



**T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ
HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE
90 (HSP-90)'NIN METABOLİT VE GEN
EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ**

Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Temmuz 2024
İSTANBUL**



T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ
HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE
90 (HSP-90)'NİN METABOLİT VE GEN
EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ**

Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Temel TOMBUL**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Temmuz 2024
İSTANBUL**

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliği hükümlerine göre uzmanlık eğitimi gören Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK'ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu 'RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE 90 (HSP-90)'NİN METABOLİT VE GEN EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ' başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr Temel Tombul
Nöroloji, İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA

Üyeler

Doç. Dr. Asuman ORHAN VAROĞLU
Nöroloji, İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Kadriye AĞAN YILDIRIM
Nöroloji, Marmara Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 25/07/2024

YAZAR BİLDİRİMİ

“RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE 90 (HSP-90)’NİN METABOLİT VE GEN EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ” isimli uzmanlık tezinde Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK;

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir.
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir.
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisinde alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisinde alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Temmuz, 2024

Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK

İmza:

BİLGİLENDİRME

- Bu tez daha önce herhangi bir yerde yayınlanmamıştır.
- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkim yoktur.
- Bu tez herhangi bir kurum tarafından desteklenmemiştir.

Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK



TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecim boyunca benden mesleki bilgisini ve tecrübesini, tez sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen anabilim dalı başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Temel TOMBUL'a ve akademik bilgilerini ve deneyimlerini bizlerle paylaşmaktan çekinmeyen, desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hasan Hüseyin KARADELİ, Doç. Dr. Asuman ORHAN VAROĞLU, Doç. Dr. Fatma Betül ÖZDİLEK ve Doç. Dr. Ahmet Yıldırım'a teşekkür ederim.

Tez sürecimde her türlü yol gösterici olan ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a ve çalışmamın laboratuvar sürecinde çok emeği olan her sorumu büyük bir itina ile cevaplayan sevgili Merve Nur AL ve Ayşe ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Asistanlık bir uzman hekimin en zorlu ama bir o kadar da güzel yolculuğuymuş. Engebeli yollarda düştüğümde elimden tutup bilgi ve tecrübeleriyle kaldıran canım dostum Dr. Ruken ŞİMŞEKOĞLU'na çok teşekkür ederim. Çok kıymetli Başasistan Uz. Dr. İlknur AYDIN CANTÜRK'e bilgi, deneyimini ve bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemediği için teşekkürü borç bilirim.

Hiçbir zaman kıdemlim gibi hissettirmedığınız, asistanlığımın ilk günlerinden tüm olumsuzluklara beraber göğüs gerdiğimiz çok sevgili Selin ÖZMEN ve Neslihan EŞGÜL varlığınıza minnettarım. Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım desteklerini benden esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarım Zeynep Erva GÜLLÜOĞLU TORUN, Emre AKBAŞ, Bahadır HOŞVER'e çok teşekkür ederim. Tez sürecimde desteklerini asla esirgemeyen ve her zaman gönülden yardımcı olan Mehmet A. BALCI ve çok sevdiğim Simay IŞILDAR ve Ece TURAN'a ve diğer çok kıymetli tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez sürecimde her zaman yanımda olan çok sevdiğim çalışma arkadaşlarım Safiye ÇİMEN, Büşra KÖLEOĞLU ve Arzu DALMAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Sevgili sorumlu hemşiremiz Hicran ÇETİN ve başta emektar hemşire arkadaşlarım olmak üzere tüm sağlık personeline çok teşekkür ederim.

Ailemden biri gibi olan sevgili dostum Dr. Ezgi ASLAN bu sürecimde koşulsuz gönülden desteğin ve her zaman yanımda olduğunu hissettirdiğin için sana çok minnettarım.

Sevgili eşim vizyonunu, çok severek icra ettiğin hekimliğini, azmini, çalışkanlığını her zaman takdir ettim. Bu süreçte maddi ve manevi benim en büyük destekimdin, sevgini ve güler yüzünü benden hiç esirgemediğin için çok teşekkür ederim.

Canım babam, hayatım boyunca her zaman seni örnek aldım. Askerlik mesleğini bu denli alışkanlık, cesaret, disiplin ve gururla temsil ettiğin ve başta bana olmak üzere dokunduğun her hayat adına sana teşekkür ederim. Canım annem ayakları üstünde durabilen bir kadın olmamı sağlayan; her başarım ile gururlandığın ve başarısızlıklarımda da kucak açtığın için ne kadar teşekkür etsem az ve gözümden sakındığım canım kardeşim bu hayattaki en büyük şansım senin gibi bir kız kardeşe sahip olmaktı ve bana öğrettiğin her şey için çok teşekkür ederim.

Dr. Nestuğ KESKİN ZEREYAK

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	i
YAZAR BİLDİRİMİ	ii
BİLGİLENDİRME.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MULTİPL SKLEROZ	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Risk Faktörleri.....	4
2.1.3.1. Genetik risk faktörleri	4
2.1.3.2. Çevresel risk faktörleri	5
2.1.3.2.1. Epstein-Barr virüsü.....	5
2.1.3.2.2. Coğrafi enlem ve doğum yeri.....	6
2.1.3.2.3. Güneş ve D vitamini.....	6
2.1.3.2.4. Diğer faktörler	7
2.1.4. İmmün patogeneze	7
2.1.4.1. T hücreler	8
2.1.4.2. B hücreler	9
2.1.4.3. Astrosit ve monositler	9
2.1.5. Klinik prezantasyon	10
2.1.5.1. Radyolojik izole sendrom.....	10
2.1.5.2. Klinik izole sendrom	10
2.1.5.3. Relapsing remitting multipl skleroz	10
2.1.5.4. Sekonder progresif multipl skleroz	11
2.1.5.5. Primer progresif multipl skleroz.....	11

2.1.6. Multipl skleroz tanı kriterleri	11
2.1.7. Tanı yöntemleri	12
2.1.7.1. Uyarılmış potansiyeller	12
2.1.7.2. Beyin omurilik sıvısı	12
2.1.7.3. Optik kohorans tomografi	13
2.1.7.4. Manyetik rezonans görüntüleme	13
2.1.8. Multipl skleroz tanısında kırmızı bayraklar	14
2.1.9. Ayırıcı tanı	14
2.1.10. Engellilik Takibinde kullanılan değerlendirme ölçeği.....	15
2.1.11. Multipl Skleroz atak ve uzun dönem tedavi.....	15
2.1.12. Multipl Sklerozda biyobelirteçler	16
2.2. ISI ŞOK PROTEİNLERİ:.....	16
2.2.1. Küçük ısı şok proteinleri	17
2.2.2. Isı şok proteini-70	17
2.2.3. Isı şok proteinini-90	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. ARAŞTIRMA YERİ, ZAMANI VE ÖRNEKLEM SEÇİMİ	21
3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE MUHAFAZASI.....	22
3.3. KULLANILAN GEREÇLER, SARF VE KİMYASALLAR	23
3.4. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	24
3.4.1. ELISA yöntemi	24
3.4.2. RNA izolasyonu.....	25
3.4.3. İzole edilen RNA konsantrasyonunun belirlenmesi.....	27
3.4.4. cDNA sentezi	27
3.4.5. Gerçek zamanlı kantitatif pcr yöntemiyle gen ifadelerinin belirlenmesi.....	27
3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. ISI ŞOK PROTEİNLERİNİN ELISA İLE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN ANALİZİ.....	30
4.2. KORELASYON ANALİZİ	45
4.3. ROC ANALİZİ SONUÇLARI	48
4.4. HSP GEN İFADELERİNİN ANALİZİ.....	49
5. TARTIŞMA.....	53
6. TEZİN KISITLILIKLARI	63

