T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
NÖROLOJİ KLİNİĞİ

BENİGN VE BENİGN OLMAYAN MULTİPL SKLEROZDA HASTALIK SÜRECİNDE ETKİSİ OLAN GENETİK YOLAKLARIN AKTİFLİK SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Selen Özyurt

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL / 2018

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
NÖROLOJİ KLİNİĞİ

BENİGN VE BENİGN OLMAYAN MULTİPL SKLEROZDA HASTALIK SÜRECİNDE ETKİSİ OLAN GENETİK YOLAKLARIN AKTİFLİK SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Selen Özyurt

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Recai Türkoğlu

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL / 2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve becerisini hiçbir zaman esirgemeyip ufkumu açan, bugünkü bilgi birikimime gelmemde büyük emeği olan, bu tezin hazırlanmasında hep yardımcı ve toparlayıcı olan hocam Prof. Dr. Recai Türkoğlu'na;

Hem bir öğretmen hem de bir doktor olarak hep örnek alacağım, asistanlığını yapmış olmaktan gurur duyduğum değerli eğitim sorumlum, hocam Doç. Dr. Hülya Tireli'ye;

Çalışma hayatımda her zaman desteklerini gördüğüm ve tecrübelerinden faydalandığım idari sorumlum, hocam Prof. Dr. Cemile Handan Mısırlı'ya;

Çalışmamda yardım elini uzatan ve yakından ilgilenen, her aşamasında bana destek veren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdem Tüzün'e;

Çalışmamın kognitif testlerin uygulanması kısmında emeğini esirgemeyen psikolog Erdil Arsoy'a, genetik çalışmalar kolunu büyük bir emekle tamamlayan Sayın Vuslat Yılmaz'a;

Bu dört yıllık süre içinde bilgisini, anlayışını, tecrübesini benden esirgemeyip her konuda destek olan tüm Nöroloji Kliniği uzmanlarıma;

İhtisasım süresince birlikte çalıştığım servisimizin değerli hemşire ve personellerine,

Doğduğum günden bu yana daima arkamda olan, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, kızları olmaktan her zaman onur duyduğum canım annem ve babam, Nursel Özyurt ve Zafer Özyurt'a; tüm kalpleriyle her daim bana destek olan, başaracağıma olan inançlarıyla bana güç veren kardeşlerim Aslı Özyurt ve Elif Özyurt'a;

Ve tüm bu zorlu sürecimde yanımda olarak sevgi, destek ve güveni ile bana cesaret ve başarma azmi veren sevgili Yiğit Köse'ye

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Selen Özyurt

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR iii
TABLO LİSTESİ v
ŞEKİL LİSTESİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1 MULTİPL SKLEROZ 2
2.2 MS'İN TARİHÇESİ 2
2.3 EPİDEMİYOLOJİ 3
2.4 ETİYOLOJİ 4
2.5 MS'İN PATOLOJİSİ 10
2.6 MS'İN PATOFİZYOLOJİSİ 16
2.7 MS'İN İMMÜNOLOJİSİ 16
2.8 KLİNİK SEYİR 19
2.9 MS'İN TANISI 24
2.10 MS'İN PROGNOZU 28
2.11MS'TE UYKU BOZUKLUKLARI 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1 MİKROARRAY TÖNTEMİ NEDİR 30
3.2 PROJENİN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI 32
3.3 NÖROPSİKOLOJİK DEĞERLENDİRME 34
3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ 34
4. BULGULAR 35
4.1 OLGULARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ 35
4.2 NÖROPSİKOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI 36
4.3 MİKROARRAY GEN EKSPRESYON SONUÇLARI 37
4.4 RT-PCR EKSPRESYON DÜZEYİ SONUÇLARI 38
5. TARTIŞMA 40
6. KAYNAKLAR 44

KISALTMALAR

BANK1 : B cell scaffold protein with ankryn repeats 1

BLNK : B cell linker

BMS : Benign MS

BOS : Beyin omurilik sıvısı

BRB-N : Rao's Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests

CMV : Cytomegalovirus

COWAT : Controlled Word Association Test

CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

DAE : Deneysel allerjik ensefalomiyelit

DETAE : Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilimdalı

DIS : Dissemination in Space

DIT : Dissemination in Time

EBNA-1 : EBV nükleer antijeni-1

EBV : Epstein-Barr Virüs

EDSS : Expanded Disability Status Scale

GLRA2 : Glycine receptor alfa 2

GM-KSF : Granülosit – makrofaj koloni stimüle edici faktör

GWAS : Genome-wide association studies

HERV : Human Endojen Retrovirus

HHV-6 : Human Herpesvirus-6

HPRT : Hipoksantin fosforibozil transferaz

IFN-β : İnterferon beta

IPA : Ingenuity Pathway Analysis

KBB : Kan beyin bariyeri

KİS : Klinik izole sendrom

KKMS : Klinik kesin MS

MAG : Miyelin-asosiye glikoprotein

MAP : Mikobakterium Avium Paratüberkülozis

MBP : Myelin Basic Protein

MOG : Miyelin oligodentrosit glikoprotein

MPF : Megakaryocyte Potentiating Factor
MRG : Manyetik rezonans görüntüleme
MRZ : Measles – Rubella – Zoster
MS : Multipl skleroz
MSFC : Multiple Sclerosis Functional Composite
MSIS : Multiple Sclerosis Impact Scale
MSS : Merkezi sinir sistemi
NK : Natural Killer
NMO : Nöromiyelitis optika
Non-BMS : Benign olmayan MS
OCT : Optical coherence tomography
OKB : Oligoklonal bant
PASAT : Paced Auditory Serial Addition Test
PLP : Proteolipit Protein
POL-1 : RNA polimeraz I
PPMS : Primer progresif MS
PRMS : Progresif relapsing MS
RİS : Radyolojik izole sendromdur
RRMS : Relapsing remitting MS
RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAPMS : Single attack progressive MS
SDMT : Symbol Digit Modalities Test
SLE : Sistemik lupus eritematozus
SPMS : Sekonder progresif MS
TGF-β : Transforming Growth Factor beta
TLR-4 : Toll like reseptör-4
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4 : Very Late Antigen-4
VZV : Varicella Zoster Virus

TABLOLAR LİSTESİ

TABLO 1: Klinik olarak MS düşündürtecek semptomlar ve bu durumlarda kullanılabilen semptomatik tedavi seçenekleri

TABLO 2: MS ayırıcı tanısında düşünülmesi gereken hastalıklar

TABLO 3: 2017 McDonald kriterlerinde belirlenen gerekli maddeler

TABLO 4: Araştırmada yer alan hastalara ait sayısal veriler

TABLO 5: Hastaların nöropsikolojik batarya test sonucu ortalamaları

TABLO 6: BMS ve SK gruplarının BRB-N skorları karşılaştırması

ŞEKİL LİSTESİ

Resim 1: Reaktif astrositler ve Creutzfeld-Peters hücreleri

Resim 2: Lezyonların patolojik paternleri

Resim 3: Naif T lenfositlerinden T lenfosit alt tiplerinin farklılaşması

Resim 4: MS'in klinik seyirleri

Resim 5: Cam yüzeye tutturulan DNA yapıları temsili

Resim 6: DNA mikroarray görünümü örneği

Resim 7a – 7b: Farklı biyoinformatik analiz yöntemleri ile BMS olgularında anlamlı ekspresyon değişikliği gösterip sadece B lenfosit işlevleri ile ilişkili olduğu saptanan genler

Resim 8: BMS, non-BMS ve sağlıklı kontrol olgularında RT-PCR yöntemi ile belirlenen periferik kan mononükleer hücre gen ekspresyon düzeyleri. Anlamlı farklılıklar ($p<0.05$) üst çizgi ile işaretlenmiştir

ÖZET

Amaç: Multipl skleroz'da özürlülük, hastalığın klinik tipine göre farklı düzeylerde oluşmaktadır. Çalışmada benign multipl skleroz, benign olmayan multipl skleroz ve sağlıklı kontrol olgularının periferik kan mononükleer hücrelerinde cDNA mikroarray teknikleriyle bu klinik tiplerin patogenezinden sorumlu gen ekspresyon düzeyleri (ED) araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Multipl Skleroz Polikliniği'nde klinik ve laboratuar takip kayıtları tutulan, relapsing remitting, 15 benign MS (BMS), 16 benign olmayan MS hastası (non-BMS) ve 38 sağlıklı gönüllü çalışmaya alınmıştır. Tüm hasta ve sağlıklı gönüllülere Rao'nun Kısa Tekrarlanabilir Nöropsikolojik Test Bataryası uygulanmış, kan örnekleri alınmış, cRNA izolasyonu, mikroarray hibridizasyon ve biyoinformatif analizi yapılarak patogenezde yer alabilecek ve klinik spektrum çeşitliliğini açıklayabilecek gen farklılıklarını saptama amaçlı 26083 gen taranmıştır. En anlamlı değişiklik bulunan 28 genin RT-PCR ile validasyonu yapılmıştır.

Bulgular: B lenfosit işlevleri ile ilgili BANK1 ve BLK, hem B hem T lenfosit işlevleri ile ilgili olan SWAP70, TGFB1 ve ATP1B3 genlerindeki ekspresyon değişiklikleri validasyonda anlamlı saptanmıştır. BLK, BANK1 ve SWAP70 genlerinin ED'leri BMS ve non-BMS olguları arasında aynıyken; sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında BLK'in non-BMS olgularında, BANK1'inse hem BMS hem de non-BMS olgularında ED'lerinin anlamlı derecede baskılandığı saptanmıştır. ATP1B3 ve TGFB gen düzeyleri non-BMS olgularında BMS ve sağlıklı kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşüktür. TGFB'nın ED'siyle progresyon indeksi ($p=0.034$; $R=-0.531$), SWAP70 ve BANK1'in ED'siyle 25-adım test skorları (sırasıyla: $p=0.002$, $R=0.730$; $p=0.007$, $R=0.646$) ve BANK1'in ED'siyle EDSS skorları ($p=0.020$; $R=0.576$) arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmıştır. İncelenen genlerin ED'leriyle kognitif test skorları arasında korelasyon yoktur. BMS grubunda kognitif fonksiyonlarda sağlıklılara göre anlamlı bozulma görülmüştür.

Sonuç: Bu tez çalışmasında BMS olgularında kognitif yıkımın diğer MS olgularınınkine eşit düzeyde olduğu bilgisi doğrulanmıştır. MS olgularında prognozu belirlemeye yardımcı olabilecek genetik faktörler tanımlanmış, MS patogenezinde rol alan mekanizmaların aydınlatılması yolunda B lenfositleri ile ilişkili yeni ipuçları bulunmuş ve MS'de olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek hedef moleküller belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benign Multipl Skleroz, mikroarray hibridizasyon, B lenfositleri, kognitif yıkım, gen ekspresyon düzeyleri

ABSTRACT

Objective: In different multiple sclerosis clinical types, diverse grades of disability occurs. We investigated neurocognitive decline and high numbers of genes which can explain the degree of disability in Benign and Non-benign Multiple Sclerosis (BMS / non-BMS) patients and healthy controls.

Materials and Methods: In this study, 15 BMS and 16 non-BMS patients who are followed up in our Multiple Sclerosis Center, in Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital and 38 healthy controls were evaluated. All 69 participants did Rao's Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests and give their peripheric blood sample. Isolation of cRNA, microarray hybridisation and bioinformative analysis processes were implemented to the samples. With microarray procedure 26083 genes were scanned and the most statistically significant 28 genes were validated by RT-PCR.

Results: In the consequence of RT-PCR validation expression levels of 5 genes were found statistically significant: BANK1 and BLK (which are associated with B lymphocyte functions); SWAP70, TGFB and ATP1B3 (which are associated with both B and T lymphocytes functions). In non-BMS group expression levels of BLK; in both BMS and non-BMS group expression levels of BANK1 were found supressed. Expression levels of ATP1B3 and TGFB were significantly decresed in non-BMS group compared to BMS group and healthy controls. Expression levels of TGFB and progression index ($p=0.034$, $R=-0.531$), expression levels of BANK1 and EDSS scores ($p=0.020$; $R=0.576$) were correlated each other. Also expression levels of SWAP70 and BANK1 were correlated with Timed 25-Foot-Walk test (respectively $p=0.002$, $R=0.730$; $p=0.007$, $R=0.646$). No correlation was found between neurocognitive test's scores and expression levels of these genes. In BMS group significant decline was found compared to healty controls.

Conclusion: In this study genetic factors which help the prediction of MS prognosis were discribed and new clues about B lymphocytes roles in pathogenesis were found.

These new informations can be used as new targets to treat MS. Also it is confirmed that the BMS patients have cognitive decline as severe as the non-BMS patients.

Key words: Benign multiple sclerosis, microarray hybridisation, B Lymphocytes, cognitive decline, gene expression levels

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz (MS) santral sinir sistemi (SSS)'nin en sık rastlanan inflamatuar demiyelinizan hastalığıdır. Genellikle 30-50 yaşları arasında ortaya çıkan MS'in kesin etiyolojisi bilinmemekle beraber, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde çevresel tetikleyicilerin etkisiyle beyin ve omurilik ak madde bölgesinde ortaya çıkan otoimmün kökenli inflamatuar bir yanıt sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Zaman içinde MS olguları atakların azaldığı ve özürlülüğün giderek arttığı progresif bir evreye girerler. On yıl boyunca özürlülük skorunun düşük değerlerde kaldığı benign multipl skleroz, MS olgularının %10'undan azında görülür. Bu hastaların somatik nörolojik bulgularında yavaş progresyon gözlenir, MS klinik değerlendirme skorları uzun yıllar boyunca düşük kalabilir. Fakat bunun yanı sıra diğer sinir sistemi işlevleri ileri düzeyde bozulabilmektedir. Kötü gidişli olgularda ise her kategoride belirgin kötüleşme yıllar içerisinde göze çarpar. Her iki grup arasında farklı genetik temellerin yattığı hipotezi son zamanlarda gündemdedir.

Kognitif bozukluk da sıklıkla görülür ve hastaların %70'e yakınını etkiler. Bilişsel işlevler hastalığın geç ve erken (klinik izole sendrom da dahil) aşamalarında bozulabilmektedir.

Patofizyolojisinde birden çok molekülün etkileşim içerisinde olduğu hastalıklarda tüm genom ölçekli mikroarray çalışmalarının hastalığın altında yatan moleküler yolların belirlenmesinde oldukça önemli katkılar yapabildiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmada mikroarray yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada benign MS, benign olmayan MS ve sağlıklı kontrol olgularının periferik kan mononükleer hücrelerinin kullanıldığı cDNA mikroarray teknikleri ile bu klinik tiplerin patogenezinde altta yatan gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Elde edilen veriler hastaların özürlülük düzeyleri ile karşılaştırılarak, MS'in patogenezi ve benign seyirli alt tipinin immünolojik mekanizmaları ile ilgili saptamalar yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 MULTİPL SKLEROZ

Multipl skleroz (MS) merkezi sinir sisteminin (MSS) nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon ile giden, otoimmün kökenli, kronik demiyelinizan bir hastalığıdır. Kraniyal alanda, medulla spinaliste, optik sinirlerde multifokal tutulumlar yapar. Genelde erken evrede demiyelinizasyona değişen oranlarda remiyelinizasyonun da eşlik etmesi ile oluşan tekrarlayan epizodlarla karakterizedir. Prezentasyonu hastada hastaya, lezyon lokalizasyonuna ve büyüklüğüne, atak şiddetine ve zamansal yayılımına göre oldukça çeşitli olabilir. Aynı zamanda progresyon özelliği de vardır. Erken dönemde inflamasyon, oligodentrosit kaybı ve reaktif astrogliozis ile başlayan miyelin hasarı, hastalık ilerledikçe yaygın mikrogliyal aktivasyon ve mitokondiyal disfonksiyonla oluşan yoğun aksonal dejenerasyona ilerler. Hastalığın klinik formları atak ve progresyon oranına göre gruplanır [1]. Özellikle 20-50 yaş aralığında travmadan sonra en sık karşılaşılan nörolojik özürlülük nedenidir. Erişkinlerin %0.5'lik kesiminde 60 yaş ve üzerinde başlar. Hastaların %50'si 15 yıl içeriside yardımsız yürüyemeyecek hale gelir [2].

Eskiden belirti ve bulguların tek bir bölgeyi gösterdiği durumlarda kesin tanı konamayıp izlem gerekirken günümüzde revize edilen McDonald kriterlerine göre ilk klinik atak sırasında gerekli Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) veya beyin-omurilik sıvısı (BOS) bulguları da saptanırsa MS tanısı konulabilir hale gelmiştir [3].

2.2 MS'İN TARİHÇESİ

Tarihte MS tanımın 14. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Klinik ve patolojik özelliklerinin korelasyonuna ise ilk kez 1838'de Jean-Martin Charcot'un notlarında rastlanır [4].

Fransız bilim adamı Dr. Louis Ranvier 1878 yılında miyelini ve 1928 yılında da miyelini üreten hücreler olan oligodentrositleri keşfetmiştir [5]. Edinburgh Üniversitesi'nden Dr. James Dawson 1916'da mikroskopik miyelin hasarı ve beyinde

oluşan perivasküler inflamasyonu göstermiştir [6]. Yine yirminci yüzyıl başlarında 1935'te New York City Rockefeller Enstitüsü'nden Dr. Thomas Rivers deney hayvanlarına miyelin enjekte ederek otoimmün bir yanıt oluşturmuş ve MS benzeri bir hastalık meydana getirmiş böylece de MS'in direk viral bir hastalık olmadığını göstermiştir. Bu MS modeline deneysel allerjik ensefalomiyelit (DAE) denmiştir ve sonraki nöroimmünoloji çalışmalarına çok yardımcı olmuştur [7]. DAE modeli üzerinde çalışılarak 1960'larda T hücrelerinin inflamasyonda rol oynadığı ve BOS'ta B hücrelerinin de bulunduğu ve BOS'ta Ig üretimi yaptıkları tespit edilmiştir [8,9]. Bu gelişmeden sonra MS'te otoimmünitenin önemi giderek daha fazla anlaşılmıştır. MRG ise ilk kez 1981'de İngiliz araştırmacı Dr. Ian Young tarafından MS'te kullanılmıştır [6]. Sonraki yıl nörolog Dr. John Kurtzke hastaların klinik değerlendirmesi ve takibi için Genişletilmiş Engellilik Durumu Skalasını (Expanded Disability Status Scale – EDSS) geliştirmiştir [10].

