**	.359	.541*	1.000	.204	.535*	.896**	.821**	.147	.529*	-.223	.119	-.085	-.214	.401
	<i>P</i>	.002	.120	.014	.	.389	.015	<.001	<.001	.537	.016	.346	.618	.723	.366	.099
<i>CASP3</i>	Spearman's ρ	.600**	.420	.468*	.204	1.000	.623**	.294	.026	.050	.375	-.071	-.181	.174	-.107	.456
	<i>P</i>	.005	.065	.037	.389	.	.003	.208	.912	.833	.103	.767	.446	.463	.654	.057
<i>CHOP</i>	Spearman's ρ	.584**	.699**	.518*	.535*	.623**	1.000	.598**	.402	.322	.714**	-.296	-.293	-.120	-.104	.367
	<i>P</i>	.007	.001	.019	.015	.003	.	.005	.079	.166	<.001	.205	.209	.615	.663	.134
<i>PERK</i>	Spearman's ρ	.648**	.427	.552*	.896**	.294	.598**	1.000	.836**	.125	.606**	-.295	-.006	.002	-.074	.413
	<i>P</i>	.002	.060	.012	<.001	.208	.005	.	<.001	.600	.005	.207	.980	.995	.758	.088
<i>eIF2a</i>	Spearman's ρ	.578**	.224	.609**	.821**	.026	.402	.836**	1.000	.333	.448*	-.380	.319	-.093	-.134	.299
	<i>P</i>	.008	.342	.004	<.001	.912	.079	<.001	.	.152	.048	.098	.171	.698	.573	.229

Ek Çizelge 2 (devam): 3A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2a</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
<i>IRE1</i>	Spearman's ρ	.192	.303	.485**	.147	.050	.322	.125	.333	1.000	.455*	-.526*	.083	.033	-.077	.011
	<i>P</i>	.418	.194	.030	.537	.833	.166	.600	.152	.	.044	.017	.729	.891	.748	.966
<i>GRP78</i>	Spearman's ρ	.502*	.789**	.485**	.529*	.375	.714**	.606**	.448*	.455*	1.000	-.334	-.336	-.006	-.211	.451
	<i>P</i>	.024	<.001	.030	.016	.103	<.001	.005	.048	.044	.	.150	.147	.979	.373	.060
<i>Bcl2</i>	Spearman's ρ	-.138	-.367	-.278	-.223	-.071	-.296	-.295	-.380	-.526*	-.334	1.000	-.076	-.094	-.135	.243
	<i>P</i>	.561	.112	.236	.346	.767	.205	.207	.098	.017	.150	.	.750	.693	.582	.332
<i>Kaspaz-3</i>	Spearman's ρ	.268	-.282	.257	.119	-.181	-.293	-.006	.319	.083	-.336	-.076	1.000	.137	-.049	.067
	<i>P</i>	.254	.228	.273	.618	.446	.209	.980	.171	.729	.147	.750	.	.564	.841	.793
<i>EDSS</i>	Spearman's ρ	.081	.209	.124	-.085	.174	-.120	.002	-0.93	.033	-.006	-.094	.137	1.000	-.256	.042
	<i>P</i>	.733	.377	.601	.723	.463	.615	.995	.698	.891	.979	.693	.564	.	.277	.870
<i>T2 Lezyon</i>	Spearman's ρ	-.145	-.326	-.006	-.214	-.107	-.104	-.074	-.134	-.077	-.211	-.135	-.049	-.256	1.000	-.414
	<i>P</i>	.542	.160	.978	.366	.654	.663	.758	.573	.748	.373	.582	.841	.277	.	.087
<i>Total Lezyon</i>	Spearman's ρ	.555*	.223	.463	.401	.456	.367	.413	.299	.011	.451	.243	.067	.042	-.414	1.000
	<i>P</i>	.017	.373	.053	.099	.057	.134	.088	.229	.966	.060	.332	.793	.870	.087	.

*: *P* değeri .05 seviyesinde anlamlıdır. **: *P* değeri .01 seviyesinde anlamlıdır.