7. SONUÇ	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	74
EK 1: ETİK KURUL ONAYI	74
EK 2: HASTA TAKİP FORMU.....	76
EK 3: BENZERLİK RAPORU.....	77



KISALTMALAR

APC	Antijen Sunan Hücre
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BT	Beyin Tomografisi
CHI3L1	Kininaz 3 Benzeri 1 Protein
CXCL13	Kemokin Ligand 13
DMT	Hastalık Modifiye Edici Terapi
EAE	Deneysel Alerjik Ensefalomyelit
EBNA	Ebstein Barr Virüsü Nükleer Antijeni
EBV	Ebstein Barr Virüsü
EDSS	Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği
ELISA	Enzim Linked İmmün Sorbent Assay
Gd	Gadopentate Dimeglutamine
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GRP94	Glukoz ile Düzenlenen Protein 94
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HSF	Isı Şoku Faktörleri
HSc	Isı Şoku Kognatları
HSP	Isı Şok Proteini
IFN	İnterferon
IgG	İmmünglobulin G
IL	İnterlökin
KİS	Klinik İzole Sendrom
LMP	Latent Membran Proteinleri
MAG	Miyelinle İlişkili Glikoprotein
MiRNA	Mikro RNA
MBP	Miyelin Bazik Protein
MKBP	Miyotonik Distrofi Protein Kinaz Bağlayıcı Protein
MOG	Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini
MR	Manyetik Rezonans
MRP-14	Miyeloid İlişkili Protein 14
MS	Multipl Skleroz

MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NF-KB	Nükleer Faktör Kappa B
NFL	Nöroflament Hafif Zincir
NMOSH	Nöromiyelitis Optika Spektrum Hastalıkları
OKB	Oligoklonal Band
OKT	Optik Kohorans Tomografi
ON	Optik Nörit
OPC	OPC
OR	Olasılık Oranı
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PPMS	Primer Progresif Multipl Skleroz
RİS	Radyolojik İzole Sendrom
RRMS	Relapsing Remitting Multipl Skleroz
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SİMOA	Single Molekül Assay
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPMS	Sekonder Progresif Multipl Skleroz
SVİ	Santral Venöz İşaret
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRAP-1	Tümör Nekrozis Faktörü Reseptörü ile İlişkili Protein-1
UP	Uyarılmış Potansiyel
UVB	Ultraviyole B
VCA	Viral Kapsit Antijeni
VDR	Vitamin D Reseptörü

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. 2017 McDonald kriterlerine göre mekân ve zamanda yayılım kriterleri.	11
Tablo 2.2. 2017 Gözden geçirilmiş McDonald kriterleri.....	12
Tablo 2.3. Genişletilmiş engellilik durum ölçeği.	15
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan gereç, sarf ve maddeler.	23
Tablo 3.2. cDNA sentezi esnasında kullanılan maddeler.	27
Tablo 3.3. Polimeraz zincir Reaksiyon koşulları.	27
Tablo 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan maddeler.	29
Tablo 3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları.	29
Tablo 4.1. Katılımcı frekans tablosu.	30
Tablo 4.2. Katılımcı özelliklerinde yaş değişkeni farkı.	32
Tablo 4.3. Hasta grubunda IGG değişkeni farkı.	33
Tablo 4.4. Katılımcı özelliklerinde HSP90AB1 düzeyleri farkı.	34
Tablo 4.5. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSP90AB1 düzeyleri farkı.	36
Tablo 4.6. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSP90AB1 düzeyleri farkı.	36
Tablo 4.7. Katılımcı özelliklerinde HSP90AA2 düzeyleri farkı.	37
Tablo 4.8. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSP90AA2 düzeyleri farkı.	38
Tablo 4.9. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSP90AA2 düzeyleri farkı.	38
Tablo 4.10. Katılımcı özelliklerinde HSPA1A düzeyleri farkı.	39
Tablo 4.11. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSPA1A düzeyleri farkı.	40
Tablo 4.12. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSPA1A düzeyleri farkı.	41
Tablo 4.13. Katılımcı özelliklerinde HSPA8 düzeyleri farkı.	41
Tablo 4.14. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSPA8 düzeyleri farkı.	43
Tablo 4.15. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSPA8 düzeyleri farkı.	43
Tablo 4.16. Hasta özelliklerinde hastalık süresi farkı.	44
Tablo 4.17. EDSS ve proteinler arasındaki η^2 sonuçları.	45
Tablo 4.18. Atak sonrası geçen süreye göre hastaların dağılımı.	45
Tablo 4.19. Atak sonrası süreye göre ısı şok proteinleri ölçüm farkı.	46
Tablo 4.20. Kontrol grubunda korelasyon analizi sonuçları.	47
Tablo 4.21. Hasta grubunda korelasyon analizi sonuçları.	47
Tablo 4.22. Hasta grubunda atak durumunun ROC analiz sonuçları.	48
Tablo 4.23. Enrichr veri tabanı kullanılarak elde edilen tablo.	50
Tablo 4.24. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile belirlenen gen ifadelerinin ısı haritası üzerinde gösterimi. .	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. HSP70 ve HSP90'nın şaperon aktivitesinin şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.2. HSP70'in doğuştan ve edinsel bağışıklık hücreleri ile ilişkisinin gösterimi.	19
Şekil 2.3. HSP70 ve HSP27'nin apoptoza müdahalesi.	19
Şekil 2.4. HSP90 ailesi üyelerinin alan yapısı ve alanların biyolojik fonksiyonları	20
Şekil 4.1. Hasta grubunda atak durumunun ROC analiz sonuçları.	48
Şekil 4.2. Reactome veri tabanından elde edilen sinyal yolları analizi.....	49
Şekil 4.3. Göreceli gen ifadeleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) –1.	51
Şekil 4.4. Göreceli gen ifadeleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) –2.	52
Şekil 4.5. Göreceli gen ifadeleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) –3.	52

ÖZET

RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE 90 (HSP-90)'NİN METABOLİT VE GEN EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ

Multipl skleroz (MS), inflamasyon ve nörodejeneratif süreçlerle karakterize, merkezi sinir sisteminin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. MS'de inflamasyon, ısı şoku proteini 70 (HSP70) ve ısı şok poretini 90'nın (HSP90) hücre içerisinde sentezini ve hücre dışı alana salınımını indükler bu da bağışıklık yanıtlarını ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir. Bu çalışmanın ana amacı, Relapsing Remitting Multipl Skleroz (RRMS)'de hastalığın inflamasyonun en yoğun olduğu atak döneminde ve hastalığın akut inflamatuvar aktivitesinin gerilediği remisyon dönemindeki serum HSP70, HSP90 seviyelerini saptamak ve bu proteinlerin gen ekspresyon düzeylerini belirleyip atak ve remisyon döneminde hastalığın patogenezindeki rolünü anlayabilmektir.

Bu prospektif çalışmaya İstanbul Medeniyet Üniversitesi S.B. Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Nöroloji Multipl Skleroz polikliniğinden takipli olan RRMS tanılı 18-50 yaş aralığında 40 hasta (ortalama yaş; $33,55 \pm 10,04$, 26 Kadın), yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 40 kişilik sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Hasta grubunun %60'ı (n=24) remisyon döneminde iken, %40'ı (n=16) ise atak dönemindeydi.