Geçtiğimiz 10 yılda demiyelinizan hastalıklar kategorisinde ve spesifik olarak MS'te tanı, sınıflandırma ve tedavi yöntemlerinde köklü değişimler olmuştur [3]. Son gelinen noktada MS artık ak maddeye sınırlı bir hastalık olarak tanımlanamamaktadır, gri maddenin de ak madde kadar tutulduğu görülmüştür [11]. Hatta gri madde tutulumu, hastalığın klinik seyri ve disabilite gelişim düzeyi hakkında ak madde lezyonlarından daha prediktiftir [12]. Önceden düşünülenin aksine kognisyonu daha erken evrede ve daha sık olarak etkilediği anlaşılmıştır Patogenetik olarak da önceden bir T lenfosit hastalığı olarak görülürken artık hem patolojik hem de klinik çalışmalarla B lenfositlerinin de patogenezde rol oynadığı kanıtlanmıştır [13].

2.3 EPİDEMİYOLOJİ

MS, ABD'de yaklaşık 450.000 insanı, dünyada 2.3 milyon insanı etkileyen travma dışı nörolojik dizabilite sebeplerinin oldukça sık bir nedenidir [14]. Dünya üzerindeki dağılımına bakıldığında kuzey Avrupa, kuzey Amerika ve Avustralya etrafında sıklığın fazla olduğu görülür. Tropikal bölgelerde, orta doğu, Afrika ve güney Amerika'da ise sıklık azalmıştır. Bu dağılım kuzey Avrupa genlerinin MS'e olan etnik yatkınlığını göstermektedir. Aynı zamanda çevresel faktörler de bu dağılımda etkilidir

[15]. Türkiye'de Edirne ilinde 2011 yılında yapılan bir epidemiyoloji çalışmasında MS prevalansı 33.9 -101.4/100000 ve MS insidansı 3.48/100000 olarak bulunmuştur [16]. Çocukluk çağında yüksek riskli bölgeye göç etmek riski artırır [17].

Başlangıç yaşı değişken olmasına rağmen genelde 20-40 yaş arası genç erişkinlik döneminde tanı alır ve kadınlarda erkeklerden 2 kat, çocuk yaş grubunda ise kız çocuklarında erkek çocuklarından 3 kat daha sıktır. Dördüncü dekaddan itibaren ise sıklık erkeklerde daha fazla olmaya başlar ve daha çok primer progresif seyirde olma eğilimindedir [15].

2.4 ETİYOLOJİ

MS'in etiyolojisi multifaktoriyeldir. Bunları non-infeksiyöz çevresel faktörler, infektif ve immünolojik, genetik faktörler olarak sınıflamak mümkündür.

2.4.1 İnfeksiyöz Olmayan Çevresel Faktörler

Çevresel etkenlerden D vitamini eksikliğinin MS'e yatkınlık yaratmasının olası mekanizması B hücre aktivasyonu ve NK hücre proliferasyonunda artış sonucunda demiyelinizasyon oluşumdur. D vitamini yüksekliği ise regülatuar T hücrelerinde aktivasyon yapması ve nöroprotektif olması nedeni ile MS'e karşı koruyucudur [18]. Soğuk iklim kuşaklarında güneş ışığı maruziyetinin azlığı ve D vitamini üzerinden olduğu düşünülen bir sebeple MS prevalansı fazladır.

Çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin beslenme alışkanlığı proinflamatuar sitokinlerde ve T hücre proliferasyonunda artışa sebep olur. Antioksidanların eksikliği ise serbest radikallerde birikime yol açar. Retinoik asit ve probiyotiklerin azalması Th17 hücrelerinde artışa neden olurken; artışları antiinflamatuar sitokin aktivasyonu, Th1-Th2 dönüşümünde artış ve regülatuar T hücreleri aktivasyonunu sağlar ve hastalık aktivitesini azaltma etkisi vardır [19]. Fazla tuz tüketimi ve adölesan dönemindeki obezite de bir risk faktörüdür. Sigara MS riskini ve hastalık aktivitesini artırır. Retrospektif bir çalışmada sigarayı bırakmanın sigarasız 10 yılda EDSS:4 skoruna ulaşma riskini %33, EDSS:6 skoruna ulaşma riskini %26 azalttığını göstermiştir [20].

2.4.2 İnfeksiyöz ve İmmünolojik Faktörler

Enfeksiyonlar otoreaktif T hücrelerini moleküler benzerlik ya da süperantijen yapısında olmak gibi spesifik olmayan nedenlerle aktive edebilir. MS hastalarının %90'ında BOS'ta oligoklonal IgG bantlarının (OKB) saptanması da henüz tanımlanamamış antijenik bir hedef olma olasılığını akla getirir [21]. Patojen, merkezi sinir sisteminde latent kalıp yıllar sonra reaktivasyon kazanarak oligodentrositleri lizise uğratabilir veya patojenin antijenleri, immünopatolojik süreci aktifleyip demiyelinizasyonu başlatabilir. Fakat diğer yandan MS'li hastaların serebral hücreleri çeşitli tekniklerle analiz edilmiş ve herhangi bir infektif ajan antijeni tespit edilememiştir.

Birçok hastada kızamık, kabakulak, rubella, herpes gibi çeşitli virüslere karşı BOS'ta artmış antikor titreleri vardır fakat bunlar özgül bulunmamıştır. Herpes virüs ailesinin Human Herpesvirus-6 (HHV-6), Varicella Zoster Virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV) ve özelikle de Epstein-Barr Virüs (EBV) tipleri MS etiyolojisinde araştırılmıştır. İnfektif faktörlerden özellikle daha geç yaşta (20'li yaşlara yakın) ve daha ağır geçirilmiş EBV enfeksiyonunun EBV nükleer antijeni-1 (EBNA-1) viral peptidinin; Mikobakterium Avium Paratüberkülozis (MAP) enfeksiyonunun ise MAP_0106c bakteriyel proteininin Myelin Basic Protein (MBP)'e benzerliği nedeni ile MS gelişimi için risk faktörü oldukları kabul edilmektedir [22]. MBP; MSS miyelininin %30'unu oluşturan, membranın sitoplazmik yüzeyine bağlanan, DAE modelinde otoimmün hedef olarak kullanılan ve MS patogenezinin bir kısmından sorumlu olan proteindir. Geç yaşta genç erişkinlik döneminde geçirilen EBV enfeksiyonunun daha belirgin bir risk faktörü olması "hijyen hipotezi" olarak adlandırılır. Temiz çevrede yaşayarak erken yaşlarda patojenle karşılaşmamış olan metabolizmanın genç erişinlik döneminde bu patojenle karşılaştığında verdiği aşırı immün yanıtı ifade eder. Ayrıca patolojik değişiklikleri araştıran çalışmalar kronik MS plaklarında EBV ile enfekte olmuş yüksek oranda B hücresi bulunduğunu göstermektedir [23].

HHV-6; MSS'nde T hücrelerini, oligodentrositleri ve mikroglial hücreleri enfekte eden nörotropik bir virüstür, litik veya latent fazda varlığını sürdürebilir. Ayrıca HHV-6'nın U24 proteini de MBP'e benzer bulunmuştur [24].

Herpesvirüslere ek olarak Human Endojen Retrovirus'lerin (HERV) de MS'in gelişiminde ve olan hastalığın progresyonunda risk faktörü olduğu gösterilmiştir. HERV; 30-70 milyon yıl öncesinde eksojen retrovirüsler olarak infekte ettiği insan ırkının genomuna integre olmuş retroviral genlerdir [25]. Yıllar içerisinde biriken mutasyonlar ve rekombinasyonlar sonucunda enfekte etme yeteneklerini kaybetmişlerdir. Yaklaşık 31 HERV ailesi tanımlanmıştır. MS ile bağlantılı olduğu bildirilen ilk HERV tipi HERV-W ailesidir. HERV-K ve HERV-H ailelerinin de MS hasta gruplarının kan, beyin ve BOS örneklerinde artmış olarak bulunduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Deneysel modellerde HERV-W'a ait "envelope" lokusu sorumlu bulunmuştur. Bu lokus synsytin-1 denen ve deneysel modellerde immünmodulatuar özelliği gösterilen bir proteini kodlamaktadır [26]. MS hastalarının monosit, NK ve B hücrelerinde sağlıklı kontrollerinkine göre anlamlı düzeyde artmış miktarlarda HERV-W *env* RNA'sı ve protein ekspresyonu saptanmıştır. Fakat bu CD4+ veya CD8+ T hücrelerinde bulunmamıştır [27]. Oligodentrosit hasarı ve demiyelinizasyon, HERV-W Env proteininin Toll like reseptör-4 (TLR-4) aktivasyonu yapıp iNOS ve proinflamatuar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNFα) artmasına yol açması mekanizmasına bağlıdır. Ayrıca aktif MS'i olan hastaların da B hücre ve monositlerde HERV-H *env* proteininin stabil MS ve sağlıklı kontrol gruplarına göre artmış olduğu görülmüştür [27].

2.4.3 Genetik Faktörler

MS'te multigenik bir kalıtımsal yatkınlık vardır. Fakat aday genlerin çalışma sonuçları tartışmalıdır. Çalışmalarda 6q21'de kodlanan sınıf II doku grubu kompleksi alelleri HLA-DR15 ve HLA-DQ6 ile MS'e yatkınlık arasında bir asosiasyon bulunmuştur. Türk MS populasyonunda da HLA-DR1 haplotipi pozitifliği anlamlı yüksek saptanmıştır fakat geçirdiği risk oranı küçüktür. Ayrıca MBP geninin kodlandığı 18. Kromozom üzerindeki q23 bölgesinde de bağlantı saptanmıştır [28].

Hensiek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada HLA DR15 aleli varlığı genç yaşta MS tanısı alma ve kadın cinsiyet ile ilişkili bulunurken genin hastalık tipi (relapsing remitting, primer progresif veya sekonder progresif), klinik özellikleri

(optikospinal form, dissemine form vb.), OKB pozitifliği ve MR bulguları üzerinde etkili olmadığı görülmüştür [29]. Çalışmanın sonuçları HLA-DR15 geninin MS'in seyrini etkilemekten ziyade aleli bulunduran kişilerde MS'e yatkınlığa sebep olduğunu gösterir niteliktedir.

Klinik izole sendrom (KİS)'un klinik kesin MS'e dönüşümünde de genetiğin katkısı çalışılmıştır. Yine kesin olmamakla birlikte DR2 varlığının bu dönüşümde etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır [30]. Fakat rölatif risk düşüktür ve prognostik belirteç olarak kullanılamaz. MS hastalarında özürlülüğün hızlı veya yavaş ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalar da merak konusudur.

T-hücre reseptör genleri (T-cell receptor / TCR genes), sitotoksik T lenfosit antijeni-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 / CTLA4 genes), immünoglobulin ağır zincir genleri, yapısal miyelin ve büyüme faktörü genleri, çeşitli sitokin ve kemokin genleri ve bazı mitokondiyal genler araştırılmaktadır [15]. B hücreleri ile alakalı ise CD40, CXCR4 ve CXCR5 genlerinin MS'e duyarlılık oluşturduğu düşünülmüştür [31].

Aday genler yüksek genetik heterojenite nedeni ile kolay saptanamamaktadır. Birçok extrasellüler matriks proteini geni, B lenfosit yapı ve fonksiyonu ile ilgili genler, immünolojik yanıtlar ve sitokin yolakları genetiği araştırılan kategoriler arasındadır. PXDN bu genlerden biridir. Kornea ve lens epitelinde, az miktarda da normal beyin dokusunda eksprese edilir. Primer glial veya metastatik beyin tümörlerinde mikrovasküler endotelde upregüle olur [32, 33]. PXDN endoplazmik retikulumda üretilip dışarıya salınan Peroksidasin denen bir ekstraselüler matriks proteinini kodlar [33]. Peroksidasin hidrojen peroksidaz metabolizmasında görev alır. PXDN mutasyonu tip 4 kollajenin formasyonunu bozar ve katarakt, korneal opasiteler, iridokorneal adezyonlar gibi anterior segment defektlerine neden olur. Beyinde de tip 4 kollajenin ve bazal membranın formasyonu bozulur. Ayrıca intrakraniyal hemorajiler ve tip 1 porensefali ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir [34, 35].

MS patogenezinde B hücrelerine ait birçok genin adı geçmektedir. Dördüncü kromozomda kodlanan BANK1 (B cell scaffold protein with ankryn repeats 1) geni B lenfosite spesifik bir iskelet proteinidir. İntraselüler alanda BCR (B cell receptor)

aracılı kalsiyum mobilizasyonunda görev alır. Sistemik lupus eritematozusta (SLE) bu genin mutasyonunun gösterildiği hastalar vardır. Ayrıca BANK1 polimorfizmi otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [36-38]. BLNK (B cell linker) geni de B lenfosit gelişiminde rol oynayan sitoplazmik bir adaptör görevindedir. ALL ve bazı AML türlerinde rolü olduğu gösterilmiştir [39]. EBI geni ise EBV enfeksiyonu esnasında B lenfositlerde ekspresyonunun artmasıyla bilinir. Hücre dışına salınan ve 28kDa'luk bir başka protein ile birleşerek IL-27 sitokinini oluşturan bir glikoproteini kodlar. IL-27; IL-12 ailesindendir ve T ile B hücrelerinin düzenlenmesinde görev alır. Lupuslu fare modellerinde, regülatör T hücrelerini artırarak Th1/Th2 sitokin dengesini düzenlediği, otoimmün ve inflamatuar yanıtı baskıladığı gösterilmiştir [40].

MSLN geni son ürün olarak iki farklı proteinin üretildiği bir pre-pro-protein kodlar. Bu proteinlerden biri kemik iliğinde megakaryositleri aktive eden "Megakaryocyte Potentiating Factor" (MPF), diğeri bir hücre adezyon molekülü olan Mezothelin'dir, epitelyal mezotelyoma, over karsinomları, plevral mezotelyoma gibi neoplazilerde arttığı gözlenmiştir [41].

MS patogenezinde adı geçen en önemli genlerden biri de SWAP70'tir. İmmün hücrelerin aktivasyon, migrasyon ve vasküler adezyonunda görev alır, düzeyi T hücre kökenli sitokinlerin artışı ile korele olarak artar. Çalışmalarda MS atak sırasında incelenen MS hastalarında SWAP70 antikoru pozitif olanların negatif olanlara göre daha düşük dizabilite seviyesinde olduğu gösterilmiştir, aynı zamanda pozitif olan hastalarda da ekspresyon düzeyi esas olarak atak esnasında artmaktadır. EDSS düşüklüğü ile SWAP70 ekspresyonu düzeyi ters koreledir [42, 43].

Membran kanal proteinlerini kodlayan genlerden ATP1B3 geni Na^+/K^+ATPaz ailesinin bir beta zincir proteini subunitini kodlar. Na^+/K^+ATPaz sinir ve kas hücrelerinde uygun elektrokimyasal gradyent için iyon geçişinin yapıldığı başlıca integral proteindir [44]. KCNS3 geni; fonksiyonu istirahat membran potansiyelini sağlamak olan, aksiyon potansiyelinin şekil ve sıklığını ayarlayan voltaj kapılı potasyum kanalının bir proteinini kodlar. Akciğerde yüksek seviyede eksprese edilir ve hava yolu hipersensitivite reaksiyonlarından sorumludur. İlginç olarak bu genin prefrontal korteksteki parvalbumin içeren nöronlarda az eksprese edilmesi şizofreni ile

ilişkili bulunmuştur. Bu iki kanal proteini geninin de MS patogenizinde rolü olabileceği çalışılmaktadır [45, 46].

İmmünregülasyon ve inflamatuar süreçlerde rol alan sitokin genlerinden olan CC sitokin genleri iki komşu sistein molekülü içeren proteinler üretir. CCL16, lenfositler ve monositler için kemotaktik iken nötrofiller için değildir. Güçlü myelosupresif etkisi vardır ve myeloid progenitor hücrelerin proliferasyonunu baskılar [47]. Ekspresyonu IL-10 ile artar. İritabl bağırsak sendromu gibi otoimmünite durumlarında düzenlenmesi bozulur. CCL19; lenfosit sirkülasyonunun düzenlenmesinde, timustaki T hücrelerinin trafiğinde, B ve T lenfositlerinin sekonder lenfoid organlara migrasyonunda rol oynar. Romatoid artritte kanda hafıza B hücrelerinin azalması ile bağlantılıdır ve hastaların rituksimab tedavisine klinik cevabının tahminini sağladığı bulunmuştur [48].

TGFB1 geni Transforming Growth Factor beta (TGF-β) sitokinini kodlar ve dokularda fibrozise giden süreçlerle alakalıdır. Mutasyonunda kistik fibrozis gibi hastalıklar ortaya çıkar [49]. İleri demiyelinizasyon dönemlerinde, kronik plakların patogenezinde rol alabilir. DGKB geni ikincil mesajcı diacilgliserolün intraselüler konsantrasyonunu düzenleyen diacilgliserol kinazı kodlar. İnsülin direnci ve tip 2 diyabetes mellitus patogenezinde önemlidir [50].