Ek Çizelge 3: 6A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2a</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
<i>ATF4</i>	Spearman's ρ	1.000	.066	.544*	.741**	.529*	.548*	.601**	.283	.270	.230	.371	.520*	-.199	.109	.202
	<i>P</i>	.	.782	.013	<.001	.016	.012	.005	.227	.250	.329	.107	.019	.400	.400	.407
<i>ATF6</i>	Spearman's ρ	.066	1.000	.286	.379	.353	.479*	.295	.597**	.338	.268	-.209	-.266	.167	-.002	-.172
	<i>P</i>	.782	.	.222	.099	.126	.032	.207	.005	.144	.254	.376	.258	.481	.992	.481
<i>BAX</i>	Spearman's ρ	.544*	.286	1.000	.478*	.132	.360	.473*	.522*	.574**	.296	-.156	.164	.096	-.036	.112
	<i>P</i>	.013	.222	.	.033	.578	.119	.035	.018	.008	.206	.510	.490	.689	.879	.647
<i>BCL2</i>	Spearman's ρ	.741**	.379	.478*	1.000	.496*	.431	.530*	.301	.138	.227	.197	.379	-.131	-.162	.274
	<i>P</i>	<.001	.099	.033	.	.026	.058	.016	.198	.563	.335	.405	.099	.581	.495	.256
<i>CASP3</i>	Spearman's ρ	.529*	.353	.132	.496*	1.000	.610**	.641**	.248	.190	.396	.323	.247	.028	.029	-.142
	<i>P</i>	.016	.126	.578	.026	.	.004	.002	.292	.422	.084	.164	.294	.907	.903	.561
<i>CHOP</i>	Spearman's ρ	.548*	.479*	.360	.431	.610**	1.000	.616**	.634**	.659**	.547*	-.155	.250	-.201	.214	-.364
	<i>P</i>	.012	.032	.119	.058	.004	.	.004	.003	.002	.013	.514	.288	.395	.364	.125
<i>PERK</i>	Spearman's ρ	.601**	.295	.473*	.530*	.641**	.616**	1.000	.323	.177	.495*	.255	.355	-.056	-.030	-.132
	<i>P</i>	.005	.207	.035	.016	.002	.004	.	.165	.456	.026	.278	.124	.815	.899	.590
<i>eIF2a</i>	Spearman's ρ	.283	.597**	.522*	.301	.248	.634**	.323	1.000	.578**	.663**	-.595**	-.076	.199	.119	-.230
	<i>P</i>	.227	.005	.018	.198	.292	.003	.165	.	.008	.001	.006	.750	.400	.619	.343
<i>IRE1</i>	Spearman's ρ	.270	.338	.574**	.138	.190	.659**	.177	.578**	1.000	.342	-.414	-.030	.033	-.077	.011
	<i>P</i>	.250	.144	.008	.563	.422	.002	.456	.008	.	.140	.070	.901	-.147	.143	.966
<i>GRP78</i>	Spearman's ρ	.230	.268	.296	.227	.396	.547*	.495*	.663**	.342	1.000	-.336	.266	.022	<.001	-.421
	<i>P</i>	.329	.254	.206	.335	.084	.013	.026	.001	.140	.	.147	.257	.927	1.000	.073
<i>Bcl2</i>	Spearman's ρ	.371	-.209	-.156	.197	.323	-.155	.255	-.595**	-.414	-.336	1.000	.122	-.155	.145	.093
	<i>P</i>	.107	.376	.510	.405	.164	.514	.278	.006	.070	.147	.	.609	.513	.542	.705

Ek Çizelge 3 (devam): 6A grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri

		<i>ATF4</i>	<i>ATF6</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CHOP</i>	<i>PERK</i>	<i>eIF2a</i>	<i>IRE1</i>	<i>GRP78</i>	<i>Bcl2</i>	<i>Kaspaz-3</i>	<i>EDSS</i>	<i>T2 Lezyon</i>	<i>Total Lezyon</i>
Kaspaz-3	Spearman's ρ	.520*	-.266	.164	.379	.247	.250	.355	-.076	-.030	.266	.122	1.000	-.247	-.058	.097
	<i>P</i>	.019	.258	.490	.099	.294	.288	.124	.750	.901	.257	.609	.	.294	.808	.691
EDSS	Spearman's ρ	-.199	.167	.096	-.131	.028	-.201	-.056	.199	-.147	.022	-.155	-.247	1.000	.288	.158
	<i>P</i>	.400	.481	.689	.581	.907	.395	.815	.400	.535	.927	.513	.294	.	.218	.518
T2 Lezyon	Spearman's ρ	.109	-.002	-.036	-.162	.029	.214	-.030	.119	-.077	<.001	.145	-.058	.288	1.000	-.130
	<i>P</i>	.400	.992	.879	.495	.903	.364	.899	.619	.143	1.000	.542	.808	.218	.	.596
Total Lezyon	Spearman's ρ	.202	-.172	.112	.274	-.142	-.364	-.132	-.230	.011	-.421	.093	.097	.158	-.130	1.000
	<i>P</i>	.407	.481	.647	.256	.561	.125	.590	.343	.966	.073	.705	.691	.518	.596	.