Serum örneklerinde enzim bağlı immunosorbent yöntem (ELISA) yöntemi ile çalışılmak üzere HSP70'in aktif indüklenebilen formu olan HSPA1A ve yapısal formu olan HSPA8; HSP90 'ın aktif indüklenebilen formu olan HSP90AA2 ve yapısal formu olan HSP90AB1 belirlenmiştir. Çalışmanın sonraki basamağında ise MS atak dönemindeki hastalarda sağlıklı kontroller ile karşılaştırılarak kan örnekleri, HSP ilişkili genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla laboratuvar ortamında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle incelenmiştir.

MS atak dönemindeki hastalarda serum HSP70 ($p < 0,001$) ve HSP90 ($p < 0,001$) seviyeleri remisyon ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek sonuçlanmıştır. Atak

döneminde olan hastaların total kan RNA RT-PCR analizinde incelenen tüm genlerin ekspresyonları artış göstermiştir. Bu sonuçlar HSPA1A, HSPA8, HSP90AA2, HSP90AB1 serum ELISA düzeyleri ile paralellik göstermiştir. Total hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise serum HSP90AB1 ($p=0,045$), HSP90AA2 ($p=0,005$), HSPA1A ($p=0,018$), HSPA8 ($p=0,011$) seviyeleri sağlıklı kontrol grubundan düşük saptanmıştır.

Sonuç olarak; RRMS hastalarında atak döneminde, remisyonadaki hastalar ve sağlıklı kontrollere göre HSP-70 ve HSP-90 seviyeleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu proteinlerin ekspresyonundan sorumlu genlerin de düzeyleri sağlıklı kontrollerden yüksek saptanarak, serum protein düzeyleri ile paralellik göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular ısı şok proteinlerinin stres ve inflamasyon ve nörodejenerasyonun hastalığın farklı evrelerinde farklı düzeyde patogeneze katkı bulunduğunu, MS’de akut ve remisyon fazında gerek immünolojik gerek nöroprotektif özellikleri ile farklı davranış sergileyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyon profillemesi, Isı şok protein 70, Isı şok protein 90, Multipl skleroz, Sinyal transdüksiyonu.

ABSTRACT

ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP-70) AND 90 (HSP-90) METABOLITE AND GENE EXPRESSION SIGNALING PATHWAYS IN RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by inflammation and neurodegenerative processes. In MS, inflammation induces the synthesis and extracellular release of heat shock protein 70 (HSP70) and heat shock protein 90 (HSP90) within cells, which can trigger immune responses. The aim of this study is to determine the serum levels of HSP70 and HSP90 during the relapse phase, when inflammation is most aggressive, and the remission phase, when acute inflammatory activity has decreased, in patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS). Additionally, the study aims to discuss the role of these proteins in the pathogenesis of the disease by analyzing their gene expression levels during both the relapse and remission phases.

This prospective study included 40 patients aged 18-50 years (mean age: 33.55 ± 10.04 years, 26 women) diagnosed with RRMS and followed up at the Neurology Multiple Sclerosis outpatient clinic of Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital, along with an age- and sex-matched control group of 40 healthy individuals (mean age: 32.95 ± 9.40 years, 26 women). Among the patient group, 60% (n=24) were in the remission phase, while 40% (n=16) were in the attack phase.

In this study, the serum samples obtained were analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to measure the inducible form of HSP70, HSPA1A, and its structural form, HSPA8; as well as the inducible form of HSP90, HSP90AA2, and its structural form, HSP90AB1. In the next phase of the study, blood samples from patients in the MS attack phase were compared to healthy controls, and the expression of HSP-related genes was assessed in the laboratory using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

In patients during the MS attack phase, serum levels of HSP70 ($p<0.001$) and HSP90 ($p<0.001$) were significantly higher compared to the remission and healthy control groups. The expression of all genes examined in the total blood RNA RT-PCR analysis of patients in the attack phase was increased. These results were consistent with the serum ELISA levels of HSPA1A, HSPA8, HSP90AA2, and HSP90AB1. When comparing the total patient and control groups, serum levels of HSP90AB1 ($p=0.045$), HSP90AA2 ($p=0.005$), HSPA1A ($p=0.018$), and HSPA8 ($p=0.011$) were found to be statistically lower than those in the healthy control group.

In conclusion, during the attack phase in patients with RRMS, levels of HSP70 and HSP90 were found to be significantly higher compared to those in remission and healthy controls. The genes responsible for the expression of these proteins were also found to be elevated in comparison to healthy controls, showing consistency with serum protein levels. The findings from this study suggest that heat shock proteins contribute to the pathogenesis of stress, inflammation, and neurodegeneration at different levels during various phases of the disease. These proteins may exhibit distinct immunological and neuroprotective behaviors during the acute and remission phases of MS.

Key Words: Gen expression profiling, Heat shock protein 70, Heat shock protein 90, Multiple sclerosis, Signal transduction.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl skleroz, merkezi sinir sistemi (MSS)'nin enflamasyon, demiyelinizasyon, gliozis ve nörodejenerasyon ile karakterize kronik bir hastalığı olarak kabul edilmektedir (1). RRMS, atak ve remisyonla seyreden, MS'in en sık izlenen klinik fenotipidir. RRMS'de atak dönemi MSS'de inflamasyonun en yoğun olduğu dönemdir. RRMS patogenezinde periferik otoimmün süreçler sıklıkla tartışılmaktadır (2). Enflamasyon, stres proteinleri olarak bilinen ısı şok proteinlerinin hücre içinde sentezini ve ekstraselüler alana salınmasını indükler, bu da otoimmün reaksiyonları modüle edebilir.

Isı şok proteinleri, bakterilerden insanlara kadar farklı türler arasında yüksek derecede korunmuş moleküler şaperonlardır (3). Moleküler ağırlıklarına bağlı olarak, HSP'ler ana ailelere ayrılmaktadır (4). Isı şoku proteinleri, yeni sentezlenen ve stres kaynaklı denatürasyona maruz kalan proteinlerin uygun şekilde katlanmasına yardımcı olan moleküler şaperonlardır. Isı şoku proteinleri ayrıca çeşitli sitoprotektif ve sitostimülatör işlevler de sergiler. HSP'ler şaperon rollerine ek olarak apoptotik kaskadı inhibe ederek hücre sağ kalımını artırır (5). Isı şoku proteinleri serebral iskemi, nörodejeneratif süreçlerde, epilepsi ve travma gibi çeşitli patolojik durumlarda indüklenebilmektedir (6). HSP'lerin eksozomlar aracılığıyla salındığı bilinmektedir (7). Hücrelerdeki hayati rolleri nedeniyle HSP70 ve HSP90 otoimmün, romatizmal hastalıklar ve onkolojik araştırmalarda sıklıkla yer almaktadır.