Glisin reseptörünün alfa subunitini kodlayan, mutasyonunda şizofreni ve psikiyatrik hastalıklar tanımlanmış olan GLRA2 (Glycine receptor alfa 2) geni; pürin salvaj yolağında esansiyel bir rolü olan hipoksantin fosforibozil transferaz (HPRT) enzimini kodlayan ve mutasyonunda self mutilasyon ve mental retardasyon ile giden Lesch-Nyhan sendromunun görüldüğü HPRT1 geni; hücre yapısı, sinyal iletimi ve kontraktilitesinde rolü olan aktin proteinini kodlayan ve mutasyonunda serebrofrontofasyal bir sendrom olan Baraitser-Winter Sendromunun görüldüğü ACTB geni de MS'te anormal aktivitesi araştırılan genlerdendir [51-53]. Ayrıca ras protoonkogeni grubundan olan RASAL2 ve SRC ailesi tirozin kinazını kodlayan BLK onkogenleri MS patogenezinde dikkat çekmektedir [54, 55].

Bir mikroarray çalışmasında benign MS olgularının, klasik MS olgularından farklı olarak, periferik kan hücrelerinde inflamatuar ve apoptotik yolakları

etkinleştiren RNA polimeraz I (POL-1) yolağı faktörlerinin ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Bu değişikliğin otoreaktif T lenfositlerinin apoptotik ölümüne yol açarak SSS'de süregiden inflamasyonu azalttığı ve bu şekilde özürlülükteki ilerlemenin gerilediği ileri sürülmüştür [56]. Bu bulgu başka araştırıcılar tarafından doğrulanmadığı gibi benign-klasik MS arasındaki moleküler farklılıkların etnik ve coğrafi faktörlerden etkilenip etkilenmediği de araştırılmamıştır.

Pozitif aile öyküsü MS'e yakalanma riskinde artışa sebep olur. Özellikle monozigotik ikizlerde konkordans %20-30 arasındayken dizigotiklerde bu oran %2-5'e düşmektedir [57].

2.5 MS'İN PATOLOJİSİ

Miyelin olgun oligodentrositler tarafından sentezlenir. Oligodentrositlerin her biri etraflarındaki 20-40 kadar komşu akson ile temas halindedir. Oligodentrosit prekürsörlerinin proliferasyonu, migrasyonu, diferansiyasyonu ve miyelin sentezleyen olgun hücreler haline gelmesi büyüme faktörleri ile düzenlenir. Oligodentrosit çıkıntıları uzar ve komşu aksona temas ettikleri noktadan onu çevrelemeye başlar. Sonrasında akson üzerinde kısmen uzanır ve Ranvier boğumları arasında kalan internodal miyelinize segmentleri oluşturur. Ranvier boğumlarında Na kanalları vardır ve bu bölgelerden elektriksel sıçrayıcı (saltatuar) ileti sağlanır [23]. MSS kompakt miyelini yapısında minör [proteolipit protein (PLP), oligodentrosit spesifik protein (OSP), miyelin oligodentrosit glikoprotein (MOG), miyelin-asosiye glikoprotein (MAG) gibi] ve majör miyelin proteinlerini (MBP gibi) içerir [58].

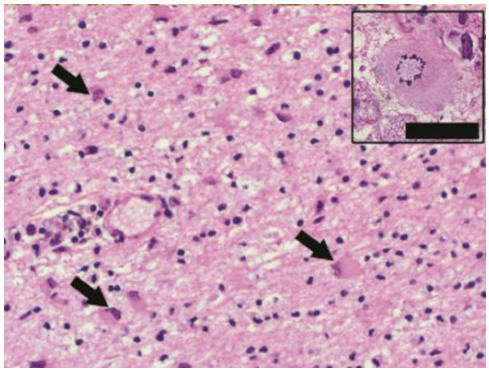
Kronik inflamatuar bir hastalık olan MS genetik yatkınlık olan bir kişide çevresel faktörlerin tetiği çekmesi ile başlar. Ana patolojik bulgusu serebral ve spinal, beyaz ve gri maddedeki demiyelinizasyon gösteren sklerozan plaklardır. Bu plaklarda incelendiğinde erken evrelerde yüksek derecede inflamasyon, demiyelinizasyon – remiyelinizasyon, oligodentrositlerde azalma ve astrositoz; ileri evrelerde ise nöronal ve aksonal dejenerasyon bulguları saptanır [23]. Bunlara sebep olan patogenetik mekanizma hücresel ve humoral, doğal ve edinsel tüm immün sistem elemanlarını içeren kompleks bir mekanizmadır.

2.5.1 Akut Aktif Plaklar

Hipersellüler demiyelinize plaklardır. Proinflamatuar T-helper 1 (Th1) ve T-helper 17 (Th17) hücreleri kan beyin bariyerinin (KBB) yapısını bozar ve otoreaktif lenfositlerin KBB'i geçmesi ile hastalık başlar [59]. MSS'de immünolojik bir reaksiyon gelişir. Regülatuar lenfositlerde bu otoreaktif hücreleri baskılamakta yetersiz kalır. Naif ve CD4+ T hücrelerinin yaşamaları için anahtar bir rolü olan β-arrestin 1 molekülünün aşırı eksprese edilmesi nedeni ile bu otoreaktif hücreler uyarılarak apoptoza da gönderilemez. Tüm regülatuar mekanizmaların başarısızlığa uğraması sonucu inflamasyon başlar ve perivasküler KBB bozulduğu bölgeye CD8+ sitotoksik T hücreleri, daha az miktarda CD4+ helper T hücreleri, B lenfositler ve plazma hücreleri toplanır. MR'da lezyonların kontrast tutması hasarlı KBB'nin göstergesidir. Patoloji spesmenlerinde erken evredeki inflamasyon, demiyelinizasyon ve vasojenik ödem pembe-sarı, yumuşak, sınırları çok belirgin olmayan serebral veya spinal doku şekilde görülür.

Salgılanan proinflamatuar sitokinler immün cevabı başlatır ve bölgede masif makrofaj infiltrasyonu olur. Aktive makrofajlar miyelin komponentlerine tutunur ve bir kompleks meydana getirirler. Bu kompleks mikroglial Fc ligandı ve kompleman reseptörleri tarafından opsonize edilir ve letal TNFα salınımı da başlar [60]. Parçalanmış miyelin komponentleri fagosite edilir. MOG gibi minör miyelin proteinleri makrofajlarda 1-3 gün arasında sindirilebilir. Eğer makrofajlar minör miyelin proteinleri içeriyorlarsa bu erken evre aktif plak demektir. MBP gibi majör proteinlerin sindirimi ise yaklaşık 10 gün alır. Makrofajlar majör protein yapılarını içermekteyse bu geç evre aktif plak demektir. İnaktif plaklar ise miyelin kalıntılarından yoksundur fakat boş veya miyelinin sindirilemeyen nötral lipit komponentlerini barındıran vakuoller içerebilir [61].

Aktif lezyonlarda astrositler prolifere olur, homojenöz özonofilik sitoplazmalı, şişmiş ve birçok fibriller uzantılar çıkarmış hale gelirler ve bu morfolojideki hallerine "gemistosit" adı verilir. Bu reaktif astrositler diğer hücreleri destekleyen bir matriks meydana getirirler. Fragmente nükleer inklüzyonlar içeren mitotik astrositlere Creutzfeld-Peters hücreleri denir. Bunlar da yine erken plakların patolojik özelliğidir **(Resim: 1)** [62].



RESİM 1: Reaktif astrositler (ok işareti) ve Creutzfeld-Peters hücreleri (sağ üstteki kutuda gösterilmiş)

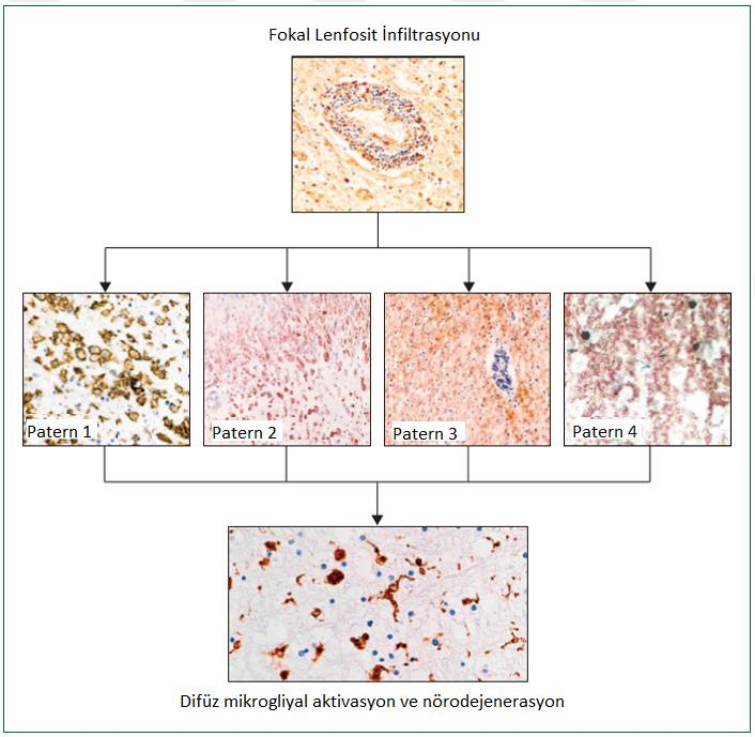
Lezyonlar heterojen patolojiye sahiptir ve kaybedilen miyelin proteini türüne, plak yayılımı ve yerleşimine, oligodentrosit destruksiyonunun olup olmamasına, remiyelinizasyonun varlığına, Ig depolanmasının olmasına ve kompleman aktivasyonuna göre paternlere ayrılırlar **(Resim: 2)** [63].

Patern 1: Santralinde küçük ven ya da venüllerin olduğu, T hücre infiltratları ve tüm miyelin komponentlerine reaktif olan makrofajların oluşturduğu keskin sınırlı lezyonlardır. MS hastalarının biyopsilerinde %15 oranında saptanır. Ig ve kompleman depolanması yoktur. Aktive makrofajların ürettiği toksik ürünler nedeni ile miyelin harabiyeti olduğu düşünülür. Oligodentrositler gözlenir ve remiyelinizasyon vardır.

Patern 2: MS hastalarının biyopsilerinde %58 oranında saptanır. Aktif miyelin yıkım alanlarında oligodentrosit ve miyeline karşı oluşan antikor ve kompleman aracılı immün reaksiyonların olduğu lezyonlardır. Aktif sınırlarda oligodentrosit harabiyeti olmakla birlikte inaktif lezyon merkezinde sağlam oligodentrositler gözlenir ve remiyelinizasyon vardır. BOS'ta Ig saptanması ile karakterizedir. Kompleman aktivasyonunun asıl hedefi bulunamamış olsa da MOG'e karşı olabileceği tahmin edilmektedir. Çünkü bu protein miyelin tabakanın ekstraselüler yüzeyinde yer alır ve hümoral immün yanıtın ona ulaşması kolaydır. Fakat MS hastalarında MOG antikorları bakıldığında sadece küçük bir kısmında pozitif olduğu görülmüştür. Bu antikor daha çok nöromiyelitis optikada (NMO) saptanır.

Patern 3: MS hastalarının biyopsilerinde %26 oranında saptanır. Makrofajla ilişkili demiyelinizasyona ek, selektif olarak MAG kaybı ve oligodentrosit apoptozu izlenen sınırları düzensiz lezyonlardır. Remiyelinizasyon yoktur. Ig ve kompleman depolanması gözlenmez. Oligodentrosit hasarı en distalden başlar ve proksimale doğrudur. Buna "dying back oligodentropati" denir. Akut hipoksik ak madde hasraında veya virus ile indüklenmiş inflamatuar demiyelinizasyonda görülebilir. Mitokondriyal disfonksiyonun ve reaktif oksijen radikallerinin yol açtığı düşünülür.

Patern 4: Plak çevresinde apoptoz dışı oligodentrosit dejenerasyonunun görüldüğü lezyonlardır. %1 kadar biyopsi materyalinde görülür.



RESİM 2: Lezyonların patolojik paternleri

Göreceli olarak aksonal korunma olmasına rağmen akut aktif plaklarda belirli derecede aksonal hasar da olur. Aksonlar şişer, amiloid-β prekürsör protein birikimleri

başlar ve ılımlı aksonal kayıp meydana gelir. Bu RRMS'te ataklar sonrasında zamanla biriken disabiliteden sorumlu tutulan patolojik mekanizmadır [62].

2.5.2 Remiyelinize Plaklar

MSS'de geniş bir oligodentrosit prekürsörü havuzu yer alır. Bu prekürsör hücreler lezyon etrafına göç eder ve çıplak aksonları remiyelinize etmeye başlar [64]. Remiyelinize olan plaklar ise gölge plak olarak adlandırılır. Gölge plaklar genelde patern 1 ve 2 patolojisi gösterir.

2.5.3 Kronik Plaklar

Progresif fazda ise uzun süreli inflamasyon mitokondiyal disfonksiyona ve difüz aksonal ve nörodejenerasyon yol açar. Demiyelinizasyon bölgelerinde aynı zamanda hiperfosforile ve çözünemez tau birikimi de mevcuttur [65]. Lezyonlar çok daha yavaş fakat radyal genişleme eğiliminde olur, merkezi hiposellülerdir. Fokal lezyonların difüz parenkimal mikroglial aktivasyona ilerlemesi ile normal görünümlü ak madde bölgelerinde de inflamasyon bulguları başlar. Kronik inaktif plaklar tamamen demiyelinize, keskin sınırlı, hiposellüler, tamamen akson ve oligodentrosit kaybı gösteren, minör inflamatuar hücre infiltrasyonu içerebilen lezyonlardır. Hastanın yaşına ve hastalık süresine bağlı olarak inflamasyon bulguları azalır. Perivasküler alanlarda lenfoid foliküller oluşur, ileri evrelerde plazma hücreleri birikir ve B/T hücre inflamasyonu sona erse bile bunlar devam eder. Plak kronikleştikçe ödem çözülür. Glial skar dokusu oluşur. Aksonal kayıp %80'lere varır.

Erken ve geç dönemdeki tüm bu süreçlere bakıldığında progresyon ve dejenerasyon patogenezi teorileri şu şekilde özetlenebilir: Sağlam KBB'nin arkasında kompartmanlar halinde inflamatuar prosesler başlar ve zamanla KBB'de bozulma meydana gelir. İnflamasyon ile reaktif oksijen radikallerinin ve serbest radikallerin artışı hasarı artırır ve mitokondriyal disfonksiyon meydana gelir. Hasarlanmayı kompanse edebilecek faktörler yetersiz kalır. Hasarlı bölgelerin onarılması için gerekli

olan artmış enerji ihtiyacını mitokondriler karşılayamaz. Bu durum devam ettikçe de dejenerasyon artar [14]. Hastalığın erken evrelerinde de görülmesine rağmen "beyin atrofisi"nin daha çok bu progresyon ve dejenerasyon fazı ile bağlantılı olduğu düşünülür [66].

Progresyona neden olan patolojik durum biriken aksonal dejenerasyondur ve hastalığın ana disabilite nedenidir. Patogenez 4 temel hipotez üzerine temellendirilmiştir. İlkinde hastalığın temelinde inflamasyon vardır ve diğer süreçler bunu izleyerek ortaya çıkar. İkinci yaklaşıma göre ilk başlayan nörodejenerasyondur ve inflamatuar değişimler buna sekonder olarak ortaya çıkar. Üçüncü yaklaşıma göre inflamasyon da nörodejenerasyon da kliniğe yol açar fakat birbirinden bağımsız süreçlerdir. Son olarak da inflamasyon eşzamanlı bir intrinsik nörodejeneratif duyarlılık yaratır ve bu aksonların kümülatif hasarına yol açar.

2.5.4 Kortikal Plaklar

Demiyelinizasyonun yanında aksonal hasarın da olması MS'in sadece ak maddeyi değil gri maddeyi de tutan bi hastalık olduğunu gösterir. Fonksiyonel MR ile yapılan çalışmalarda MS hastalarında basit emirleri gerçekleştirirken dahi sağlıklı kontrollere göre daha fazla sayıda ve farklı kortikal bölgenin aktivasyona katıldığı ortaya çıkmıştır. MS'in ayrı lezyonlardan oluşan değil tüm beyni kapsayan bir hastalık olduğu açıktır [14]. Kortikal plaklar başlıca 3 farklı şekilde yerleşebilir: 1. Subpial, 2. İntrakortikal, 3. Lökokortikal

Erken evre kortikal lezyonlarda ak maddedekine benzer inflamatuar süreçler mevcuttur. Bunun yanında hem fokal (özellikle topografik olarak lezyonlarla ilişkili bölgelerde) hem de difüz meningeal inflamasyon görülmektedir. En fazla subpial yerleşimli lezyonlar görülürler. Meninkslerde biriken B lenfosit folikülleri intratekal Ig sentezi yaparak humoral immün sistem cevabını oluşturur ve kortikal hasardan da sorumludur [67]. Bunlar aynı zamanda EBV barındıran hücrelerdir [68]. Kortikal lezyonlar kognitif yıkım ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

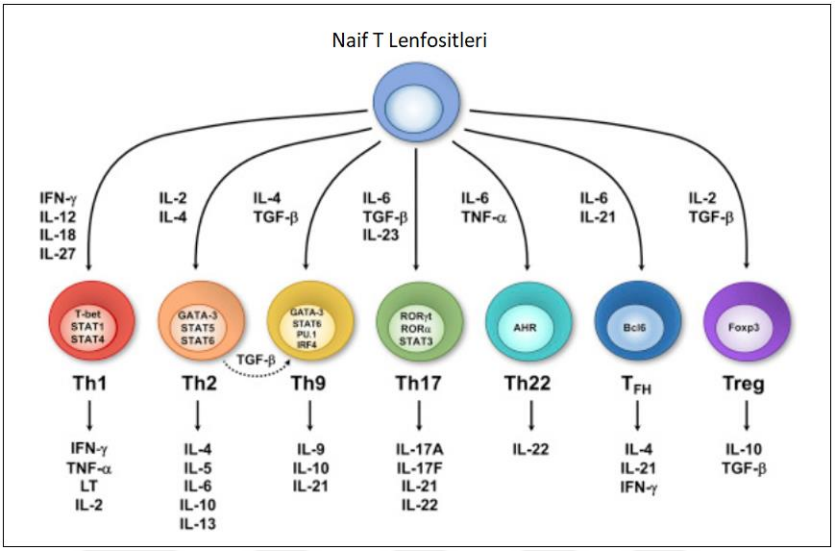
2.6 MS'İN PATOFİZYOLOJİSİ

Parsiyel demiyelinizasyona uğrayan nöronlar impulsları hızlı şekilde taşıyamazlar ve bu halsizlik olmasına neden olur. Depolarizasyon lezyon alanından geçebilir fakat düşük hızdadır ve bu uyandırılmış potasiyellerin süresinin uzamış olması şeklinde laboratuvara yansır. Yine parsiyel demiyelinizasyona uğramış olan aksonlar spontan deşarjlar oluşturabilirler. Bu karıncalanma gibi duysal şikayetlere yol açar. Mekanik duyarlılık artar; optik tutulum olduğunda göz hareketleri ile provake olan ışık çakmaları, servikal lezyon olduğunda boyun fleksiyonu ile ortaya çıkan Lhermitte denen sırta yayılan elektriklenme hissi gibi hareket ile indüklenen bulgular ortaya çıkar. Beyin sapındaki fasyal sinir nöronlarının spontan deşarjları fasyal miyokimiye neden olur. Banyo yapma veya egzersiz sonrası gibi durumlarda nöronlardaki iletim bloğunun artması varolan semptomların daha şiddetli hisedilmesine yol açar. Buna Uthoff fenomeni denir. Komşu demiyelinize aksonlar arasındaki efaptik transmisyon kısa ve rahatsızlık veren paroksismal semptomlara neden olur. İnflamasyon atağı sonlanıp nöronlar yapısal olarak stabil hale geldiğinde ileti bloğu kalkar ve semptomlar düzelir. Beyinsapında lemniskal yol veya servikal medulla spinalis tutulumu ile "oppenheim'ın kullanılmayan el sendromu" denen beceriksiz el sendromu ortaya çıkar.