*: *P* değeri .05 seviyesinde anlamlıdır. **: *P* değeri .01 seviyesinde anlamlıdır.

EK-8: Rmcorr analizlerinde kullanılan kod

library(rmcorr)

library(ggplot2)

library(readxl)

patient_colors <- c(

"1" = "#FF0000", # Red

"2" = "#FF7F00", # Orange

"3" = "#FFFF00", # Yellow

"4" = "#7FFF00", # Chartreuse

"5" = "#00FF00", # Green

"6" = "#00FF7F", # Spring Green

"7" = "#00FFFF", # Cyan

"8" = "#007FFF", # Azure

"9" = "#0000FF", # Blue

"10" = "#7F00FF", # Violet

"11" = "#FF00FF", # Magenta

"12" = "#FF007F", # Rose

"13" = "#FF5050", # Soft Red

"14" = "#FFBF00", # Golden

"15" = "#BFFF00", # Lime

"16" = "#00FFBF", # Aqua Marine

"17" = "#007FBF", # Cerulean

"18" = "#7F00BF", # Purple

"19" = "#BF00BF", # Deep Magenta

"20" = "#BF7F00" # Mustard

```

)

data <- readxl::read_excel("C:/Users/user/OneDrive/Desktop/Rmcorr_v2.xlsx")

data$time <- factor(data$time, levels = c("0A", "3A", "6A"))

data$hastalar <- as.factor(data$hastalar)

genes <- c("atf4", "atf6", "bax", "bcl2", "casp3", "chop",
          "perk", "eIF2a", "IRE1", "GRP78", "protein_bcl2", "protein_kaspaz3")

time_shapes <- c("0A" = 16, # Circle
                "3A" = 15, # Square
                "6A" = 17) # Triangle

results <- list()

for (gene in genes) {
  result <- rmcrr(participant = data$hastalar,
                 measure1 = data$EDSS, *
                 measure2 = data[[gene]],
                 dataset = data)

  results[[gene]] <- result

  plot <- ggplot(data, aes(x = Total_Lezyon, y = .data[[gene]], color = hastalar, shape
= time)) +
    geom_point(size = 3) +
    scale_color_manual(values = patient_colors) +
    scale_shape_manual(values = time_shapes) +
    labs(title = paste("Repeated Measures Correlation for", gene),
         x = "Total_Lezyon",
         y = gene,
         color = "Patient ID",
         shape = "Time Point") +