HSPA8 ve HSPA1A, HSP70 ailesinin sırasıyla konstitütif ve indüklenebilen forma sahip üyeleridir (8). HSP90'ın sitoplazmik üyeleri, indüklenebilen form HSP90AA2 ve konstitütif form HSP90AB1'yi içerir (9). Toll benzeri Reseptör (TLR) ailesi, lenfosit aktivasyonundan sorumludur ve aynı zamanda otojen bileşenlere yanıtları da düzenler. TLR2 ve TLR4, muhtemel MS patogenezinde rol oynamaktadır (10). HSPA1A, HSP90AA1 TLR2 ve TLR4 tarafından tanınabilir. TLR2 ve TLR4'ün aktivasyonu, MSS otoimmünitesi ve nörodejeneratif hastalıklardan sorumlu çeşitli sitokinlerin sentezini uyarır (11). HSPA1A, proinflamatuvar yanıtı hafifleten nükleer faktör-kappa b (NF-kB) inhibisyonundan sorumludur. NF-kB, MS patogeneziyle ilgili çeşitli sitokinlerin transkripsiyonundan sorumludur (12). MS patogenezinde HSP70 ve HSP90'nın oto-inflamatuvar yanıtı katkıda

bulunabileceği bir diğer taraftan da şaperon aktiviteleri başta olmak üzere otoimmün sitokinlerin salınımını regüle ederek nöroprotektif özellikler de gösterebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı, RRMS'te hastalığın inflamasyonun en yoğun olduğu atak döneminde serum HSPA8, HSPA1A, HSP90AB1, HSP90AA2 seviyelerini ELISA yöntemi belirlemek, remisyon dönemindeki hastalar ve sağlıklı kontrollerle kıyaslamaktır. Çalışmanın diğer basamağında ise atak dönemindeki hastalar ve sağlıklı kontrol grubunun total kan RNA'larında RT-PCR yöntemiyle ısı şok proteinlerin sentezinden sorumlu olan TRAP, HSP90AB1, HSP90AB4P, HSPB1, HSPA7, HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HSPA8, HSPAA2, HSPB5 genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek ve HSPA8, HSPA1A, HSP90AB1, HSP90AA2 serum protein seviyeleri ile paralellik gösterip göstermediğini saptayarak, hastalığın çeşitli evrelerinde immün patogenezdaki rolünü anlayabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MULTİPL SKLEROZ

Multipl skleroz, merkezi sinir sisteminin hem inflamatuvar hem de nörodejeneratif bileşenlere sahip otoimmün demiyelinizan bir hastalıdır. Genç yetişkinlerde travmatik olmayan dizabiliteye yol açan en sık nörolojik durumdur (13).

MS santral sinir sisteminde ak madde traktusları ön planda olmak üzere, korteks ve derin gri cevheri de etkileyebilen fokal demiyelizan plaklarla karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Demiyelinizasyonun yanı sıra gelişen aksonal dejenerasyonun MS'te ortaya çıkan geri dönüşümsüz nörolojik engelliliğinin temel nedeni olduğu artık bilinmektedir (14, 15). MS heterojen bir yapıya sahiptir. Bu heterojenlik hastalığın başlangıç yaşını, ilk ortaya çıkış şeklini, nükslerin sıklığını, şiddetini ve sekellerini, ilerleme derecesini ve zaman içerisindeki kümülatif engelliliği içerir (16).

2.1.1. Tarihçe

MS hastalığına dair yazılı tarihsel kaynaklar MS tarihçesinin büyük olasılıkla 14. yüzyıla kadar uzandığını göstermektedir. Kaynaklara göre ilk olası MS hastası 16 yaşındaki St. Lidwina'dır (17). Bundan sonraki bilinen bir diğer hasta 19. yüzyılda İngiltere Kralı III. George'un torunu olan Sir Augustus d'Este'dir. (18).

MS lezyonların patolojik çizimleri ile ilk kez Jean Cruveilhier tarafından 1835 yılında yayınlandığı kaydedilmiştir (19, 20). Freidrich Theodore von Frerichs, 1849'da yayınlanan 'Ueber Hirnsklerose' adlı makalesinde, skleroz durumuna ilk sistematik yaklaşımı ortaya koymuştur (21). Jean-Martin Charcot, MS'in klinik belirtilerinin ve patolojik özelliklerinin ayrıntılı bir tanımını yapmıştır. 1868'de bu hastalığa 'Sclérose en plaques' adını vermiştir (22). Dr. Louis Ranvier 1878 yılında sinir hücrelerini koruyan, destekleyen ve MS'te temel antijenik hedeflerden biri olan miyeline işaret etmiştir (23). Thomas Rivers deneysel alerjik ensefalomyelit (EAE) ilk kez tanımlamıştır (24-26). Dr. Elvin Kabat, 1940 yılında MS hastalarının beyin omurilik sıvısı (BOS)'larında gama globülin oranında artış olduğunu saptamıştır (27). IgG indeksinin temelini 1950 yılların sonlarında Frick ve Scheid-Seydel oluşturmuştur (28). MS tanısında tarihsel süreçte görüntüleme yöntemlerinden ilk kullanılan

bilgisayarlı beyin tomografi (BT)'dir (29). 1980'de ilk defa bir MS hastasında Young ve arkadaşları tarafından manyetik rezonans (MR) görüntülemesi yapılmıştır. 1986 yılında da ilk kez MR için özel kontrast ajanı olan gadopentetate dimeglumine (Gd) kullanılmıştır (30, 31).

2.1.2. Epidemiyoloji

Tüm Dünyada MS'un yaklaşık üç milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir (32). Ancak Hindistan ve Çin de dahil olmak üzere büyük popülasyonlardan elde edilen verilerin göreceli eksikliği göz önüne alındığında bunun düşük bir tahmin olması muhtemeldir (33).

MS genellikle bireylerin çoğunda yaşamın en aktif ve üretken döneminde teşhis edilir (34). Okul öncesi çocuklar arasında MS prevalansı erkek ve kadınlarda benzerdir. Ergenlik döneminde sıklık kadınlarda erkeklerden daha fazla artar. Bu durum, cinsiyet oranının kadınlar lehine 2:1 olduğu yaşamın yedinci dekata kadar devam eder (35). MS'in yıllar içerisinde prevalansında artış görülmüştür (36).

MS başlangıç yaşına yönelik yapılan araştırmalarda hastalığın ortalama başlangıç yaşı İtalya'da 28.3, Kanada'da 30.6, Fransa'da 31, ABD'de 31.2 olarak saptanmıştır (37). Avrupa ve Avustralya'dan 28 epidemiyolojik çalışmada MS insidansındaki kadın-erkek oranı zaman içinde artarak 2000'de 2:3'e yükseldiği görülmüştür (38,39). Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişkin MS'in 2017 yılında tahmin edilen prevalans 362/100.000'dir (36). 1980-2008 yılları arasında Girit'te yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında, kadınlarda MS insidansındaki artışın, nüfusun kırsaldan kentsel alanlara kaymasıyla çevresel faktörlerin etkisi ile eşzamanlı olduğunu kaydetmiştir (40).

Ülkemizde ise farklı zamanlarda yapılan prevelans çalışmalarında; Sivas'ta MS prevalansı 288/100.000 (39), Orta Karadeniz Bölgesi'nde 43,2/100.000 (41), Kars ilinde 69/100.000 (42, 43), İstanbul'da 101,4/100.000 olarak bulunmuştur (44). MS insidansı son elli yılda beyaz nüfusta nispeten sabit kalmış veya hafif bir artış göstermiştir (35). Hastalık prognozu siyah ırkta ve asya ırkında beyaz ırka göre daha ağır seyretmektedir (33, 45). Sağlık hizmeti organizasyonundaki değişiklikler MS tanısı konma olasılığını da etkilemiş olabilir (33, 46).