2.7 MS'İN İMMÜNOLOJİSİ

İlk olarak 1980'lerde T hücreleri MS immünolojisinde araştırılmaya başlanmıştır. T hücre tiplerinden Th1 proinflamatuardır ve p40 ve p35 subünitlerinden oluşan IL-12 ile tetiklenir. IFN -γ salgılar. Th2 hücreleri ise antiinflamatuardır ve IL-4 ile tetiklenir; IL-4, IL-13 ve IL-5 salgılar. Çalışmalarda MS hastalarında MBP reaktif Th1 hücrelerinin bulunduğu ve sağlıklı kontrollere göre yüksek miktarda IFN -γ salgıladığı gösterilmiştir. Bu sırada IL-12 ile aynı p40 subunitini paylaşan IL-23 bulunmuş ve deneysel MS modelinde demiyelinizasyonu ön planda bu sitokinin tetiklediği görülmüştür **(Resim: 3)**. IL-23'ün bulunması T hücrelerinin Th17 alt tipinin keşfedilmesini sağlamıştır. T hücre alt tiplerinin düzenlenmesinden ve otoimmünitenin

baskılanmasından sorumlu olan regülatuar T lenfositlerinin (Treg) düzeyinin ise MS'te ve diğer otoimmün hastalıklarda düşük olduğu saptanmıştır [69].



RESİM 3: Naif T lenfositlerinden T lenfosit alt tiplerinin farklılaşması

MS'te Th17 hücreleri upregüle olur ve hem IL-17 hem de IFN -γ (Th1 ve Th17 artması sonucu) salgıları artar. Atak esnasında en çok artmış seviyede bulunur. Bu hücreler KBB'nin hasarından en çok sorumlu hücrelerdir. Son zamanlardaki çalışmalar bazı hastalarda Th1 baskın patolojinin bazılarında ise Th17 baskın patolojinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu interferon beta (IFN-β) tedavisinden alınacak sonucu da etkiler. Baskın patolojinin Th17'de olduğu hastalarda serumda IL-17 daha yüksektir ve IFN- β cevabı iyi değildir. Baskın olanın Th1 olması durumunda ise IFN- β cevabı daha iyidir [70].

Ayrıca deneysel modelde keşfedilen T hücreleri tarafından salgılanan granülosit – makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-KSF)'ün de MS'te otoimmün nöroinflamasyonda rol oynadığı görülmüştür [71].

Son zamanlarda yapılan MS'e duyarlılık yaratan genlerin araştırıldığı bir çalışmada (genome-wide association studies – GWAS) bu genlerin çoğunun immün

sistem ile alakalı olduğu saptanmıştır. Genler ağırlıklı olarak Th1, Th17, sitotoksik T lenfositleri (Tc) ile ilgilidir ve bunları B hücreleri ve NK hücreleri ile alakalı genler izler [72].

MS ilaçları da genelde T hücrelerinin aktivitesinde değişiklik yapma yoluyla etki ederler. Natalizumab ve Fingolimod ise T hücrelerinin migrasyonu üzerinden etki eden ilaçlardır. Natalizumab; aktive olmuş T hücrelerindeki VLA-4 (Very Late Antigen-4) ile KBB'deki VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)'ın etkileşmesini ve böylece lenfositlerin KBB'i geçmesini bloke eden, α4-integrin antagonisti bir monoklonal antikordur. Ayrıca VLA-4 B hücrelerinin yüzeyinde de bulunur. Fingolimod ise T hücrelerin sekonder lenfoid organlardan migrasyonunu engelleyen sentetik bir sfingozin-1-fosfat inhibitörüdür.

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu MS dahil otoimmün hastalıklar için en radikal tedavi yöntemidir. Tam mekanizma bilinmemekle beraber tüm immün sistem rezervuarının yenilenmesi anlamına gelmektedir.

Ayrıca son yıllardaki çalışmalarda relapsing form da dahil B hücrelerinin ve hatta doğal immün sistemin de MS'te rol oynadığı görülmüştür [73]. Başta MS hastalarının %95'inde pozitif olan ve intratekal Ig sentezini gösteren OKB yapıları B hücrelerinin patogenezdeki varlığını destekleyici bulgulardandır. Parenkim ve meninks bölgelerinde bulunan B hücre klonları bu Ig'lerin yapımından sorumludurlar. Subakut ve kronik plaklardaki perivasküler alanlarda da plazma hücreleri yer alır. Fakat bu antijenlerin asıl hedefi henüz bulunamamıştır. MS ile alakalı olan HLA-DRB1*1501 alelinin OKB pozitif olan alt grup ile korelasyon gösterdiği fakat OKB negatif olan grup ile bağlantılı bulunmadığı görülmüştür [74]. MS hastalarının BOS örneklerinde elde edilen rekombinan antikorların neredeyse tamamı MAG, PLP veya MOG gibi miyelin proteinlerine veya sağlıklı veya kontrol grubu beyin dokusunun herhangi bir komponentine bağlanma göstermemiştir [75].

BOS'ta B hücre sayısı yükselir ve periferik B hücrelerin yüzeyinde de VLA-4 integrini'nin α4 ünitinin ekspresyonu artar. Bu, lenfositlerin KBB'i geçmesi için gerekli olan integrin proteindir. Anormal B hücre aktivitesi sadece hastalığın ortaya çıkışında değil, KİS'in klinik kesin MS'e (KKMS) dönüşünde de etkilidir. BOS'ta

OKB pozitif, kızamık(measles)-rubella-zoster virüslerine karşı antikorları (MRZ reaksiyonu) pozitif ve B hücrelerindeki CXCL13 kemoatraktan proteini yüksek düzeylerde olan KİS hastalarının ikinci demiyelinizan atağı geçirme olasılıkları yüksektir. BOS'ta CXCL13 düzeyleri; KİS, relapsing remitting MS (RRMS), sekonder progresif MS (SPMS) ve primer progresif MS (PPMS) vakalarında BOS lökosit ve B hücre sayısı, intratekal IgG sentezi, MR aktivitesi ve atak hızı ile korele şekilde artmıştır [76]. Ayrıca OKB negatif olan hastalarda progresyon pozitif olanlara göre daha yavaştır. SPMS vakalarında subaraknoid aralıkta B hücre germinal folikülleri benzeri inflamatuar agregatlar gözlenmiş ve şiddetli hastalık seyri, subpial kortikal lezyonlar ve kortikal nöron kaybı ile ilişkili bulunmuştur [67, 77].

Tedavi açısından bakılacak olursa; ilginç olarak B hücre kompartmanına spesifik CD20'ya karşı bir monoklonal antikor olan rituksimab RRMS hastalarına oldukça yüksek etkilidir. Rituksimab pro-B hücre ve plazma hücre aşaması haricinde CD20 pozitif olan tüm B hücre gruplarınada neredeyse tama yakın bir azalma sağlar. Kontrast tutan lezyon sayısını azalttığı da görülmüştür. Aynı etki ikinci kuşak anti-CD20 molekülleri olan okrelizumab ve ofatumumab ile de mümkün olmuştur [73]. Bu tedavinin OKB varlığını veya IgG miktarını etkilemediği görülmüştür. Fakat BOS'taki B hücresi ve T hücresi miktarlarını düşürür (%95 ve %50 oranlarında). Antikor üretmenin yanı sıra B hücrelerinin T hücre cevabını düzenleme görevleri vardır.

Daklizumab, T hücreleri üzerine etkili hümanize monoklonal antikordur. T hücrelerinin başlangıçta aktive olmasını IL-2 etkisini engelleyerek bloke eder. Ayrıca immünregülatör olan $CD56^{bright}$ Natural Killer (NK) hücrelerini de artırır. NK hücreleri intratekal alana geçer ve sitotoksisite yoluyla otoreaktif T hücrelerinin aktivitesini baskılar [78]. Alemtuzumab ise T ve B hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen CD52 proteinini hedef alır.

2.8 KLİNİK SEYİR

MS; motor, duysal, serebellar, vizüel, beyin sapı, kognitif veya otonom bulgularla prezente olabilir **(Tablo: 1).**

TABLO 1: Klinik olarak MS düşündürtecek semptomlar ve bu durumlarda kullanılabilen semptomatik tedavi seçenekleri

	SEMPTOMLAR	BULGULAR	TEDAVİ	
			KANITLANMIŞ	TAHMİNİ
Serebral	Kognitif bozulma Afekt bozuklukları Motor bulgular Duysal bulgular Epilepsi (nadir)	Dikkatte azalma, yürütücü işlevlerde bozulma (erken evrede), demansiyel tablo (geç evrede) Üst motor nöron bulguları Parestezi, dizestezi, allodini (dağınık, tek veya şki ekstremite, genelde anatomik dağılımlı)	Antidepresanlar Antikonvulzanlar	Kognitif rehabilitasyon
Optik Sinir	Unilateral ağrılı görme kaybı, Gözdibi muayenesi normal.	Merkezi skotom, görmede azalma, renkli görmede bozulma, RAPD		
Serebellum	Tremor Denge bozukluğu	Postural ve kinetik tremor Ekstremite inkoordinasyonu ve yürüme ataksisi		Karbamazepin, beta blokerler, klonazepam, talamotomi, talamik stimulasyon
Beyin Sapı	Diplopi, osilopsi Vertigo Yutkunmada bozulma Konuşmada bozulma ve emosyonel labilite Paroksismal semptomlar (Yüzde uyuşma, fasyal miyokimi. Nevraljiform ağrılar..)	Nistagmus, internükleer oftalmopleji Dizartri Psödobulber palsi	Antikolinerjikler Trisiklik antidepresanlar (TSA) Karbamazepin, gabapentin	Baklofen, gabapentin Proklorperazin, sinarizin Konuşma terapisi
Spinal Kord	Kas güçsüzlüğü Atmış tonus ve ağrılı spazmlar Mesane disfonksiyonu Yürüme bozukluğu Erektil disfonksiyon Konstipasyon	Üst motor nöron bulguları Spastisite Nörojen & Hiperaktif mesane, urgency	Tizanidin, baklofen, dantrolen, benzodiazepinler Antikolinerjikler, intermitan self kataterizasyon, suprapubik kataterizasyon Sildenafil	Kannabinoidler Botulinum, IV kortikosteroid Desmopressin, intravezikal botulinum toksini
Diğer	Ağrı Halsizlik Sıcaklık hassasiyeti ve egzersiz intoleransı		Kabamazepin, gabapentin Amantadin	TSA, TENS Modafinil Fluoksetin 4-aminopiridin
TENS: Transcutaneous electrical nerve stimulation, RAPD: rölatif aferent pupil defekti				

Bulgular ortaya çıkan klinik lezyonun lokalizasyonuna bağlı olup MS spesifik değildir. Fakat Lhermitte belirtisi veya Uthoff fenomeni gibi bazıları karakteristik sayılır. Genelde ataklı seyir izler. Atak; son nörolojik bozulmanın düzelme evresi bitip en az 30 günlük nörolojik stabillik sağlanmışken, ateş ve enfeksiyon gibi faktörlerin yokluğunda ortaya çıkıp en az 24 saat süren nörolojik semptomlardır [14].

MS klinik alt grupları ilk olarak 1996 yılında RRMS, PPMS, SPMS ve progresif relapsing MS (PRMS) olarak yapılmıştır [79]: RRMS; akut inflamasyon ve demiyelinizasyon alevlenmeleri ile nörolojik defisitlerin ortaya çıktığı epizodlarla giden, total veya parsiyel düzelme ile sonlanan, aşikar progresyonun olmadığı tiptir. PPMS; başlangıçtan itibaren atak olmaksızın nörolojik fonksiyonların tedrici kötüleştiği, patolojisinde daha az inflamasyon daha çok nörodejenerasyonun görüldüğü tiptir. SPMS; ataklar halinde başlamışken sonradan progresif forma dönen MS tipidir fakat bu dönüşü gösteren net klinik bulgu, görüntüleme, immünoloji veya patoloji bulgusu yoktur. PRMS ise; başlangıçtan itibaren hem atakların olduğu hem de ataklı ve ataksız dönemlerde eş zamanlı progresyonun da devam ettiği tiptir. Tek atak geçirdikten sonra progresif seyir gösteren bir klinik form da tek atak progresif MS (single attack progressive MS – SAPMS) olarak adlandırılmıştır.

Klinik tipler belli aralıklarla toplanan MS komitesi tarafından güncellenmektedir. KİS tanımı ilk kez 2010 yılında ortaya atılmıştır ve sonraki toplantılarda da kriterleri düzenlenmiştir [80, 81]. KİS; inflamatuar demiyelinizan karakterleri karşılayan tek bir klinik prezentasyon olması fakat henüz MS tanı kriterlerini karşılamamasıdır. Fokal veya multifokal olabilir [81].

Diğer bir tanımlama da **radyolojik izole sendromdur (RİS)**. Klinik bir bulgunun yokluğunda başka bir sebeple çekilen görüntülemelerde inflamatuar demiyelinizan karakterde lezyonların saptanmasıdır. Santral ven işareti ve paramanyetik rim lezyon karakterini yorumlamada çok yardımcıdır fakat rutin MR sekanslarında saptanamazlar. RİS, klinik bir kanıt olana kadar MS alt tipi olarak sınıflandırılamaz. RİS kriterlerini dolduran hastaların 1/3'ü 5 yıl içerisinde MS'e dönüşür [82]. Dönüşme olasılığını artıran risk faktörleri; genç yaş, infratentoriyal veya spinal kordda lezyonu olmak, kontrast tutan lezyonun bulunması, MS'i destekleyen BOS bulguları ve serebral lezyon yükünün fazla olmasıdır [81, 83].

Bunun dışında RRMS, SPMS, PPMS tanımları korunmakla beraber klinik sınıflama modifiye edilmiştir ve PRMS tanımı ise çıkartılmıştır. MS temelde 2 kategoriye ayrılmıştır. Relapsing tip ve progresif tip. Bunlar geçmiş ve mevcut hastalık durumu hakkında bilgi verse de devam eden hastalık prosesi hakkında zamansal bilgi sağlamamaktadır. Bunun için hastalık aktivitesinin ve klinik progresyonun değerlendirilmesi ve prognozun ne olacağına, tedavi ajanına, klinik çalışmaya ona göre karar verilmesi gerekir [80].

Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi: Hastalık aktivite düzeyine klinik ve görüntülemelerle karar verilir. Progresif MS için yıllık klinik değerlendirme önerilir. MR uygulamaları için belli bir sıklık kararlaştırılmamış olsa da kraniyal MR'a yıllık olarak bakılır fakat yıllık spinal MR önerilmez. Buna göre RRMS ile takip edilen hastanın MR'ında kontrast tutan bir lezyon saptanması onun "RR-aktif" formda olduğunu gösterir. Klinik nörolojik kötüleşme epizodları olmayan, MR'da kontrast tutan lezyonu olmayan, yeni veya eskiye göre genişleyen lezyonu da olmayan hastalar ise "RR-inaktif" formdadır. RRMS hastalarının 1/3'ü 75 yaşına geldiklerinde halen RRMS şeklinde kalırken 2/3'ü SPMS'e dönüşmektedir. PPMS olan bir hastanın ise atağı söz konusu olduğunda hastalık "PP-aktif" form olarak tiplendirilir. Atak veya MR'da aktivite olmadığında "PP-inaktif" form denir.