```

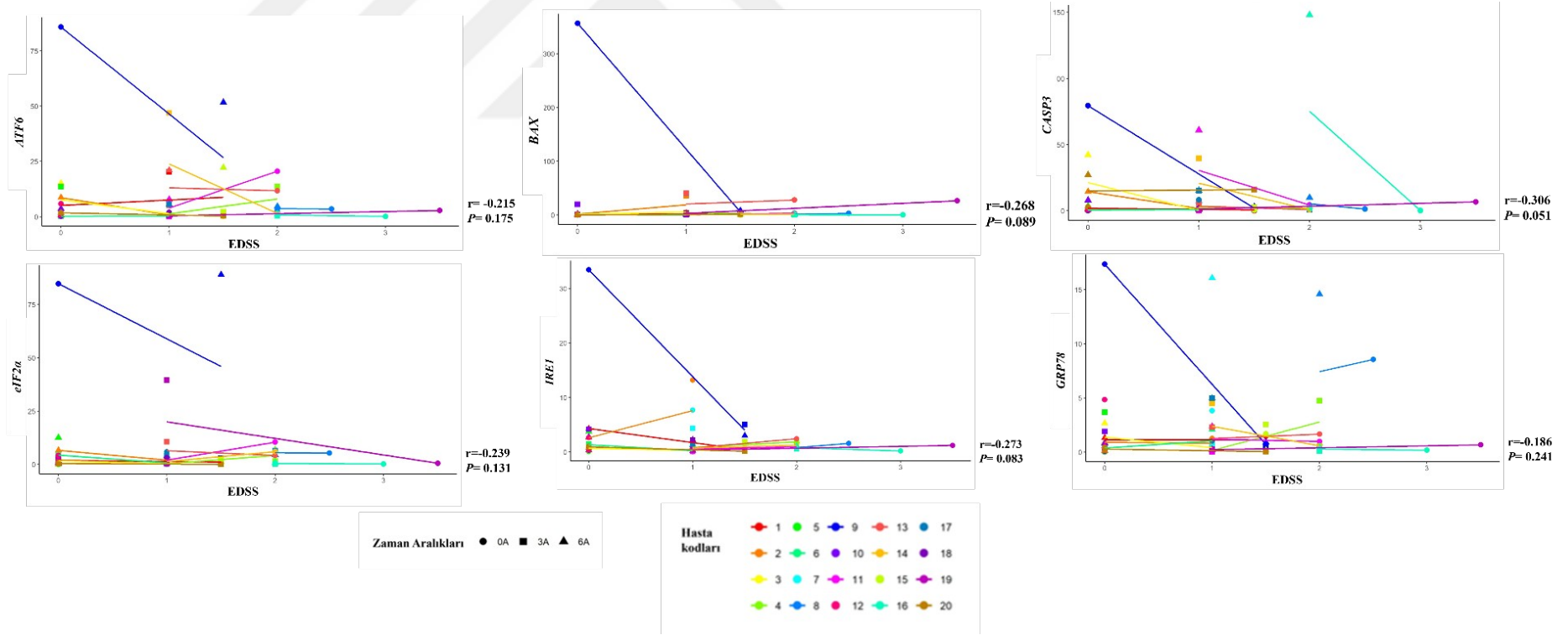
```

theme_classic() +
theme(panel.background = element_rect(fill = "white", color = NA),
plot.background = element_rect(fill = "white", color = NA),
legend.position = "bottom") +
geom_smooth(method = "lm", se = FALSE, aes(group = hastalar, color = hastalar),
size = 0.8)
plot_file <- paste0("Rmcorr_", gene, ".png")
ggsave(filename = plot_file, plot = plot, width = 8, height = 6, dpi = 300)}
output_file <- "C:/Users/user/OneDrive/Desktop/Rmcorr_results.txt" # Replace with
your desktop path
file_conn <- file(output_file, "w")
writeLines("Gene\tR-Value\tP-Value\tDegrees of Freedom (df)", file_conn)
for (gene in names(results)) {
r_value <- results[[gene]]$r # r-value
p_value <- results[[gene]]$p # p-value
df <- results[[gene]]$df # degrees of freedom
writeLines(sprintf("%s\t%.4f\t%.4e\t%d", gene, r_value, p_value, df), file_conn)}
close(file_conn)
cat("Results successfully exported to:", output_file, "\n")

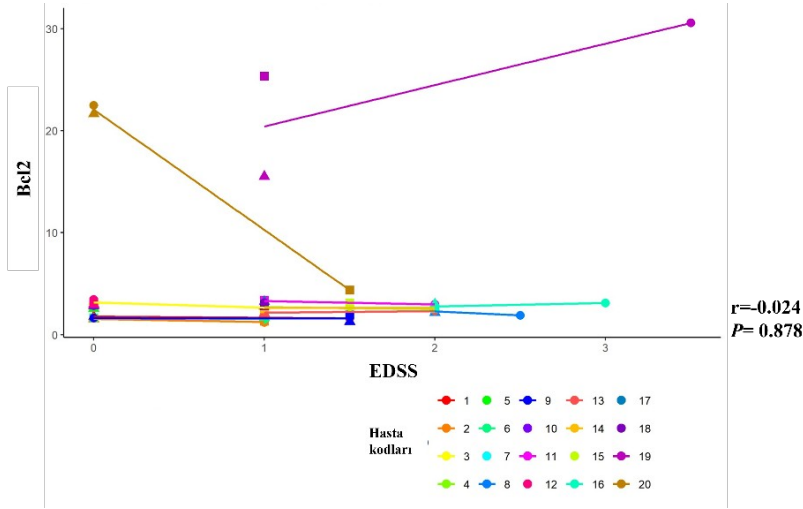
```

*****: Measure 1 olarak verilen EDSS parametresi yazısı kodun gösterimi açısından seçilmiştir. T2 lezyon ve total lezyon parametreleri kullanılarak yapılan Rmcorr analizlerinde EDSS yerine tek tek bu iki parametre yazılarak ilgili analizler gerçekleştirilmiştir.