2.1.3. Risk faktörleri

2.1.3.1. Genetik risk faktörleri

MS, güçlü bir genetik altyapıya sahip demiyelinizan ve nörodejeneratif bir hastalıktır. MS gelişiminde genetik olarak yatkınlığın var olduğu ve birincil yatkınlık alelinin insan lökosit antijeni (HLA) Sınıf II geni olduğu 50 yılı aşkın bir süredir

bilinmektedir. MS üzerine süre gelen araştırmalar, 200'den fazla HLA dışı tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve bir koruyucu HLA aleli tanımlamıştır. şimdiye kadar tanımlanan SNP'lerin tümü normal gen varyantlarıdır yani hastalık genleri değildir. Kalıtım riskinin yaklaşık %20'si yaygın genetik varyantlara atfedilebilir (47).

Çeşitli HLA Sınıf II ve I alelleri MS gelişimine katkıda bulunurken, bunlardan en önemlisi HLA-DRB15:01 haplotipinin taşınmasıdır. Th1 lenfositlerinin oto-proliferasyonunun HLA-DR15 pozitif bireylerde arttığı ve HLA'ya bağlantılı bir şekilde bellek B hücrelerinin aracılık ettiği görölmektedir. DRB15:01 geni epigenetik olarak düzenlenerek antijen sunumunun artmasına yol açmaktadır (47). HLA-DRB1-15:01 pozitifliği MS hastalarında erken başlangıç ve derin gri madde atrofisi ile ilişkili bulunmuştur. İkinci en güçlü MS gen varyantı, koruyucu olan HLA-A02'dir (48).

RRMS ve primer progresif MS'te, MSS'de CD4⁺ T hücrelerine ait HLA-DRB1'de metilasyon değişiklikleri bildirilmiş olsa da nedensellik ilişkisi net değildir. Bilinen gen varyantları MS genetik yatkınlığının yalnızca %48'ini açıklamaktadır (47). Bir araştırmada İnterlökin-7 reseptör a zincirini kodlayan gendeki bir polimorfizm MS için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (49).

Yapılan çalışmalarda mikro RNA'ların (miRNA'lar) ekspresyon seviyelerinin bireylerde bağışıklık yanıtını değiştirebileceği ve sonuçta hastalığın başlangıcına katkıda bulunabilecek bir faktör olabileceği söylenmektedir (50, 51).

Mendelian randomizasyon analizi ile yapılan bir çalışmada plazmada, FCRL3, TYMP ve AHSG gen ekspresyon seviyelerindeki artışın koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (52). MS'te yeterli güce sahip olan tek genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) Uluslararası Multipl Skleroz Genetiği Konsorsiyumu'na aittir. Çalışmada MS riskiyle ilişkili bir nadir ve dört düşük frekanslı protein kodlayan alel tespit edilmiştir; GALC, NLRP8, TYK2, PRF1 ve HDAC7 beklendiği gibi, bu varyantlar düşük düzeyde etkilidir (53).

2.1.3.2. Çevresel risk faktörleri

2.1.3.2.1. Epstein-Barr virüsü

Mikrobiyal ajanlardan MS'i tetikleme veya mevcut hastalığı şiddetlendirme noktasında en dikkat çeken ajanlar virüslerdir. Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu toplumda yaygın görölür ve genellikle asemptomatik olduğu çocukluk döneminde ortaya çıkar. Enfeksiyon ergenlik döneminde veya daha sonra ortaya çıkarsa, lenfoproliferatif bir

hastalık olan enfeksiyöz mononükleoza neden olur. EBV tükürük yoluyla bulaşır, insan B hücrelerinde ömür boyu süren latent bir enfeksiyon oluşturur (54).

EBV; MS ile en güçlü, en tutarlı ve biyolojik olarak olası ilişkiye sahip patojen olarak tanımlanmıştır. Genel yetişkin popülasyonundaki %90-95 seropozitiflik ile karşılaştırıldığında, MS'li geniş yetişkin kohortlarında tam EBV seropozitifliği ve EBV'ye karşı daha yüksek antikor konsantrasyonları saptanmıştır (55). 2022 yılında yapılan bir seroepidemiolojik çalışmada, ABD ordusundaki 10 milyondan fazla kişi, 20 yıldan fazla bir süre boyunca MS tanısı alan kişileri belirlemek için takip edilmiştir. EBV seropozitif olan bireylerin MS geliştirme riskinin, seronegatif kalanlara kıyasla 32 kat artmış olduğu saptanmıştır (56).

HLA alelleri ve EBV enfeksiyonu arasındaki etkileşim; HLA-DRB1*15:01 taşıyıcılarında artmış olan MS gelişme riskinin, yüksek EBNA1 IgG konsantrasyonları, enfeksiyöz mononükleoz öyküsü varlığında ve sınıf 1 alel HLA-A*02'nin yokluğunda daha çarpıcı bir şekilde arttığını gösteren çalışmalarla desteklenmektedir (57).

2.1.3.2.2. Coğrafi enlem ve doğum yeri

MS'in küresel olarak yaygınlığı ile enlem arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. İstisnalar olsa da MS'in küresel dağılımı genellikle ekvatorдан uzaklaştıkça artmaktadır (33, 35). Bu coğrafi farklılığın nedenleri arasında ultraviyole B (UVB) radyasyonuna maruz kalma süresi ve D vitamini yer almaktadır. UVB maruziyeti MS riskini D vitamininden bağımsız olarak da etkileyebilir (36).

Göç çalışmaları ile ilgili ortak görüş, yüksek riskli bölgelerden düşük riskli bölgelere göçün 15 yaşın altındakiler için genel MS riskini azalttığı, ancak düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgelere göçün prevalans üzerinde daha az belirleyici bir etkiye sahip olduğu yönündedir. 15 yaşından sonra göç edenlerde, doğdukları ülkeye yakın bir MS sıklığı izlenir (58). Nielsen ve arkadaşlarının yaptığı kapsamlı araştırma kişinin genetik yapısından ziyade yaşamın erken döneminde çevresel faktörlerin birincil etiyolojik ajan olduğu sonucuna götürmektedir (59).

2.1.3.2.3. Güneş ve D vitamini

T ve B lenfositler, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, mikroglia, astrositler ve nöronlar dahil olmak üzere MS'te önemli olan çok sayıda hücre tipi 25(OH)D'yi aktif form olan kalsitriole dönüştürebilir. Aktif MS lezyonlarında kalsitriol ilişkili enzimlerin ve vitamin D reseptörünün (VDR)'nin yukarı regülasyonu gösterilmiştir. (60, 61).Deneyisel

alışmalar D vitamininin güçlü immünmodülatör etkileri olduğunu göstermiştir. MSS'de nöron ve miyelin koruyucu ve miyelin rejenerasyonu üzerinde etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir (61-63).

MS gelişiminde risk faktörü olan HLADRB1-15:01 lokusunun transkripsiyonu D vitamini tarafından düzenlenmektedir. 5 yıllık bir MS kohort alışması, D vitamininin klinik sonuçlarının HLADRB1-15:01 negatif olanlarda güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir (64). D vitamini ve ilişkili reseptörleri, MS patogeneze katkıda bulunmak için EBV nükleer antijenleri ile etkileşime girebilir (63). MS'te D vitamini takviyesinin etkilerini daha fazla araştırmak için, hastalarda D₃ vitamini takviyeleri kullanılarak 100 nmol/l kan düzeyine ulaşılması ve KİS, genç MS hastaları başta olmak üzere seçilmiş hasta gruplarıyla daha büyük klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir (65, 66).