Progresyonun Değerlendirilmesi: Relapslardan bağımsız olarak belli bir periyodda SP ve PP kategorisindeki hastalarda progresyon olup olmamasıdır. Progresif hastalar devamlı bir progresyon göstermeden belli bir düzeyde bir süre stabil kalabilirler. Progrese olanlar "PP-aktif" / "PP-progresif" ve "SP-aktif" / "SP-progresif" olarak değerlendirilir. Progrese olmayanlar ise "PP-stabil" veya "SP-stabil"dir. Relapsing tipte olanlarda "progresif" terimi yerine "kötüleşme" kavramı kullanılır. "RR-kötüleşen" ve "RR-stabil" olarak ifade edilir. Aslında "hastalık kötüleşmesi" relapların veya progresyonun sonucu olabilir, "hastalık progresyonu" ise sadece progresif fazın sonucu olarak alınmıştır. Hastalık kötüleşmesi değerlendirilirken klinik disabilite ölçeği olarak 3, 6 veya 12 aylık dilimlerde hesaplanan EDSS skoruna bakılır **(Resim: 4)**.



RESİM 4: MS'in klinik seyirleri

Aktivite ve progresyonu araştırmada kognitif, vizüel ve diğer klinik değerlendirmelere de önem verilmelidir. Ayrıca kontrast tutan veya genişleyen lezyonların yanında total veya lokalize doku kaybı da önemlidir. Kara delik oluşumu, T1 sekansında artan hipointens lezyonlar ve beyin volümü kaybı henüz standardize edilmemiş belirteçlerdir.

Benign ve malign (agresif) MS kavramları ise hastalığın fenotiplerini değil şiddetini belirtir. Uzun bir periyoddan sonra (10 yıl gibi) retrospektif olarak değerlendirilmelidir. Çünkü MS seyri sırasında herhangi bi dönemde aktivite ve progresyon derecesi değişebilen bir hastalıktır. Hastalık başlangıcından 10 yıl sonra EDSS skoru 3 veya 3'ün altı olanlar benign MS olarak sınıflanır. Yine de bu hastaların %50'sinde kognitif etkilenme olması göze çarpmaktadır [84]. Malign MS; tekrarlayan şiddetli atakların olduğu, kısa zamanda artan dizabilite ile karakterize hızlı progrese olan MS hastalarını nitelendiren tanımlamadır. Daha agresif tedavi yaklaşımları ile devam etmek için malign MS ve benign MS hastaları tahmini önemli görülmektedir. Malign MS kriterleri için farklı gruplar tarafından çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve 2013'te 3 alt kriter belirlenmiştir: 1. Başlangıçtan itibaren 5 yıl içerisinde EDSS:6 düzeyine ulaşması 2. Hasta 40 yaşına geldiğinde EDSS:6 düzeyine ulaşması 3. RRMS tanısından 3 yıl sonra progresif faza geçmesi [85]. Diğer bir grup da EDSS:4 düzeyine ulaşmanın zaten çoktan ileri hastalığı gösterdiğini savunmaktadır. Bu grubun geliştirdiği kriterlere göre: 1. Başlangıçtan itibaren 5 yılda EDSS:4 düzeyine gelmek 2. Bir yıllık DMD tedavisine yeteri yanıt alınamaması 3. Bir yıllık DMD tedavisine rağmen a) 2 veya daha fazla dizabilite yaratan ve inkomplet düzelme görülen atak

olması b) 2 veya daha fazla MR görüntülemesinde yeni veya genişleyen T2 lezyon ya da kontrast tutan lezyon görülmesi malign MS demektir [86, 87].

Klinik takip için önerilen bir model de 2015'te ortaya atılmış **Topografik MS Modeli'**dir [88]. Bu modele göre hastalık klinik alt tiplere ayrılmadan 5 faktör üzerinden takip edilir veya çalışmalara dahil edilir:

1. Lezyonların topografik dağılımı, lokalizasyonu, sebep olduğu relapslar
2. Atak sıklığı
3. Atak şiddeti
4. Ataktan iyileşme derecesi
5. Progresyon hızı

Bu yaklaşım hastaların gruplandırılmasını değiştirerek hastalık seyrinin daha bireysel takip edilmesi potansiyeline sahiptir. Atakla giden hastadaki progresyonu veya tam tersi progresif giden hastadaki dönemsel inflamatuar aktivite artışını farketmeye yardımcı olur.

2.9 MS TANISI

MS tanısı; klinik ve kliniğe yardımcı laboratuar yöntemleri ile hastalığın zamanda ve mekanda yayılımının gösterilmesi ve diğer olası alternatif tanıların dışlanması ile konur **(Tablo: 2)**. En önemli basamak ayrıntılı nörolojik öykü ve muayenedir. McDonald Kriterleri 2017'de revize edilmiş ve MS tanısını daha erken, yüksek spesifite ve sensitivite ile konabilir hale getirmiştir [81]. Fakat öncesinde ayırıcı tanı yaparak diğer nedenleri dışlamak gerekir çünkü kriterler MS ayırıcı tanısını yapmaz.

Ayırıcı tanı taraması için hemogram, sedimentasyon, CRP, standart biyokimya, tiroid hormonları bakılmalı vaskülit markerları (ANA, anti-dsDNA, ENA profili), antikardiyolipin ve antifosfolipit antikorları görülmelidir. Hepatit paneli ve anti-HIV antikorları, brucella ve borrelia IgG ve IgM antikorları, VDRL ve TPHA testleri istenmeli sarkoidoz açısından bilgi verebilecek serum ACE düzeyi, serum ve 24 saatlik idrarda kalsiyum değerleri ölçülmeli ve PA akciğer grafisi uygulanmalıdır. Gerekirse tüberküloz araştırılması da yapılabilir. Hastanın B12 ve 25-OH D vitamini düzeyi de

önemlidir. Lomber ponksiyon ile elde edilen BOS'ta IgG indeksi yüksekliği ve OKB tiplendirmesi MS tanısını destekleyecektir. Gerekirse BOS sitolojik ve serolojik incelemesi de eklenebilir. Nörofizyolojik testlerden uyandırılmış potansiyeller de yardımcı yöntemlerdir.

TABLO 2: MS ayırıcı tanısında düşünülmesi gereken hastalıklar

NEOPLAZİLER	Paraneoplastik serebellar sendrom, paraneoplastik miyelopati, santral sinir sistemi lenfoması, intravasküler lenfoma
İMMÜN ARACILI HASTALIKLAR	Sarkoidoz, Sistemik Lupus, Vaskülitler, Sjögren Sendromu, Behçet Hastalığı, Susac Sendromu, Sneddon Sendromu
ENFEKSİYONLAR	Lyme, Whipple, Nörosifiliz, Kronik menenjit (tüberküloz, fungal vb)
İSKEMİK HASTALIKLAR	Kardiyoembolik inme, antifosfolipit antikor sendromu, amiloid anjiyopati, venooklusif hastalıklar
SPİNAL KORD HASTALIKLARI	Siringomiyeli, intrameduller kord tümörü, spondilitik miyelopati, kavernöz malformasyonlar, venöz fistüller, arteriovenöz malformasyonlar
HEREDİTER HASTALIKLAR	Herediter spastik paraparezi, adrenolökodistrofi, metakromatik lökodistrofi, depo hastalıkları, CADASIL, mitokondiyal hastalıklar
MALABSORPSİYONLAR	Vitamin B12 eksikliği, Çölyak hastalığı, Hipokupremik miyelopatiler
NON-MS İDİYOPATİK İNFLAMATUAR DEMİYELİNİZAN HASTALIKLAR	Akut Dissemine Ensefalomiyelit (ADEM), Nöromiyelitis Optika (NMO) (anti-Aqp4, anti-MOG) , NMO-Spektrum Hastalıkları (NMOSH)

McDonald 2017 kriterleri yalnızca MSS demiyelinizan hastalığı düşündüren KİS olgularında kullanılmalıdır. Veya KİS ile başvuran olguda 2. atak olması tanı koydurucudur.

Mekanda yayılım (Dissemination in Space – DIS): Tanı kriterlerinden ilki MR'da lezyonların mekanda yayılımının gösterilmesidir. Bunun için tanımlanan

lokalizasyonlar periventriküler, kortikal veya jukstakortikal, infratentoriyal ve spinal alanlardır [89]. Mekanda yayılımın olduğunu söylemek için bu 4 bölgeden en az 2'sinde en az 1'er T2 sekansında hiperintens olan lezyonun gösterilmiş olması gerekir. Semptomatik beyinsapı veya spinal kord sendromuna yol açan lezyonlar da lezyon sayısı hesaplanırken hesaba katılmaya başlanmıştır [81]. Optik sinire ait MR, optikal koherens tomografi (optical coherence tomography – OCT) ve uyandırılmış potansiyeller ile tutulum gösterilmesinin de mekanda yayılıma 5. Alan olarak eklenmesi teklif edilmiş fakat çalışmalarda yeterli duyarlılık ve özgüllükte bulunmadığından 2017 McDonald kriterlerinde kabul edilmemiştir.

Zamanda yayılım (Dissemination in Time - DIT): Bazal MR'dan ne kadar sonra olursa olsun, sonraki MR'da yeni T2 veya kontrast tutan lezyonların saptanması zamanda yayılımı gösterir denmiştir. Ayrıca tipik KİS hastalarında tek bir MR görüntülemesinde eş zamanlı kontrast tutan ve tutmayan asemptomatik lezyonların zamanda yayılımı gösterdiğine karar verilmiştir. Fakat MR'da görülen kontrast tutan lezyonun MS dışında bir patolojiye ait olmadığından emin olmak gerekir. 2017 McDonald kriterlerinde BOS'ta tip 2 OKB pozitifliği zamanda yayılım eşdeğeri olarak kabul edilmiştir.

Bu DIS ve DIT kriterleri ile KİS ile başvuran bir hastada tek MR ile MS tanısı yüksek sensitivite ve spesivite ile daha erken dönemde koyulabilir hale gelmiştir. Uyandırılmış potansiyaller, OCT ve BOS IgG indexi destekleyici bulgulardır. 2017 McDonald kriterlerine göre MS tanısı koyulabilirliği tabloda görülmektedir **(Tablo: 3)** [81]:

TABLO 3: 2017 McDonald kriterlerinde belirlenen gerekli maddeler

KLİNİK ATAK SAYISI	LEZYON SAYISI	EK GEREKLİLİKLER
≥2	≥2	-
≥2	1 (farklı anatomik lokalizasyonda objektif kanıtlı atak öyküsü)	-
≥2	1	MR bulgusu veya farklı bir klinik atak ile DIS kanıtlanması
1	≥2	MR bulgusu veya farklı bir klinik atak ile DIT kanıtlanması *veya* BOS tip 2 OKB pozitifliği
1	1	MR bulgusu veya farklı bir klinik atak ile DIS kanıtlanması ve MR bulgusu veya farklı bir klinik atak ile DIT kanıtlanması / BOS tip 2 OKB pozitifliği

Primer Progresif MS Tanı Kriterleri: PPMS tanısı 2017 McDonald kriterlerine göre 1 yıllık progresyonun yanında aşağıdaki 3 kriterden 2'sini sağlaması durumunda konur:

1. Kraniyal MR'da MS için karakteristik bölgelerde (periventriküler, kortikal veya jukstakortikal ve infratentoriyal) 1 veya daha fazla T2 lezyonu
2. Spinal MR'da 2 veya daha fazla T2 lezyonu
3. BOS'ta OKB pozitifliği

2.10 MS'İN PROGNOZU

MS'te dizabilite zaman içerisinde geçirilen ataklardan kalan rezidüel semptomlar dolayısıyla veya ataklardan bağımsız olarak hastalık progresyonu dolayısıyla olabilir. Dizabilitenin sebebi görülebilen ve ölçülebilen nörolojik disfonksiyonlar olabileceği gibi daha çok halsizlik, ağrı, depresyon, anksiyete ve kognitif disfonksiyon gibi kolayca farkedilmeyen "sessiz semptomlar"dır. Klinik çalışmalarda dizabilite ölçeği EDSS'dir ve 7 fonksiyonel alanı değerlendirir: görsel, piramidal, duysal, serebellar, kognitif fonksiyonlar, beyinsapı ve mesane & bağırsak fonksiyonları. Bunlara bir de hastanın ambulasyonu eklenir.

Bir diğer değerlendirme ölçeği de Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)'dir. PASAT (Paced Auditory Serial Addition Test), 25 adım yürüme testi ve 9 delikli tahta testini içerir. Alt ve üst ekstremite fonksiyonları ve kognitif fonksiyonlar değerlendirilmiş olur. Bazı merkezlerde PASAT yerine Symbol Digit Modalities Test (SDMT) uygulanır. Multiple Sclerosis Impact Scale (MSIS-29) ise MS'in hasta üzerindeki fiziksel ve psikolojik etkilerini vücut işlev ve yapılarındaki bozukluklarıve özrü ölçen bir testtir. Hastalık sırasında prognozun iyi olacağına işaret eden faktürler kadın cinsiyet, erken yağta başlangıç, optik nörit veya duysal semptomlar ile monosemptomatik başlangıç, ilk atak ile ikinci atak arasındaki sürenin uzun olması, ilk atağın sekelsiz ve çanbuk düzelmesi, EDSS:3 düzeyine ulaşmak içi geçen sürenin uzunluğu, RRMS tipinde devam etmesi ve atakların seyrek olması, düşük sosyoekonomik düzeydir.

Erkek cinsiyet ve 40 yaşından sonra başlangıç görülen vakalar daha ağır seyreder. Başlangıçta piramidal, serebellar, spinal veya sfinkter bozukluk bulgularının (özellikle de multifokalse), kognitif etkilenmenin olması da kötü prognostik faktörlerdir. Erken dönemde özellikle de ilk 2 yılda sık atak, ilk 2 atak arasındaki sürenin kısa olması, ilk atağın sekelli ve uzun sürede toparlaması agresif seyrin göstergeleridir. Atakların şiddetli geçmesi (EDSS'de en az 1 derece yükselme yapmaları, steroid tedavisi gerektirmeleri, hastaneye internasyon gerektirmeleri), ilk 5 yılda orta derece özürlülüğe (EDSS:3) ulaşılması ve progresif seyir kötü prognoza işaret eder. Kötü prognoz gösteren MR bulguları ise: başlangıçta 2'den fazla kontrast

tutan lezyonun veya T1 sekansında kara deliklerin veya atrofinin olması, infratentoriyal lezyonların supratentoriyallerden daha fazla olması, kontrol MR'larında yeni ve kontrast tutan lezyonların saptanmasıdır [86].

2.11 MS'TE UYKU BOZUKLUKLARI

Primer uyku bozuklukları MS olgularında genel populasyonun üzerinde bir sıklıkta ortaya çıkar ve fatigue semptomu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [90, 91]. Fatigue bulgusu yaklaşık olarak MS olgularının %90 kadarında ortaya çıkar, semptomlar aralıklı veya süreğen olabilir, ısı ile kötüleşir ve günün ilerleyen saatlerinde artış gösterir. Fatigue bulgusunun depresyon, ataklar sırasında ekspresyonu artan inflamatuar sitokinler, ağrı ve ısıya maruz kalma ile ilişkili olduğu bilinmektedir [91, 92]. Son yıllarda, hastaların yakınmadığı subklinik uyku bozukluklarının da hem fatigue bulgularını hem de genel olarak MS'li olguların klinik seyrini ve hayat kalitesini etkileyebileceği gösterilmiştir [93].

Uyku bozuklukları arasında MS olgularında en çok uyku apnesi, huzursuz bacaklar sendromu ve insomnia görülmektedir. MS'de %50 kadar sıklıkla gözlenen uyku apne sendromu fatigue varlığı ile de kuvvetli korelasyon göstermektedir [93]. Genel toplumun %4-5 kadarında gözlenen huzursuz bacaklar sendromu MS olgularının %15'inden fazlasında saptanmaktadır [94]. Hafif, orta veya ağır şiddette insomnianın ise MS olgularında %42-58 sıklıkla ortaya çıktığı bilinmektedir [92]. Uyku bozukluklarının MS'in klinik seyrine olan etkisi gösterilmiş ve uyku bozukluğu ile özürlülük skorları arasında anlamlı korelasyon olduğu saptanmıştır.

Uyku bozuklukları ile inflamasyon arasında karşılıklı bir etkileşim bulunmaktadır. Bakteri duvarı proteinlerine karşı gelişen inflamatuar yanıtın uyku bozukluğu yaptığını gösteren ilk çalışmaları [95], adenozin, prostaglandin ve IL-1 gibi inflamasyon mediatörlerinin uyku bozukluğunda ekspresyonlarının değiştiğini gösteren çalışmalar izlemiştir [96-98]. Günümüzde sitokinlerin ve reseptörlerinin beyinde eksprese edildiği ve çeşitli kognitif ve davranışsal işlevlerde rol oynadıkları bilinmektedir. IL-1 ve TNF gibi proinflamatuar sitokinler hipersomniaya yol açarken, IL-4, IL-10, IL-13 ve IL-1 reseptör antagonisti gibi antiinflamatuar sitokinler insomniaya sebep olmaktadır [99-100]. Ayrıca çeşitli sistemik viral, fungal, bakteriyel

ve paraziter hastalıkların seyri sırasında sitokin üretimindeki değişikliklere paralel olarak uyku düzeninin değiştiği bilinmektedir [101, 102]. Uyku kısıtlanmasının proinflamatuar sitokinlerin üretimini, inflamasyon sinyal yolaklarının etkinliğini ve doğal bağışıklık yanıtlarını arttırarak inflamasyon ve otoimmüniteye yol açabileceği gösterilmiştir [103]. Bu bulgular ışığında, MS olgularında artmış sıklıkta gözlenen uyku bozukluklarının, inflamatuar yanıtı arttırarak hastalığın gidişini kötü yönde etkileyebileceği ve özürlülüğü ilerletebileceği düşünülebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

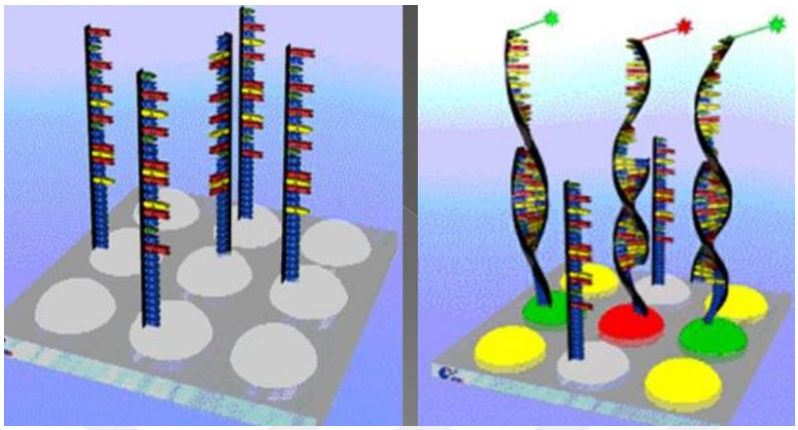
Proje kapsamında Haydarpaşa Numune Hastanesi Nöroloji Kliniği MS Birimi'nde takip edilen, gönüllü olmayı kabul etmiş, 15 benign RRMS (10 yıldan uzun hastalık süresi ve EDSS < 3.0 olan RRMS olguları) ve benzer izlem süresi, yaş ve cinsiyet parametreleri olan 16 benign olmayan RRMS (10 yıldan uzun hastalık süresi ve EDSS ≥ 3.0 olan RRMS olguları) olgusunun periferik kan mononükleer hücreleri ile mikroarray ve bioinformatik çalışmaları yapılmıştır. Ekspresyonu en fazla değişen (azalan veya artan) genlerin RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) ile konfirmasyonu, mikroarray çalışması yapılan 31 (15 benign + 16 benign olmayan) RRMS olgusu ve 38 sağlıklı MS hastası olmayan kontrol grubunda yapılacaktır.