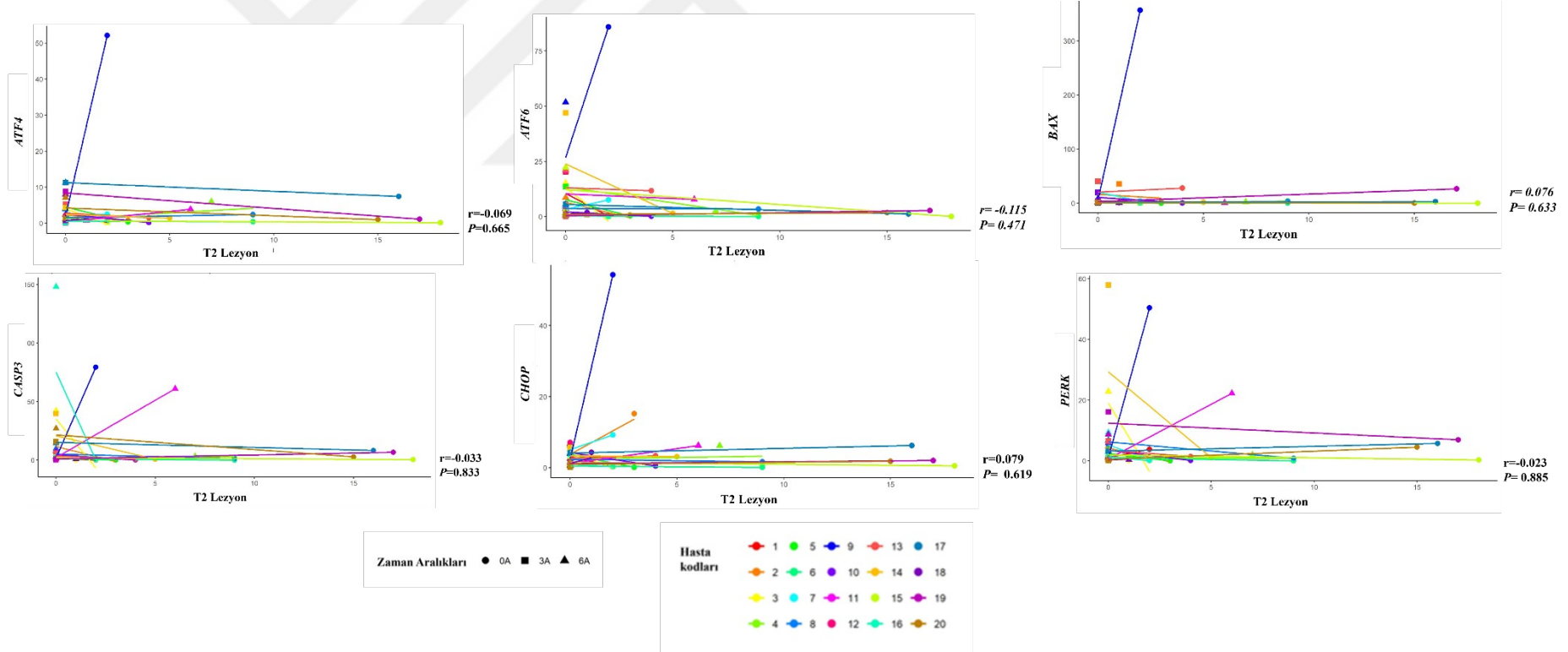
EK-9 :İstatistiksel olarak anlamlı sonuç vermeyen Rmcorr analizlerinden elde edilen grafikler