2.1.3.2.4. Diğer faktörler

Sigara kullanımı, MS riskini arttırmasının yanı sıra KİS'den MS'e dönüşüm ve hastalığın sekonder progresif forma geçişi ile ilişkilendirilmiştir. Sigara dumanına maruz kalınması da artmış MS riski ile ilişkilendirilmiştir, bunun bir nedeni sigaradan kaynaklanan akciğer enflamasyonu olabileceği düşünülmektedir (36). Tütün içeriğindeki maddelerin kan beyin bariyeri bütünlüğünün bozulmasına katkıda bulunarak beyin atrofisinin daha hızlı ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir (67).

Ergenlik ve çocukluk döneminde obezite hem pediatrik hem de yetişkin başlangıçlı MS riskinde artışla ilişkilendirilmiştir. (36, 68). Hava kirliliğine maruz kalma kan beyin bariyerinin disfonksiyonuna ve nöronal enflamasyona sebep olabilmektedir. Kurşun, sülfür ve karbon monoksit maruziyeti ile pediatrik MS gelişimi arasında ilişki saptanmıştır (69).

2.1.4. İmmün patogeneze

MS'de yoğun araştırmalara rağmen, MS'te inflamatuvar demiyelinizasyonu tetikleyen altta yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır (70). EAE modeli MS'in temel histopatolojik özelliklerini anlamamızı sağlayan ve MSS'de otoimmün inflamasyonu ve demiyelinizasyonu simüle etmek için yıllardır çalışmalarda kullllanılan bir yöntemdir. MS'e benzer şekilde, EAE de heterojendir ve seçilen otoantijen, tür ve genetik arka plandan etkilenir (71).

Otoimmün hastalığın patogenezi temel olarak kendi proteinlerine karşı immün tolerans kaybı ile açıklanmaktadır (72). MS'in genetik olarak duyarlı bireylerde MSS'in antijenlerine karşı otoimmün bir yanıtta kaynaklandığı dşnlmekte ve otoreaktif T hücrelerinin hastalığı başlatan bağışıklık hücreleri olduğu varsayılmaktadır. Günümüzde B

hücreleri, hastalık patolojisinde önemli bağışıklık hücreleri olarak kabul edilmiştir. Otoreaktif hücrelerin kan beyin bariyerini geçmesi sonucu uzun süreli veya dönemsel olarak enflamasyon ve dejeneratif değişikliklerin oluşması ile hastalığın ilerleyici doğasına geçişi hızlandıran bu duruma kompartmanize enflamasyon adı verilmektedir (70, 71).

Postmortem yapılan patoloji çalışmalarında aktif plaklarda erken dönemde oligodentrosit ve aksonal hasar gözlenmiştir. Hastalığın erken döneminde IgG pozitif plazma hücrelerinin bulunmadığı, perivasküler boşluklarda ve parankimde az sayıda lenfositin mevcut olduğu büyük MS lezyonlarının varlığı dikkati çekmiştir. Bu durum beyinde meydana gelen oligodentrosit ve aksonal hasarlanmanın sonrasında periferik otoimmün sürecin tetiklenebileceği fikrini doğurmuştur. 'İçeriden-dışarıya' hipotezi; periferik inflamatuvar sürecin yokluğunda oligodendrositlerin ve miyelin kaybının MSS antijenlerinin salınmasına yol açtığını iddia etmektedir (70, 73).

MS patogenezinde miyelin proteinlerine karşı oto-agresyonun aktivasyonuna dayandığına dair veriler mevcuttur. Bu proteinler başlıca; Miyelin Bazik Protein (MBP), Miyelinle İlişkili Glikoprotein (MAG) ve proteolipid protein gibi proteinlerden oluşur. Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini (MOG) da bu proteinlerden biridir. Bunlar arasında MBP en immünojenik olandır. MS hastalarının kan ve BOS'unda MOG-reaktif T hücrelerinin sayısında artış bildirilmiştir (72).

2.1.4.1. T hücreler

T hücreler edinsel immünitinin temel yapıtaşını oluşturan hücre grubudur. Yardımcı CD4⁺ ve efekör CD8⁺ T hücreler proinflamatuvar T hücrelerin başında gelmektedir. Hastalar ve EAE modellerinde yapılan çalışmaların sonuçları atak sırasında meydana gelen hasarın fazla aktivasyon gösteren ve kontrol mekanizmalarının bozulduğu proinflamatuvar T hücrelerinden (CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler) kaynaklandığını göstermiştir (74).

Aktif MS lezyonlarında miyelin ve diğer antijenlere reaktif CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreler tespit edilmiştir (47). MS plaklarında CD4⁺ lenfositlerden ziyade CD8⁺ T hücreleri daha karakteristik bulunmuştur. CD8⁺ T hücreleri, MS hastalarının ve EAE'li farelerin MSS beyin lezyonlarında bulunan birincil lenfositlerdir (72).

CD4⁺ T lenfositleri MS'te otoimmün yanıtın başlatılması ve sürdürülmesinde kilit rol oynamaktadır. CD8⁺ T hücrelerinin ise miyelin hasarı ve inflamasyonun sürdürülmesindeki temel rolü gösterilmiştir (72). CD4⁺ T lenfositlerin içinde özellikle Th1 ve Th17 alt grupları MS patofizyolojisinde önemli rol oynar (75).

Th1 hücreleri tarafından salgılanan IFN-g ve TNF-b gibi sitokinlerin makrofajları aktive ederek oligodendrositlere zarar verebileceği genel olarak kabul edilmektedir. IFN-g

tarafından indüklenen CD8⁺ Treg'ler, CD4⁺T lenfosit sayılarını azaltabilir ve lokal hücreler tarafından TGF-beta salgılanmasını indükleyebilir. Çalışmalar Th1 ve/veya Th17 hücrelerini inhibe etmenin ve dolaşımdaki Treg sayısını artırmanın MS'in ilerlemesini baskılayabileceğini göstermiştir (72, 76). MS'teki Treg'lerin kararsız bir fenotipe sahip olabileceği ve immüno-regülatör işlevi sürdürmeye devam edemediklerini göstermektedir (72).

Th9 ürünü olan IL-9'un MS'te anti inflamatuvar etkiye sahip olabileceğini söylenmektedir. Patojenik olmayan Th17'lerin de IL-9 ürettiği gösterilmiştir (72, 76). Başka bir çalışmada, MS'te Th1, Th17 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) salgılayan efektör T hücrelerinin yüksek sıklıkta gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu hücreler birlikte, miyelin üreten oligodendrositlerin kaybına neden olabilir, miyelin kılıfa doğrudan zarar verebilir ve MSS'de lezyonlar oluşturabilir (77).