Tüm RRMS olguları 2010 McDonald Kriterleri'ni doldurmakta ve klinik bilgileri MS veri tabanında kaydedilmektedir. Olguların yaş aralığı 18-60 arasındadır ve hem kadın hem de erkek olguların kan örnekleri kullanılmıştır. RRMS atağı sırasında veya son ataktan en az 2 ay sonraya kadar kan örneği alınmamıştır. Örnekler toplandıkları gün içinde RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri -80 ^{o}C de saklanmıştır. Primer progresif seyirli MS olguları çalışmaya alınmamıştır. Tüm hastalara çalışma koşulları anlatılmış ve olurları alınmıştır.

3.1 MİKROARRAY YÖNTEMİ NEDİR

Mikroarray, "çip" olarak adlandırılan cam, plastik veya silikon gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA

spotlarıdır [104]. Bir mikroarrayde bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yüzeye tutturulan DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanmıştır **(Resim: 5)**.

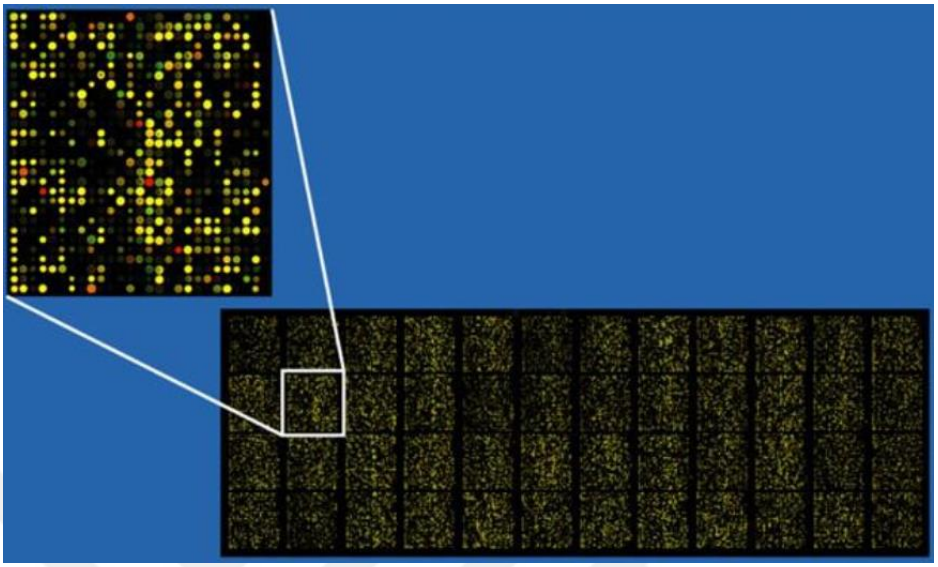


RESİM 5: Cam yüzeye tutturulan DNA yapıları temsili

Her bir spot tek bir geni temsil eder. Bu sayede kısa sürede ve yüksek hassasiyette çip üzerine işlenmiş tüm probların floresan ışıma değerlerine göre çalışılan numuneye ait yapısal detaylar araştırılabilmektedir. Genomik mikroarrayler bireylerde ve populasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan özel bir çeşit DNA mikroarray tipidir **(Resim: 6)**. Genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen nükleotid polimorfizmlerini kullanılabilmektedir. Genel olarak genotip belirleme olarak adlandırılan bu tip mikroarray uygulamaları adli tıp çalışmalarında, hastalıklara genetik yatkınlığın hızlı bir şekilde bulunması çalışmalarında ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilmektedir.

Patofizyolojisinde birden çok molekülün etkileşim içerisinde olduğu hastalıklarda tüm genom ölçekli mikroarray çalışmalarının hastalığın altında yatan moleküler yolların belirlenmesinde oldukça önemli katkılar yapabildiği bilinmektedir. Bu amaçla kurgulanan array analizleri sonucunda genomda yer alan genlerin tamamına yakının gen ekspresyon paterni belirlenebilmekte, birbirleri ile sinerjik ya da antagonist etkileşimler içerisinde olan gen grupları ortaya konabilmektedir. Bu sayede MS gibi hastalıklarda daha tanımlanma olanağı bulamamış yeni moleküler yolakların ve gen-gen etkileşimlerinin belirlenebilmesi mümkün hale gelebilmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarından elde edilen moleküler yolaklara dayalı yeni tedavi

olanakları ve klinik tanı yaklaşımları mümkün olabilmekte, hastalığa dönük tanı ve tadavi yaklaşımları değişebilmektedir.



RESİM 6: DNA mikroarray görünümü örneği

3.2 PROJENİN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI

3.2.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilimdalı'nda (DETAE) yapılmıştır. Hücrelerden total RNA izole edilmiş, RNeasy kiti ve RNA ürünleri DNAase ile muamele edilerek olası DNA kontaminasyonu engellenmiştir. RNA ürünlerinin kalitesi ve doğruluğu Agilent 2100 Bioanalyzer çipleriyle, Nanodrop ND 1000 Spektrofotometre cihazı ile kantite açısından hibridizasyon öncesi kontrol edilmiştir.

3.2.2 Mikroarray Hibridizasyon Ve Analizi

Kullanılan mikroarrayler tüm insan genomunu içeren, 30.000 genin haritalandığı silikon bazlı hibridlemeye olanak sağlayan cam yüzeylerdir. Çalışmamızda; Mikroarray analiziyle (Sureprint G3 Human Gene Expression V3)

Benign-MS (BMS) ve benign olmayan MS olgularının periferik kan mononükleer hücrelerinde 26083 genin expresyon düzeyleri karşılaştırılmışır.

İzole edilen RNA amplifiye edilmiş, floresanla işaretlenmiş ve üretici protokolüne uygun olarak cRNA sentezlenmiştir. İşaretlenmiş cRNA ve örnekler, 65˚C'de bir gece boyunca Agilent Human 4 X 44K Oligo Mikroarrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)'de melezleştirilmiştir. Her bir örnek en az 2 kere çalışılmıştır. Array'ler, Agilent Microarray tarayıcısı kullanılarak taranmıştır. Görüntü yoğunluğu verileri kaydedilip ve metin dosyaları içine transfer edilmiştir (Feature Extraction Software, version A.8,0; Agilent). Veriler, Agilent Feature Extraction Software 8.0'den toplanıp analiz için GeneSpring Software'a girilmiştir. ANOVA istatistiksel analiz programında, p-değerleri ‹0.01 ve sinyal/arka plan kirliliği oranı ›2 kullanılarak veri setleri filtrelenerek ve hasta örneklerinin normale göre kaç kat değiştiği analiz edilmiştir.

Gen artış sayıları, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software (Ingeunity Systems, Redwood City, CA) yorum programına girilip bu program kullanılarak gen ürünleri, lokasyon ve moleküler fonksiyonlarına göre kategorize edilmiştir. Her gen sembolü, Ingenuity Pathways Knowledge Base'deki uygun gen yerine haritalandırılmıştır. Bu genlerin ağları, algoritmik olarak bağlantılarına göre oluşturulmuştur. Sonuç, sayısal bir değerdir ve ağlarla var olan veri setindeki genler arasındaki yakınlığı derecelendirir. Bu değer, ağın önemi ya da kalitesi ile ilgili bir belirteç değildir. Ağı, merkez genlerinin orijinal listesine yakın bir hale getirmek için ağdaki merkez genlerin sayısı ve ağın boyutu hesaplanmıştır. Tanımlanan ağ, gen/gen ürünleri arasındaki ilişkiyi belirten bir grafik olarak ortaya çıkarılmıştır. Genler, düğümler ile iki gen arasındaki biyolojik ilişki çizgi ile belirtilir. Düğüm renginin yoğunluğu, anlatım artış/azalışının derecesini belirler. Düğüm şekilleri; enzimleri, fosfatazları, kinazları, peptidazları, G-protein reseptörü, transmembran reseptörü, sitokinleri, büyüme faktörü, iyon kanalı, taşıyıcıları, translasyon faktörü, nüklear reseptör, transkripsiyon faktör ve diğer belirtir. Standart altyol analizleri, veri seti girişinde önemli olan yolları IPA standart altyol kütüphanesinden tespit edilmiştir.

Veri seti ve standart altyol arasındaki ilişkinin önemi iki parametreye dayanarak tespit edilmiştir:

1) Veri setinde yer alan genlerin sayısının standart altyoldaki toplam gen sayısına oranı,

2) Fischer'in kesin olasılık testi kullanılarak hesaplanan p değeri

Bu p değeri, veri setindeki genlerin birlikteliğinin ve standart alt yolun tek başına var olma şansının olasılığını göstermektedir.

- **Q-RT PCR (Kantitatif RT-PCR) tepkimesiyle rölatif gen anlatımının validasyonu:**

Ekspresyonu en fazla değişen (azalan veya artan) genlerin RT-PCR) ile konfirmasyonu yapılmıştır.

3.3 NÖROPSİKOLOJİK DEĞERLENDİRME

BMS ve non-BMS katılımcılar Rao'nun Kısa Tekrarlanabilir Nöropsikolojik Test Bataryası (Rao's Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests / BRB-N) ile değerlendirilmişlerdir. Bu batarya MS'e özgü bozulmaları gösteren sözel bellek testleri, görsel mekânsal bellek testleri, dikkati sürdürme ve bilgiyi işleme hızı değerlendirmesi (PASAT-3), SDMT, verbal akıcılık ve kategori ayrımı değerlendirmesi (Controlled Word Association Test / COWAT) subtestlerini içerir [105]. Ayrıca hastalara Stroop Renkli Kelimeler Testi yürütücü işlevleri değerlendirmek amacıyla eklenmiştir. Hasta duygudurumunu değerlendirmek amacı ile Beck Depresyon Ölçeği (BDE) ve motor fonksiyonları değerlendirmek için de 9 Delikli Test ve 25 Adım Testi uygulanmıştır.

3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tanımlayıcı analizler için kategorik veriler frekans (n) ve yüzde (%), sürekli veriler ise ortalama ve standart sapma ile ifade edilmiştir. Kategorik değişkenlerin analizinde Fischer'in kesin olasılık testi ve t testi kullanılmıştır. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı şeklinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 OLGULARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Araştırma kapsamına 15 BMS hastası, 16 non-BMS hastası ve 38 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Her grubun ortalama yaşı, hastaların hastalık başlangıç yaşları ve hastalık süreleri birbirine yakın seçilmiştir **(Tablo: 4)**. Araştırma gruplarında katılımcılar arasında, sağlıklı kontrol grubu haricinde, belli bir cinsiyet dağılımı farkı bulunmamaktadır. BMS hastaları 10 yıl boyunca izlenmiş ve bu süre boyunca EDSS skoru <3 kalmış hastalardır. Non-BMS hastaları ise yine 10 yılın üzerinde takip süreleri olan EDSS skoru >3 olan hastalardır. Araştırmanın iki hasta grubunu EDSS'ye göre ayrılmış bu gruplar oluşturmaktadır. Her iki hasta grubunun da ortalama atak sayısı klinik takip verilerine bakıldığında benzer bulunmuştur.

TABLO 4: Araştırmada yer alan hastalara ait sayısal veriler

	BMS (n=15)	Non-BMS (n=16)	SK (n=38)	p Değeri
CİNSİYET (K/E)	9/6	9/7	28/10	0.334*
YAŞ (yıl, SS)	37.0 ± 7.6	39.3 ± 9.0	36.0 ± 10.2	0.355**
HASTALIK BAŞLANGIÇ YAŞI (yıl, SS)	23.7 ± 6.9	27.4 ± 9.0	-	0.147***
HASTALIK SÜRESİ (yıl, SS)	13.2 ± 4.2	14.8 ± 5.7	-	0.327***
EDSS (ortalama, SS)	2.2 ± 0.5	4.2 ± 0.8	-	<0.001†
ATAK SAYISI (ortalama ,SS)	7.7 ± 3.8	7.5 ± 4.3	-	0.889***

(BMS: Benign multipl skleroz, non-BMS: Benign olmayan multipl skleroz, SK: Sağlıklı kontrol, SS: standart sapma, K: Kadın, E: Erkek) (*,**: Her 3 grup arasında da anlamlı fark yoktur. ***: Her iki hasta grubu arasında anlamlı fark yoktur. †: Her iki grup arasında anlamlı farklılık vardır ve gruplar kategorilere bu özelliğin değeri neticesinde ayrılmıştır.)

4.2 NÖROPSİKOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Hastalar BRB-N ve ek olarak motor fonkiyonlar için 9 delikli test ve 25 adım testi ile değerlendirilmişlerdir.

TABLO 5: Hastaların nöropsikolojik batarya test sonucu ortalamaları

	Benign MS (n=15)	**Non-BMS (n=16)**	**p değeri**
Sözel bellek	7.8±1.8	7.1±1.4	0.145
Görsel mekansal bellek	4.3±1.8	4.4±1.7	0.879
PASAT	38.7±12.9	34.1±12.2	0.317
SDMT	37.4±14.8	25.4±12.5	***0.022***
COWAT	55.0±22.7	43.3±18.5	0.109
Stroop testi	56.2±33.8	58.4±26.7	0.846
9 delik testi	21.1±2.6	32.8±7.6	***0.001***
25 adım testi	6.8±1.1	13.7±6.7	***0.002***
BDE	12.3±7.9	17.8±9.8	0.093

BMS ve non-BMS gruplarının karşılaştırmasında motor fonksiyonların değerlendirildiği 9 delikli test ve 25 adım testinde; BRB-N bataryasındaki SDMT skorunda non-BMS grubunda anlamlı bozulma görülmektedir **(Tablo: 5)**. Her iki grup arasında sözel bellek, görsel mekânsal bellek, PASAT, COWAT, stroop ve BDE skorlarında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Sağlıklı kontrol ve BMS grupları arasında özellikle somatik fonksiyon değerlendirmesi için olan 25 adım testinde anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun yanında iki grubunun BRB-N test sonuçlarının karşılaştırılmasında, motor fonksiyonlar bakımından oldukça iyi durumda olan BMS grubunda saptanan kognitif bozukluk dikkat çekicidir **(Tablo: 6)**. Etkilenme hafıza, dikkat ve frontal yürütücü işlev merkezlerinin tümünü kapsamaktadır. Yürücütücü işlevlerdeki bozukluğun, işleme

hızındaki yavaşlamanın ve dikkat eksikliğinin kortikal ve subkortikal traktlardaki etkilenime bağlı olduğu düşünülür.