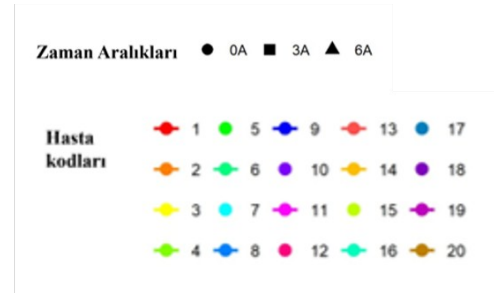
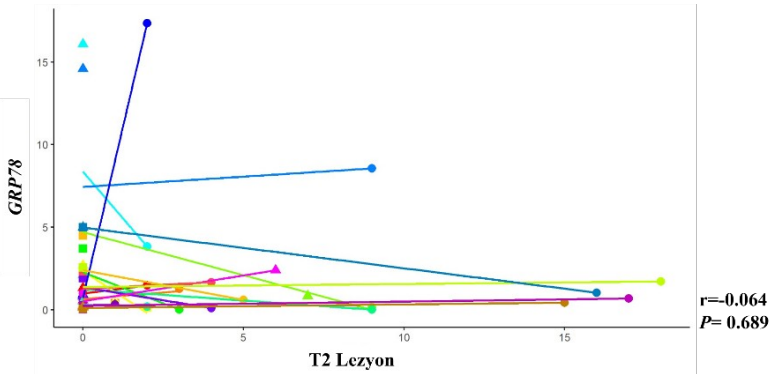
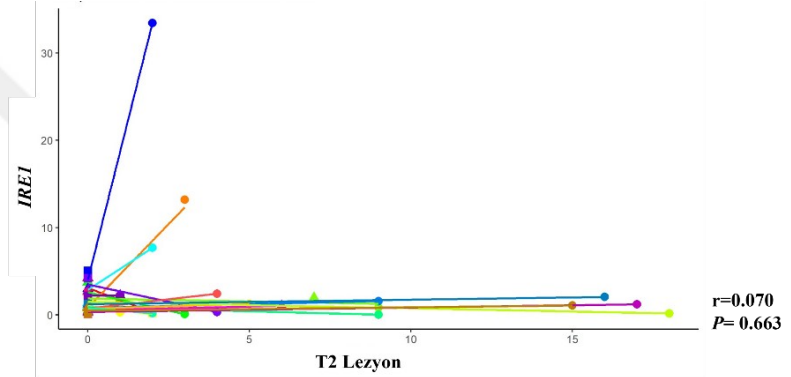
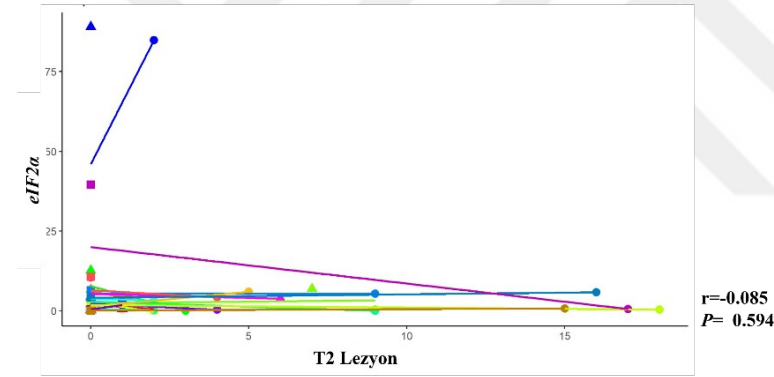
Ek Şekil 2 : M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle *ATF6*, *BAX*, *CASP3*, *eIF2α*, *IRE1* ve *GPR78* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafikler



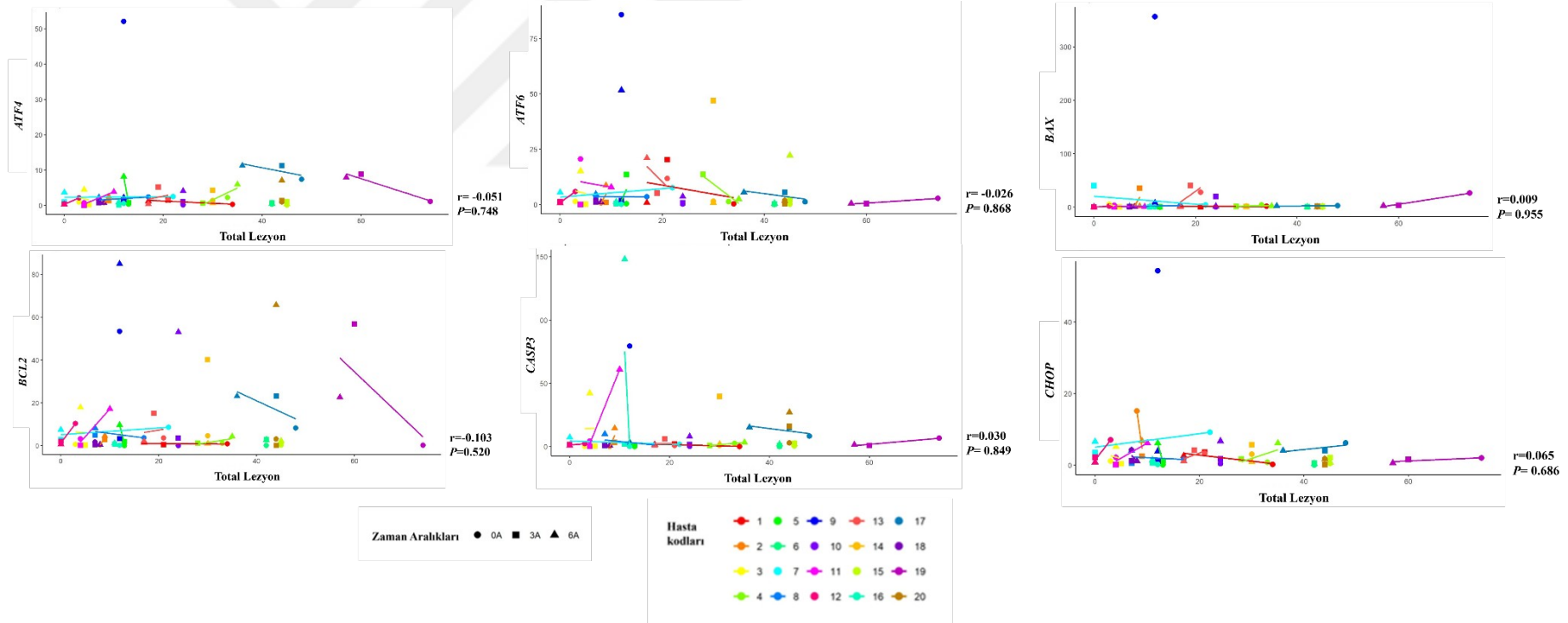
Ek Şekil 3: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen EDSS puanlarındaki değişimlerle Bcl2 proteininin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen Rmcorr analizi sonucunda elde edilen grafik



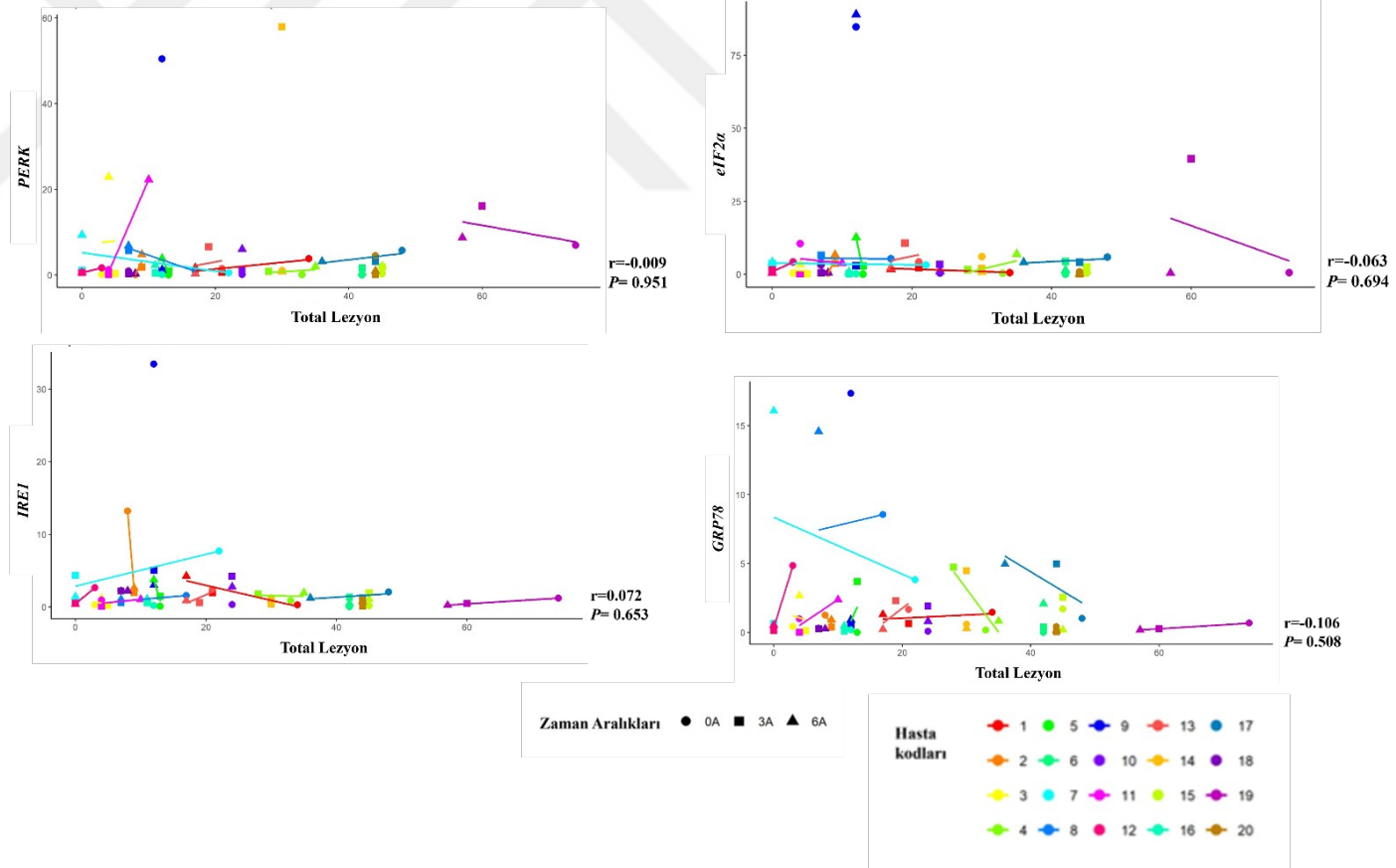
Ek Şekil 4: Soldan sağa, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle *ATF4*, *ATF6*, *BAX*, *CASP3*, *CHOP* ve *PERK* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafikler



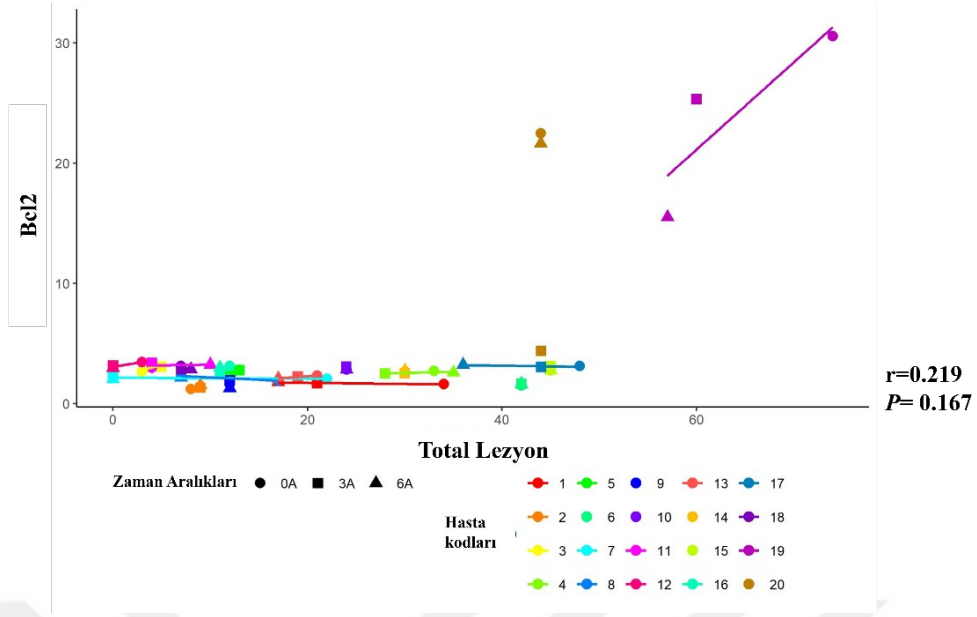
Ek Şekil 5: Solda sağa, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen T2 lezyon sayılarındaki değişimlerle *eIF2α*, *IRE1* ve *GRP78* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafikler



Ek Şekil 6: Soldan sağa, M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle *ATF4*, *ATF6*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3* ve *CHOP* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafikler



Ek Şekil 7: Solda sağa, M grubunu oluşturan RRMS’li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle *PERK*, *eIF2 α* , *IRE1* ve *GRP78* genlerinin REL değerlerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizleri sonucunda elde edilen grafikler



Ek Şekil 8: M grubunu oluşturan RRMS'li hastaların DMF tedavisi öncesi (0A) ve tedavinin 3.ayı (3A) ile 6.ayında (6A) belirlenen total lezyon sayılarındaki değişimlerle Bcl2 proteinin REL değerindeki değişimler arasındaki ilişkinin incelendiği Rmcorr analizlerinden elde edilen grafik