2.1.4.2. B hücreler

B hücreleri MS patolojisine birden fazla mekanizmalar yoluyla katkıda bulunur. BOS'da B hücreleri tarafından üretilen immünglobulin G (IgG)'ye sekonder gelişen oligoklonal bantlar (OKB) MS'in klasik bir özelliğidir, ancak bu antikorların hastalık patolojisine net katkısı hala tartışılmaktadır. Meningeal ektopik foliküllerdeki B hücrelerinin birikimi MS'teki kortikal patoloji ile bağlantılıdır. Bu kortikal patolojiler muhtemel B hücresi tarafından üretilen GM-CSF, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-15 ve diğer faktörlerin desteklediği inflamasyon ve nörotoksiteden kaynaklanmaktadır. Th17 hücrelerin de meninkslerdeki CD19/20⁺ B hücre agregatlarından oluşan tersiyer lenfoid doku oluşumunda rolü olduğu ortaya konulmuştur (47, 78).

Meninkslerdeki tersiyer foliküller BOS'ta saptanan sitokin ve kemokinlerin de kaynağıdır. Kortikal lezyonların yoğunluğu, BOS nörofilaman hafif zincir (NFL) miktarı ile bu lenfoid agregatlarının sayısı arasında doğru orantı olduğu saptanmıştır. Meningeal inflamasyon ve subpial kortikal hasarın birlikte yüksek seviyelerde olması hastalığın şiddetli ve hızlı ilerlemesiyle ilişkilidir (79, 80). Geçtiğimiz on yılda, MS'li bireylerden alınan beyin dokusundaki B hücrelerde EBV proteinlerinin varlığı tüm çalışmalarda doğrulanamamıştır (80).

2.1.4.3. Astrosit ve monositler

Astrositler proinflamatuvar görevlerinin yanı sıra çeşitli nörotrofik mediatörler ile MSS de destek ve doku tamiri görevlerine de sahiptir. Postmortem MS hastalarında yapılan bir çalışmada, hasarlanan miyelin fragmanlarının astrositler tarafından reseptör aracılı endositoz yoluyla alındığını ve bunun astroglial NF-kB aktivasyonu ve kemokin

salgılanmasıyla sonuçlandığı saptanmıştır (81). Hızla gelişen MS lezyonlarda T hücrelerinin infiltrasyonundan ziyade, çok sayıda miyeloid ilişkili protein 14 (MRP-14) pozitif monositlerden oluştuğu saptanmıştır. MRP14 pozitif monositlerin ve makrofajların, kemokin reseptörlerinden CCR1 ve CCR5'i eksprese eden dolaşımdaki monosit havuzundan lezyon perivasküler alanına toplandığına dair kanıtlar bulunmuştur (73).

2.1.5. Klinik prezantasyon

Semptomatik nüks, belirgin, akut veya subakut genellikle fokal, bazen multifokal ve nadiren yaygın, MSS sendromunu ifade eder. Bununla birlikte, bir hasta semptomlar olmaksızın yeni MR lezyonları ile subklinik aktiviteyle başvurabilir, bu da asemptomatik nüks olarak adlandırılır (82,83). Remisyon, miyelin ve aksonal bütünlüğün bir miktar restorasyonu ile iyileşme fazını ifade eder. Nüks sonrası maksimum klinik iyileşme genellikle ilk 3 ay içinde gerçekleşir, nadiren de olsa 6 aydan sonra da devam edebilir (83). 2013 tanı kriterlerinde MS klinik seyir tipleri KİS, RRMS ve progresif MS olmak üzere üç ana tipte tanımlanmıştır (84).

2.1.5.1. Radyolojik izole sendrom

MS için tipik olmayan semptomlarla başvuran ve klinik bulgu bulunmayan hasta grubunda; görüntüleme sonrasında lezyon morfolojisi, konumu itibarıyla inflamatuvar demiyelinizasyonu düşündüren MR kriterlerini karşılanması ile radyolojik izole sendrom tanısı konur. RİS, MS fenotipi olarak kabul edilmemektedir (83). RİS hastalarının 10 yıllık takip verilerinde klinik aşikâr MS'e dönüşüm oranı %51,2 saptanmıştır (85).

2.1.5.2. Klinik izole sendrom

MS hastalarının yaklaşık %85'inde MS başlangıcı bir relapsla birlikte görülür (86). KİS, geçmişinde bilinen demiyelinizasyon düşündürecek klinik veya radyolojik bulgusu olmayan bir hastada tanımlanır (87-89). KİS Revize McDonald 2017 kriterlerindeki tanımlamaya göre; MSS'de en az 24 saat süren akut-subakut gelişimli fokal veya multifokal inflamatuvar demiyelinizan olayı yansıtan semptomlar ve objektif bulgular içeren monofazik bir klinik epizod olmalıdır. Bu epizod süresince ateş veya enfeksiyon bulunmamalıdır. Bu epizod tipik bir MS nüksünü andırır ancak klinik ve radyolojik olarak geçmişinde daha önce demiyelinizan bir olayı olmayan bir hastada görülmelidir (88).

2.1.5.3. Relapsing remitting multipl skleroz

Relapsing-remitting MS formu MS'in en sık görülen fenotipidir (90). RRMS fenotipi, MSS'nin farklı bölümlerini etkileyen, en az birer ay arayla tanımlanmış, klinik

olarak farklı birden fazla olayın varlığını gerektirir. RRMS, klinik sessiz dönemleri takip eden atakları ve atak sonrası tam ya da sekelle iyileşmeyi temsil eder (88). Lublin kriterlerine göre aktif veya aktif olmayan RRMS olarak kategorize edilebilir (91). KİS olan bir hastada MR ile mekân ve zamanda yayılımın gösterilmesi için 2017 McDonald kriterleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir (88).

Tablo 2.1. 2017 McDonald kriterlerine göre mekân ve zamanda yayılım kriterleri.

- Mekânda yayılım, MSS'nin dört bölgesinden iki veya daha fazlasında multipl sklerozun karakteristiği olan bir veya daha fazla T2-hiperintens lezyon* ile gösterilebilir: periventriküler, kortikal veya jukstakortikal, infratentoryal beyin bölgeleri ve spinal kord
- Zamanda yayılım: Başlangıç MR'nın zamanlamasına bakılmaksızın, herhangi bir zamanda kontrastlanan ve kontrastlanmayan lezyonların eş zamanlı varlığı veya hastanın takip MR'ında yeni bir T2-hiperintens ya da kontrast tutan lezyon ile gösterilebilir
*2010 McDonald kriterlerinden farklı olarak, semptomatik ve asemptomatik MRG lezyonları arasında ayırım yapılması gerekmemektedir.

2.1.5.4. Sekonder progresif multipl skleroz

SPMS tanısı ilerleyici seyir sırasında akut alevlenmeler olsun ya da olmasın, başlangıçta nükseden bir hastalık evresinden sonra kademeli olarak kötüleşme öyküsü ile geriye dönük olarak konur (92, 93). SPMS'nin standartlaştırılmış objektif bir tanımı olmasa da tipik olarak ilk relaps-remitting seyri takiben ≥ 6 ay boyunca relapslardan bağımsız kötüleşme olarak tanımlanmıştır (94). Lublin kriterlerine göre aktif ve aktif olmayan; progresif veya progresif olmayan şeklinde kategorize edilebilir (91).

2.1.5.5. Primer progresif multipl skleroz

PPMS, klinik olarak başlangıçtan itibaren hastalığın seyri boyunca belirgin nüksler olmaksızın, geçici kısa süren iyileşmeler ve plato dönemleri ile karakterize ilerleyici bir hastalık seyri olarak tanımlanmıştır (93, 95). Bu kademeli kötüleşme MS'te hastalığın başlangıcından bu yana %10 ile %15 oranında gözlenmektedir (92, 96). Kadın erkek cinsiyet arası etkilenim eşit görülmektedir (92). Lublin kriterlerine göre aktif ve aktif olmayan; progresif veya progresif olmayan şeklinde kategorize edilebilir (91). PPMS tanısı için 2017 McDonald kriterlerinde PPMS tanısı için gerekli kriterler yayınlanmıştır (88).