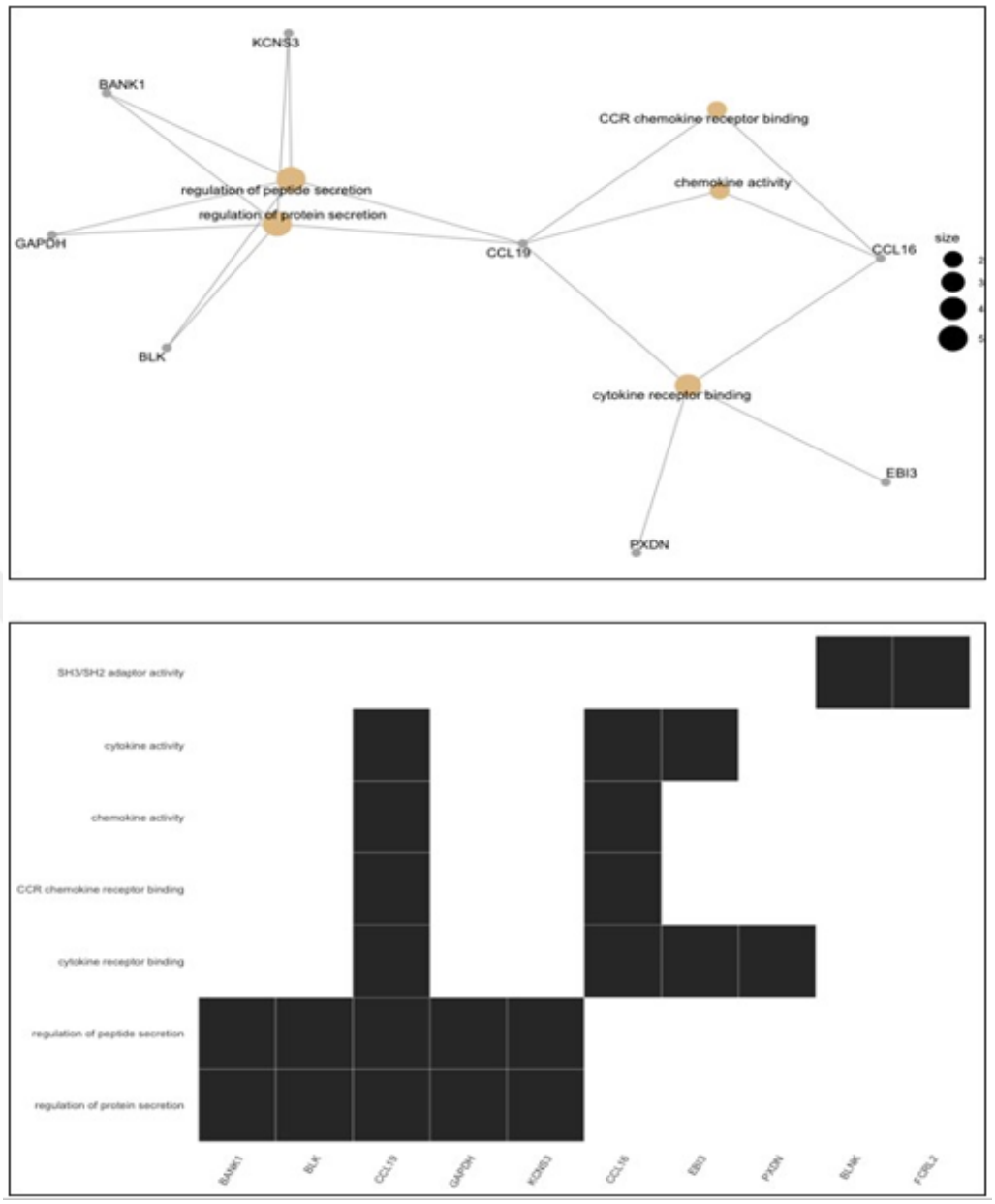
TABLO 6: BMS ve SK gruplarının BRB-N skorları karşılaştırması

	Benign MS (n=15)	SK (n=38)	p değeri
Sözel bellek	7.8 ±1.8	9.2±1.3	**0.0027**
Görsel mekansal bellek	4.3±1.8	6.2±1.4	**0.0001**
PASAT	38.7±12.9	48.7±7.7	**0.0010**
SDMT	37.4±14.8	51.0±12.1	**0.0011**
COWAT	55.0±22.7	75.6±17.5	**0.0009**
Stroop testi	56.2±33.8	36.8±14.7	**0.0050**
9 delik testi	21.1±2.6	18.6±2.1	**0.0006**
25 adım testi	6.8±1.1	6.1±1.5	0.1076

4.3 MİKROARRAY GEN EKSPRESYONU SONUÇLARI

Çalışmada mikroarray analiziyle BMS ve non-BMS olgularının periferik kan mononükleer hücrelerinde 26083 genin expresyon düzeyleri karşılaştırılmışır.

BMS olgularında anlamlı derecede ekspresyon düzeyi değişikliği gösteren 28 gen biyoinformatik analizle biyolojik işlevlerine göre sınıflara ayrıldı. Bu analiz sonucunda en fazla ekspresyon değişikliği gösteren gen grubunun sadece B lenfosit işlevleri ile ilişkili genler olduğu belirlendi **(Resim 7a ve 7b)**. Bunlardan en yüksek düzeyde değişiklik gösteren BANK1 ve BLK genleri ileri validasyon çalışmaları için seçildi. Ek olarak en yüksek düzeyde ekspresyon değişikliği gösteren diğer genler arasından hem B hem de T hücrelerinde işlevleri olduğu bilinen SWAP70, TGFB1 ve ATP1B3 genleri de değerlendirmeye alındı.

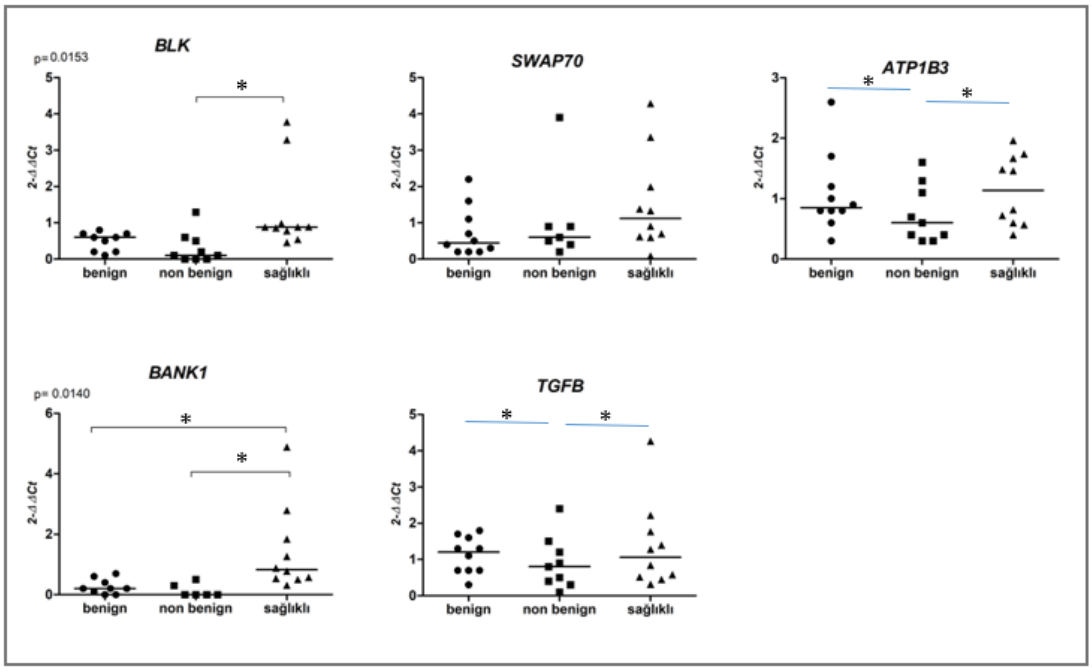


RESİM 7a-7b: Farklı biyoinformatik analiz yöntemleri ile BMS olgularında anlamlı ekspresyon değişikliği gösterip sadece B lenfosit işlevleri ile ilişkili olduğu saptanan genler.

4.4 RT-PCR EKSPRESYON DÜZEYİ SONUÇLARI

Mikroarray ve biyoinformatik analiz çalışmaları ile validasyon amacıyla ileri değerlendirmeye seçilen 5 genin periferik kan mononükleer hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlendi. İncelemesi yapılan BLK, BANK1 ve SWAP70 genlerinin ekspresyon düzeylerinin BMS ve non-BMS olguları arasında

anlamlı derecede farklılık göstermediği belirlendi. Bununla birlikte sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında BLK ekspresyon düzeyinin non-BMS olgularında, BANK1 ekspresyon düzeylerinin ise hem BMS hem de non-BMS olgularında anlamlı derecede baskılandığı saptandı. ATP1B3 ve TGFB gen düzeyleri non-BMS olgularında BMS ve sağlıklı kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük saptandı. Sağlıklı olgularla BMS olguları arasında bu genlerin ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı farklılık yoktu **(Resim 8).**



RESİM 8: BMS, non-BMS ve sağlıklı kontrol olgularında RT-PCR yöntemi ile belirlenen periferik kan mononükleer hücre gen ekspresyon düzeyleri. Anlamlı farklılıklar ($p<0.05$) üst çizgi ile işaretlenmiştir.

Son olarak ileri incelemeye alınan 5 B lenfosit geninin RT-PCR ile belirlenen ekspresyon düzeyleri ile MS olgularının klinik verileri **(Tablo: 4)** ve nöropsikolojik batarya test skorları **(Tablo: 5 ve 6)** arasında korelasyon olup olmadığı analiz edildi. Bu çalışma sonucunda TGFB ekspresyon düzeyi ile progresyon indeksi (son EDSS/yıl cinsinden hastalık süresi) ($p = 0.034$; $R = -0.531$), SWAP70 ekspresyon düzeyi ile 25-adım test skorları ($p = 0.002$; $R = 0.730$), BANK1 ekspresyon düzeyi ile 25-adım test skorları ($p = 0.007$; $R = 0.646$) ve EDSS skorları ($p = 0.020$; $R = 0.576$) arasında

istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptandı. İncelenen gen ekspresyon düzeyleri ile kognitif test skorları arasında korelasyon saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Multipl skleroz MSS'nin en sık rastlanan inflamatuar demiyelinizan hastalığıdır. Genellikle 30-50 yaşları arasında ortaya çıkan MS'in kesin etyolojisi bilinmemekle beraber, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde çevresel tetikleyicilerin etkisiyle beyin ve omurilik ak madde bölgesinde ortaya çıkan otoimmün kökenli inflamatuar bir yanıt sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Etkilenen SSS bölgesine bağlı olarak görme kaybı, kas zaafı, baş dönmesi, dengesizlik gibi klinik bulgularla ortaya çıkan hastalık atak ve remisyonlarla seyreder. Zaman içinde hastalar atakların azaldığı ve özürlülüğün giderek arttığı progresif bir evreye girerler [2].

MS'te kognitif bozukluk, yaşam niteliği ve işlevsellik için önemli bir prediktör olup [106,107] yaygınlığı %40 ile %70 arasında değişen önemli bir bulgudur [106,108]. Kognitif bozulma en sık, bellek, bilgi işlem hızı, dikkat ve yürütücü işlevler alanlarındadır [109]. Kognitif bozukluk ve kognitif işlevlerin zamanla daha fazla kötüleşmesi sıklıkla kronik progresif MS olgularında gözlense de KİS ve RRMS olgularında da gözlenmektedir [110].

BMS, RRMS olgularının %10'undan azında görülür ve 10 yılı aşan hastalık süresine rağmen EDSS skorunun 3.0 altında olması ile karakterizedir [56,111]. Bazı MS olgularında özürlülüğün ilerlememesi şeklinde ortaya çıkan bu fenomenin altında yatan moleküler mekanizmalar iyi bilinmemektedir. Sadece bir mikroarray çalışmasında BMS olgularının, klasik MS olgularından farklı olarak, periferik kan hücrelerinde inflamatuar ve apoptotik yolakları etkinleştiren RNA polimeraz I (POL-1) yolağı faktörlerinin ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Bu değişikliğin otoreaktif T lenfositlerinin apoptotik ölümüne yol açarak SSS'de süregiden inflamasyonu azalttığı ve bu şekilde özürlülükteki ilerlemenin gerilediği ileri sürülmüştür [56]. Bu bulgu başka araştırıcılar tarafından doğrulanmadığı gibi benign-

klasik MS arasındaki moleküler farklılıkların etnik ve coğrafi faktörlerden etkilenip etkilenmediği de araştırılmamıştır.

Bu çalışmada EDSS skorları belirlenen BMS, benign olmayan MS ve sağlıklı kontrol olgularının periferik kan mononükleer hücrelerinde mikroarray teknikleri kullanılarak gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Aynı olgularda ayrıntılı nöropsikiyatri incelemeleri de yapılmıştır. Mikroarray çalışmasından elde edilen veriler hastaların nöropsikiyatrik inceleme bulguları ile karşılaştırılarak MS'te özürlülüğün gelişiminde rol oynayabilecek olası patojenik moleküler yolakların belirlenmesi amaçlanmıştır. Benign ve benign olmayan MS olgularının ve ayrıca farklı özürlülük düzeyindeki MS olgularının mikroarray ve kognitif parametrelerinin karşılaştırılması sonucunda yeni prognoz belirteçlerinin ve tedavi için olası hedef moleküllerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmanın önemli bir bulgusu BMS olgularında kognitif test skorlarının sağlıklı kontrollerden çok daha düşük düzeyde ve benign olmayan MS olgularınınkine benzer düzeyde patolojik olarak saptanmasıdır. Bunun yanısıra motor performansı işaret eden 9-delik ve 25-adım testleri BMS ve sağlıklı kontrollerde birbirine benzer düzeyde bulunurken, benign olmayan MS olgularında her iki gruba göre düşük skorlar elde edilmiştir. Bu bulgular BMS olgularında motor ve muhtemelen diğer somatik nörolojik muayene bulgularının korunduğunu ancak kognitif işlevlerin diğer MS olgularındakine benzer şekilde etkilendiğini düşündürmektedir. Geçmişte yapılan bir çok çalışmada benzer bulgular elde edilmiştir [105]. Ayrıca BMS olgularının SDMT skorlarının sağlıklılara göre düşük çıkmasına rağmen benign olmayan MS olgularınınkine kıyasla daha korunmuş olduğu da saptandı. SDMT testi uzun süreli dikkat, bilgi işleme hızı ve sözel akıcılık gibi yürütücü işlevlerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılır. SDMT skorlarının göreceli olarak daha normale yakın çıkması yürütücü işlevlerden sorumlu kognitif şebeke bölgelerinin yüksek nöroplastisite yetenekleri sayesinde adaptif değişiklikler geçirmesiyle açıklanabilir. BMS olgularında bilgisayar-temelli kognitif rehabilitasyona özellikle yürütücü işlevlerin iyi yanıt vererek bir miktar düzelme gösterdiği bildirilmiştir [105]. Bu bulgunun da yürütücü işlevlerden sorumlu beyin bölgelerinin yüksek adaptif özelliğiyle ilgili olması mümkündür. Çalışmaya dahil edilen non-BMS olgularının önemli bir kısmı sekonder progresif MS olgularından oluşmaktadır. Bu olgularda SSS'de inflamatuar

bulguların yanında nöroaksonal dejenerasyonun da başladığı bilinmektedir ve bu ek faktörün kognitif test skorlarında karıştırıcı bir faktör olarak rol oynaması mümkündür. Bu sebeple gelecekte yapılacak çalışmalarda, kontrol MS grubunun, BMS kriterlerini doldurmayan ancak henüz sekonder progresif MS de geliştirmemiş RRMS olgularından seçilmesi önerilebilir.

Diğer bir önemli bulgu çok sayıda genin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı mikroarray analizleri sonucunda BMS ve non-BMS olguları arasında en yüksek düzeyde anlamlı değişiklik gösteren genlerin büyük kısmının B lenfosit işlevleri ile ilgili olması idi. Bu bulgu B hücre işlevlerinin MS patogenezinde ve klinik progresyonunda önemli bir rol oynadığını bir defa daha doğrulamaktadır. MS patogenezinde B lenfositlerinin rolü giderek daha iyi anlaşılmaktadır. MS olgularında engellilik ve kognitif yıkımla ilişkili meningeal B lenfosit kümelerinin bulunması ve B lenfositlerini azaltan tedavi yöntemlerinin engellilik düzeyinde gerilemeye yol açması, B lenfositlerinin nöroinflamasyondaki önemini göstermektedir [112-114]. KİS dönemi gibi erken bir evrede bile olguların periferik kan ve BOS örneklerinde antijene özgü aktif B lenfositlerinin, bellek B lenfositlerinin, düzenleyici B lenfositlerin ve plazma hücrelerinin anlamlı derecede arttığı bilinmektedir. B lenfositleri intratekal alana daha ilk ataklarda geçmeye başlamakta ve B lenfosit düzeyleri ile beyin lezyon yükü, oligoklonal band varlığı ve proinflamatuar sitokin düzeyleri arasında korelasyon saptanmaktadır. KİS'ten MS'e dönüşen olguların periferik kanlarındaki bellek B lenfosit ve plazma hücresi düzeyleri, yıllarca KİS olarak kalan olgularınkine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [115-117].

BMS olgularında anlamlı ekspresyon değişikliği saptanan genlerden SWAP70, BANK1 ve BLK genlerinin B hücre aktivasyonu ve proliferasyonu yönünde çalıştığı, TGFB1 ve ATP1B3'ün ise B hücre inhibisyonu yonunda etkinlik gösterdiği bilinmektedir [36,42,49]. Önemli olarak doğrulama amacıyla yapılan RT-PCR çalışmalarında B lenfosit aktivasyonu yönünde çalışan genlerde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık saptanmazken, B lenfosit inhibitörü olan TGFB1 ve ATP1B3 genlerinin ekspresyon düzeyleri non-BMS olgularında BMS ve sağlıklı kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük saptandı. Bu bulgular ışığında BMS olgularında, diğer MS olgularından farklı olarak, B hücre inhibitörlerinin yüksek düzeyde ifade ediliyor olmasının SSS'deki lenfosit infiltrasyonunu sınırladığı ve buna

bağlı olarak BMS'de klinik seyrin daha hafif seyrettiği yönünde bir hipotez önerilmesi mümkündür.

B lenfosit aktivasyonu yönünde çalışan BANK1 gen ekspresyon düzeyi ve B ve T lenfosit aktivasyonu yönünde çalışan SWAP-70 gen ekspresyon düzeyi ile motor performans testleri arasında pozitif korelasyon saptanması B ve T lenfosit aktivasyonunun MS'de klinik progresyon ile yakından ilişkili olduğu savını doğrulamaktadır. Ayrıca MS hastalarından elde edilen periferik kan hücreleriyle yapılan çalışmalar SWAP-70 geninin lenfositlerden proinflamatuar sitokin salgılanmasını sağladığı ve MS atakları sırasında SWAP-70 ekspresyonunun arttığı yönünde bulgular vermiştir [42].

TGFB1 gen ekspresyon düzeyiyle progresyon indeksi arasında ters korelasyon saptanması da önemlidir. Bu bulgu TGFB1 üretimi düşük olan MS olgularında progresyon hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir ve BMS olgularında TGFB1 düzeyinin non-BMS olgularınınkine göre daha yüksek olması ile uyumludur. Yapımı TGFB1 geninin kontrolü altında olan TGF-beta sitokininin yüksek düzeyde üretilmeye devam etmesinin bazı MS olgularında klinik seyrin olumlu seyretmesine katkıda bulunuyor olması mümkündür. Bu savla ve çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde TGF-betanın MS hastalarında ve DAE modelinde SSS'e aktif lenfosit geçişini sınırlandırdığı ve MS olgularında TGF-beta ekspresyonunun düşük seyrettiği bildirilmiştir [118,119].

Diğer yandan motor sistem performansı ile ilişkili bulunan genlerin herhangi bir kognitif test skoru ile korelasyon göstermemesi ilginçtir. Bu bulgu B ve T hücre aktivasyonunun daha çok somatik nörolojik sistem işlevlerini etkilediğini ve kognitif işlevlerin farklı immünolojik faktörler tarafından kontrol edildiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında BMS olgularında kognitif yıkımın diğer MS olgularınınkine eşit düzeyde olduğu bilgisi doğrulanmış ve BMS olgularını diğer MS olgularından ayıran ve muhtemelen MS'in klinik progresyonunu belirleyen yeni molekül adayları bulunmuştur. Bu sayede MS olgularında prognozu belirlemeye yardımcı olabilecek genetik faktörler tanımlanmış, MS patogenezinde rol alan mekanizmaların aydınlatılması yolunda B lenfositleri ile ilişkili yeni ipuçları elde edilmiş ve MS'de olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek hedef moleküller belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ontaneda D, Fox RJ, Chataway J. Clinical trials in progressive multipl sclerosis: lessons learned and future perspecties. Lancet Neurol. 2015; 14(2):208-223
2. Patwardhan MB, Matchar DB, Samsa GP ve ark. Cost of multiple sclerosis by level of disability: a review of literature. Mult Scler 2005; 11(2):232-239
3. Krieger SC. New approaches to the diagnosis, clinical course and goals of therapy in multipl sclerosis and related disorders. Continuum (Minneap Minn) 2016; 22(3):723-729
4. Kumar DR, Aslinia F, Yale SH ve ark. Jean-Martin Charcot: The father of neurology. J Clin Med Res 2011; 9:46-49
5. Rolak LA. MS: The basic facts. J Clin Med Res 2003; 1(1):61-62
6. Rolak LA. The basic facts: The history of MS. National MS Society 2009; 1-11
7. Van Epps HL. Thomas Rivers and the EAE model. J Exp Med 2005; 202(1):4
8. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM ve ark. T cells in multipl sclerosis and 12 criteria for multipl sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteris. Ann Neurol 2011; 69(2):292-302. doi:10.1002/ana.22366
9. Holmøy T. The discovery of oligoclonal bands: A 50-year anniversary. Europ Neurol 2009; 62:311-315
10. Kurtzke J. Rating neurologic impairment in multipl sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). Jour of Neurol 1983; 33:1444-1452
11. Pirko I, Lucchinetti CF, Siram S ve ark. Grey matter involvement in multipl sclerosis. Neurology 2007; 68(9):634-642
12. Calabrese M, Poretto V, Favaretto A ve ark. Cortical lesion load associated with progression of disability in multipl sclerosis. Brain 2012; 135(10):2952-2961
13. Hauser SL. The Charcot Lecture | beating MS: a story of B cells, with twists and turns. Mult Scler 2015; 21(1):8-21
14. Jones DE. Early relapsing multiple sclerosis. Continuum (Minneap Minn) 2016; 22(3):744-760

15. Compston A, Wekerle H. The genetics of multiple sclerosis. Alastair Compston (Ed), McAlpine's Multiple Sclerosis içinde (s. 113-182) Philadelphia: Churchill Livingstone ELSEVIER, 2005

16. Çelik Y Prevalence of multiple sclerosis in the metropolitanarea of Edirne city, Turkey. Balkan Med J 2011; 28:193-196

17. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. Br Med J 1971; 3:725-729

18. Koch MW, Metz LM, Agrawal SM ve ark. Environmental factors and their regulation of immunity in multipl sclerosis. J Neurol Sci 2013; 324:10-16

19. Von Geldern G, Mowry EM. The influence of nutricional factors on the prognosis of multipl sclerosis. Nat Rev Neurol 2012; 8(12):678-689

20. Tanasescu R, Constantinescu C, Tench CR ve ark. Smoking cessation and the reduction of disability progression in multipl sclerosis: a cohort study. Nicotine Tob Res 2017; ntx084. doi: 10.1093/ntr/ntx084

21. Owens GP, Gilden D, Burgoon MP ve ark. Viruses and multiple sclerosis. Neuroscientist 2011; 17(6):659–676

22. Mameli G, Cossu D, Cocco E ve ark. Epstein–Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2014; 270:51-55

23. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372:1502-1517

24. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2011; 1812:132-140

25. Morandi E, Tanasescu R, Tarlinton RE ve ark. The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. PloS One 2017; 12(2):e0172415 doi: 10.1371/journal.pone.0172415

26. Perron H, Dougier-Reynoud HL, Lomparski C ve ark. Human endogenous retrovirus protein activates inate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice. PLoS One 2013; 8(12):e80128 doi:10.1371/journal.pone.0080128

27. Brudek T, Christensen T, Aagaard L ve ark. B cells and monocytes from patients with active multipl sclerosis exhibit increased surace expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. Retrovirology 2009; 9(1):112-117

28. Eraksoy M, Demir GA. Merkezi sinir sisteminin miyelin hastalıkları. Öge AE, Baykan B (Ed), Nöroloji içinde (s. 603-630) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2011

29. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R ve ark. HLA-DR15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psych 2002; 72:184-187

30. Kheradvar A, Tabassi AR, Nikbin B ve ark. Influence of HLA on progression of optic neuritis to multiple sclerosis: results of a four-year follow up study. Mult Scler 2004; 10:526-531

31. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M ve ark. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 2011;476:214–219

32. Liu Y, Carson-Walter EB, Cooper A et al: Vascular gene expression patterns are conserved in primary and metastatic brain tumors. J Neurooncol 2010; 99: 13–24

33. Khan K, Rudkin A, Parry DA et al: Homozygous mutations in PXDN cause congenital cataract, corneal opacity, and developmental glaucoma. Am J Hum Genet 2011; 89: 464–473

34. Labelle-Dumais C, Dilworth DJ, Harrington EP et al: COL4A1 mutations cause ocular dysgenesis, neuronal localization defects, and myopathy in mice and Walker-Warburg syndrome in humans. PLoS Genet 2011; 7: e1002062

35. Gould DB, Marchant JK, Savinova OV et al: Col4a1 mutation causes endoplasmic reticulum stress and genetically modifiable ocular dysgenesis. Hum Mol Genet 2007; 16: 798–807

36. Bae SC, Lee YH. Association between BANK1 polymorphisms and susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis. Cell Mol Biol 2017 63(3):29 DOI:10.14715/cmb/2017.63.3.6

37. Pubmed. "Gene" erişim 28 Ekim 2018 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55024

38. Dam EM, Habib T, Chen J ve ark. The BANK1 SLE-risk variants are associated with alterations in peripheral B cell signaling and development in humans. Clin Immunol, 2016; 173:171-180

39. Pubmed. "Gene" erişim 28 Ekim 2018 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29760

40. Shinsuke N, Hiroshi I. Overexpression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 protein (EBI3) in MRL/lpr mice suppresses their lupus nephritis by activating regulatory T cells. Autoimmunity 2013; 46(7):446-454

41. Pubmed. "Gene" erişim 28 Ekim 2018 http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/10232

42. Türkoğlu R, Özyurt S, Ulusoy C ve ark. Expression of switch-associated protein 70 is associated with lymphocyte activation and reduced disability in multiple sclerosis. Immunol Lett, 2016; 177:75-77

43. Erdağ E, Tüzün E, Uğurel E ve ark. Switch-associated protein 70 antibodies in multiple sclerosis: relationship between increased serum levels and clinical relapse. Inflamm Res 2012; 61(9):927-930

44. Pubmed. "Gene" erişim 28 Ekim 2018 http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/483

45. Hao K, Niu T, Xu X ve ark. Single-nucleotide polymorphisms of the KCNS3 gene are significantly associated with airway hyperresponsiveness. Hum Genet 2005; 116(5):378-383

46. Georgiev D, Arion D, Enwright JF ve ark. Lower gene expression for KCNS3 potassium channel subunit in parvalbumin-containing neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. Am J Psychiatry, 2014; 171(1):62-71

47. Del Valle-Pinero AY, Martino AC, Taylor TJ ve ark. Pro-inflammatory chemokine C-C motif ligand 16 (CCL-16) dysregulation in irritable bowel syndrome (IBS): a pilot study. Neurogastroenterol Motil, 2011; 23(12):1092-1097

48. Sellam J, Rouanet S, Handel-Chavez H ve ark. CCL19, a B cell chemokine, is related to the decrease of blood memory B cells and predicts the clinical response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2013; 65(9):2253-2261

49. Ong T, Marshall SG, Karczeski BA ve ark. Cystic fibrosis and congenital absense of vas deferens. Adam MP, Ardinger HH (Ed) GeneReviews [İnternet] içinde (s 1993-2018) Seattle: University of Washington, 2017

50. Pubmed. "Gene" erişim 29 Ekim 2018 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1607

51. Feng J, Craddock N, Jones IR ve ark. Systematic screening for mutations in the glycine receptor alpha2 subunit gene (GLRA2) in patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. Psychiatr Genet 2001; 11:45-48

52. Nguyen KV, Naviaux RK, Nyhan WL. Novel mutation in the human HPRT1 gene and the Lesch-Nyhan disease. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2017; 36(11):704-711

53. Shimojima K, Narai S, Togawa M ve ark. 7p22.1 microdeletions involving ACTB associated with developmental delay, short stature, and microcephaly. Eur J Med Genet, 2016; 59(10):502-506

54. Pubmed. "Gene" erişim 29 Ekim 2018 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9462

55. Pubmed. "Gene" erişim 29 Ekim 2018 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/640

56. Achiron A, Feldman A, Magalashvili D ve ark. Suppressed RNA-polymerase 1 pathway is associated with benign multiple sclerosis. PLoS One. 2012;7(10):e46871

57. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ ve ark. Twin concordance and sibling recurrence rates in multipl sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(22): 12877–12882

58. Altıntaş A, Benbir G. Miyelinizasyon, Demiyelinizasyon *ve* Remiyelinizasyon Mekanizmaları. Türk Nöroloji Dergisi 2005*;* 11(2): 123-130

59. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ ve ark. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am J Pathol 2008; 172: 146–55

60. Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ ve ark. Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. Brain 1992; 115: 1611–31

61. Bruck W, Porada P, Poser S ve ark. Monocyte / macrophage differantiation in early multiple sclerosis lesions. Ann Neurol 1995; 38(5):788-796

62. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: Where do we stand? Continuum 2013; 19:901-921

63. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J ve ark. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 2000; 47:707–17

64. Scolding N, Franklin R, Stevens S ve ark. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. Brain 1998; 121: 2221–28

65. Anderson JM, Hampton DW, Patani R ve ark. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Brain 2008; 131: 1736–48

66. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. J Clin Invest 2012; 112(4):1180-1188

67. Magliozzi R, Howell O, Vora A ve ark. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associated with early onset of disease and severe cortical pathology. Brain 2007; 130: 1089–104

68. Magliozzi R, Reynolds R, Franciotta D ve ark. Dysregulated EpsteinBarr virus infection in the multiple sclerosis brain. J Exp Med 2007; 204: 2899–912

69. Constantinescu C, Gran B. The essential role of T cells in multiple sclerosis: A reappraisal. Biomed J 2014; 37(2):34-40

70. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K ve ark. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferone beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. Nat Med 2010; 16(4):406-412

71. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V ve ark. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflamation. Nat Immunol 2011; 7:253-265

72. Disanto G, Kjetil SG, Ricigliano VA ve ark. Dnase hypersensitive sites and association with multiple sclerosis . Hum Mol Genet 2014; 23:942-948

73. Disanto G, Morahan JM, Barnett MH ve ark. The evidence for the role of B cells in multiple sclerosis. Neurology 2012; 78(11):823-832

74. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J ve ark. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. Neurology 2006;67:1062–1064

75. Owens GP, Bennett JL, Lassmann H ve ark. Antibodies produced by clonally expanded plama cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. Ann Neurol 2009; 65:639-649

76. Festa ED, Hankiewicz K, Kim S ve ark. Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis. Mult Scler 2009;15:1271–1279

77. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R ve ark. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. Brain Pathol 2004;14:164–174

78. Bielekova B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2018; a034470. doi:10.1101/cshperspect.a034470

79. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. Neurology 1996;46:907–911

80. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA ve ark. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology 2014; 83:278-286

81. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F. ve ark. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol 2018; 17:162-173

82. Okuda DT, Siva A, Kantarcı O ve ark. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. PloS One 2014; 9(3):e90509. Doi:10.1371/journal.pone.0090509

83. Darin OT. Incidental lesions suggesting multiple sclerosis. Continuum (Minneap Minn) 2016; 22(3):730-743

84. Amato MP, Zipoli V, Goretti B ve ark. Benign multiple sclerosi: cognitive, psychological and social aspects in clinical cohort. J Neurol 2006; 253(8):1054-1059

85. Menon S, Shirani A, Zhao Y ve ark. Characterising aggressive multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84(11):1192-1198

86. Freedman MS, Rush CA. Severe, highly active or aggressive multiple sclerosis. Continuum (Minneap Minn) 2016; 22(3):761-784

87. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P ve ark. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnestic process. Brain 2003; 126(pt4):770-782

88. Krieger SC. The topogrophical model of multiple sclerosis: a new visualization of disease course. Washington DC: American Academy of Neurology 67th Annual Meeting, Nisan 23, 2015:ePosterP4.013

89. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O ve ark. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. Lancet Neurol 2016; 15: 292-303

90. Attarian HP, Brown KM, Duntley SP ve ark. The relationship of sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. Arch Neurol 2004; 61: 525-8

91. Ghaem H, Haghighi AB. The impact of disability, fatigue and sleep quality on the quality of life in multiple sclerosis. Ann Indian Acad Neurol 2008;11:236-241

92. Stanton BR, Barnes F, Silber E. Sleep and fatigue in multiple sclerosis. Mult Scler 2006;12:481-486

93. Kaminska M, Kimoff RJ, Schwartzman K ve ark. Sleep disorders and fatigue in multiple sclerosis: evidence for association and interaction. J Neurol Sci 2011;302:7-13

94. Manconi M, Ferini-Strambi L, Filippi M ve ark. Multicenter case-control study on restless legs syndrome in multiple sclerosis: the REMS study. Sleep 2008; 31: 944-952

95. Krueger JM, Pappenheimer JR, Karnovsky ML. Sleep-promoting effects of muramyl peptides. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1982; 79(19):6102–6106

96. Radulovacki M, Miletich RS, Green RD. N6 (L-phenylisopropyl) adenosine (L-p ha) increases slow-wave sleep (S2) and decreases wakefulness in rats. Brain Res 1982; 246:178–180

97. Krueger JM, Dinarello CA, Chedid L. Promotion of slow-wave sleep (SWS) by a purified interleukin-1 (Il-1) preparation. Fed. Proc. 1983; 42:356

98. Ueno R, Ishikawa Y, Nakayama T ve ark. Prostaglandin D2 induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982; 109:576–582

99. Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. Curr. Pharm. Des. 2008; 14: 3408–3416

100. Opp MR. Cytokines and sleep. Sleep Med. Rev. 2005; 9: 355–364

101. Opp M, Born J, Irwin M. Sleep and the immune system. Ader R. (Ed), Psychoneuroimmunology içinde (s:579-618) Burlington: Academic Press, 2007

102. Preston BT, Capellini I, Mcnamara P ve ark. Parasite resistance and the adaptive significance of sleep. BMC Evol Biol 2009; 9:7

103. Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK ve ark. Sleep loss and inflammation. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010; 24: 775–784

104. Barbulovic-Nad I, Lucent M, Sun Y ve ark. Bio-microarray fabrication techniques--a review. Crit Rev Biotechnol 2006; 26(4): 237-259

105. Arsoy E, Tüzün E, Türkoğlu R. Effects of computer-assisted cognitive rehabilitation in benign multiple sclerosis. Turkish Journal of Medical Sciences 2018; 48: 999-1005

106. Rao MS, Leo GJ, Bernadrin L ve ark. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Fequency, patterns and prediction. Neurology 1991;41:685-691

107. Papathanasiou A, Messinis L, Zampakis P ve ark. Thalamic atrophy predicts cognitive impairment in relapsing remitting multiple sclerosis. Effect on instrumental activities of daily living and employment status. J Neurol Sci 2015; 358: 236-242

108. Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2008; 7(12):1139-1151

109. Hoffmann S, Tittgemeyer M, Cramon DY. Cognitive impairment in multiple sclerosis. Curr Opin Neurol 2007; 20(3):275-280

110. Potagas C, Giogkaraki E, Koutsis G ve ark. Cognitve impairment in different MS subtypes and clinically isolated syndromes. J Neurol Sci 2008; 267:100-106

111. Polman CH, Reingold SC, Banwell B ve ark. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011; 69:292-302

112. Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. Ann Neurol 1979; 5:22-31

113. Kuerten S, Pommerschein G, Barth SK ve ark. Identification of B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood. Clin Immunol 2014; 152:20-24

114. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R ve ark. Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. PloS One 2008; doi.org/10.1371/journal.pone.0002559

115. Villar LM, Espino M, Roldan E ve ark. Increased peripheral blood CD5+ B cells predict earlier conversion to MS in high risk clinically isolated syndromes. Mult Scler J 2011; 17(6):690-694

116. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and other CD20+ B-cell-Depleting therapies in multiple sclerosis. Neurotherapeutics 2017; 14:835-841

117. Aktura ŞD, Yılmaz V, Yaşargün DÖ ve ark. Peripheral blood memory B cell frequency predicts conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord 2018; 23:9-14

118. Meoli EM, Oh U, Grant CW ve ark. TGF-β signaling is altered in the peripheral blood of subjects with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2011; 230:164-168

119. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF ve ark. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2017; 114(40):10713-10718