2.1.6. Multipl skleroz tanı kriterleri

Güncel olarak MS tanısında 2017 revize McDonald kriterleri kullanılmaktadır. Tablo 2.3.'te bu kriterler özetlenmiştir (88).

Tablo 2.2. 2017 Gözden geçirilmiş McDonald kriterleri.

Atak	Objektif klinik bulgulu lezyon sayısı	MS tanısı için gerekli ek veri
≥2 atak	≥2	Yok
≥2 atak	1 ve öyküde başka bir alandaki lezyona ait atak	Yok
>2 atak	1	MSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ile mekânda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥2	Ek bir klinik atak veya MRG ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS'da OKB varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	MRG ile zamanda ve mekânda yayılımın gösterilmesi veya BOS OKB varlığı veya ek bir klinik atak
Progresif seyir	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin ikisi • MS tipik (periventriküler, kortikal jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda >1 lezyon • Medulla spinaliste ≥2 lezyon • BOS OKB varlığı

2.1.7. Tanı yöntemleri

2.1.7.1. Uyarılmış potansiyeller

MR'ın geliştirilmesinden önce, uyarılmış potansiyeller (UP) olası MS açısından değerlendirilen hastalarda ikinci bir hastalık bölgesini tanımlamak için kullanılıyordu (97). Temelde bir duyu organına periferden verilen uyarının MSS de oluşturduğu elektriksel aktivitenin ölçülmesi prensibine dayanır ve pik latansında uzamanın demiyelinizasyon delili olduğu kabul edilmektedir (98). UP'ler arasında en hassas olanı görsel uyandırılmış potansiyeldir. En hassas ikinci UP somatosensoryel uyarılmış potansiyeldir ve bunu beyinsapı işitsel uyandırılmış potansiyeli takip eder (97).

2.1.7.2. Beyin omurilik sıvısı

Oligoklonal bantlar, beyin omurilik sıvısı ve parankimal B lenfositleri tarafından üretilen immünoglobulinlerdir. OKB paterni her birey için karakteristiktir ve uzun bir süre boyunca değişmeden kalma eğilimindedir (99). İntratekal antikor sentezinin kanıtı, MS için spesifik olmasa da tanıyı destekler. MS için atipik BOS bulguları (>100 mg/dL yüksek protein konsantrasyonu, mm³ başına >50 hücre ile pleositoz, nötrofil, eozinofil veya atipik hücrelerin varlığı) diğer hastalıkları düşündürür (88).

IgG indeksi, BOS ve serum IgG düzeylerinin oranının, BOS ve serumdaki albumin düzeyi oranına bölünmesi ile elde edilir ve 0,60 üzeri genelde pozitif kabul edilir. OKB tayini için BOS ve serum eşzamanlı kalitatif değerlendirilir. BOS'ta OKB'nin pozitif, serumda negatif olması (patern 2), ya da BOS'da serumdan daha fazla band gözlenmesi (patern 3) MSS'de immünolojik aktivasyonun olduğunu gösterir (100). MS dışında, BOS OKB varlığının olduğu hastalıklar da mevcuttur. MS hastalarının %60'ında yüksek IgG

bulunurken %95'inde OKB pozitif olduğu unutulmamalıdır. BOS protein seviyesi genellikle normal sınırlardadır, bazı hastalarda hafif yüksek (50-70 mg/dl) saptanabilir. BOS glukoz seviyesi ise normal sınırlarda beklenir (101).

2.1.7.3. Optik kohorans tomografi

Optik Koherens Tomografi (OKT), yüksek sensitiviteye sahip, bir cihazdır. Retina sinir lifi tabakası kalınlığındaki değişiklikler miyelin kaybı gibi optik sinirin akson yapısındaki değişiklikleri de yansıtır. Aksonal dejenerasyon sebebiyle gelişen optik sinirdeki retrobulber harabiyet, optik sinirde solukluk ve retina sinir lifi tabakası defekti olarak tespit edilir (102). OKT, farklı retina katmanlarını doğru bir şekilde ölçerek MSS nörodejeneratif süreçlerine bir pencere sağlayan, ucuz, invazif olmayan, yüksek çözünürlüklü bir görüntüleme tekniği olarak ortaya çıkmıştır (103).

2.1.7.4. Manyetik rezonans görüntüleme

Revize McDonald 2017 kriterlerinde kullanmakta olduğumuz zamanda ve mekânda yayılım kriterleri MR ile karşılanır. 'Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis' (MAGNIMS) 2021 revizyonunda MS hastalarında MR çekim protokolü ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (104). MS'de bir lezyon, T2 veya proton yoğunluğu ağırlıklı sekansta fokal hiperintensite alanı olarak tanımlanır. Tipik MS lezyonları yuvarlak ila oval şekildedir ve çapları en az 3 mm olmak üzere 1-2 cm arasında değişir. Periventriküler lezyonlar, Aksiyel düzlemde ovoid bir şekle sahiptirler ve genellikle 'Dawson'ın parmakları' olarak tanımlanırlar (105).

Bir jukstakortikal lezyon, kortekse bitişik olan T2-hiperintens ak madde lezyonu olarak tanımlanır. MS'de jukstakortikal lezyonlar tipik olarak U liflerini içerir (105). Korteks içinde yer alan veya korteksin içinde olup subkortikal beyaz maddeye uzanan lezyonlar ise kortikal lezyon olarak adlandırılır (106). İnfratentöriyal lezyon tanımı; serebellar hemisferler, serebellar pedinkül, beyin sapında yerleşmiş olan T2 hiperintens lezyonları kapsar (105). Spinal lezyonlar en sık servikal kord yerleşimi gösterir. Daha çok dorsolateral spinal kolonlar tutulur ve genellikle iki vertebra segmentini aşmaz (107). MS'te optik sinir tutulumu tek taraflı kısa segment, kontrast tutulumu gösteren T2 hiperintens lezyon şeklindedir (105, 108). MS demiyelinizan lezyonları akut dönemde difüzyon kısıtlayabilir (109). MS lezyonlarında kontrast tutumu başlangıçta homojen sonrasında halka formasyonunda izlenir (110). Plaklarda kalıcı demiyelinizasyon, nörodejenerasyon sonucu T1-hipointens lezyonlar izlenir, bunlar kara delik olarak bilinir (111). Korpus kallozum

MS'te yaygın olarak tutulan bir bölgedir. Subkallozal nokta çizgi işareti (dot-dash sign) ve subkallozal çizgiler izlenebilir (112).

3 Tesla ve üzeri incelemelerde demiyelinizan plakların ortasında venöz yapının izlenmesi santral venöz işaret (SVİ) olarak adlandırılır (113). Beyin ve spinal kord atrofisi hastalık progresyonunun en önemli belirleyicilerindendir. MS'de derin gri cevher atrofisi daha hızlı oluşur ve engelliliğin progresyonu ile yakın ilişkilidir (105, 114). Kronik aktif lezyonlar içten içe yanan veya yavaşça genişleyen lezyonlar olarak da bilinmektedir. 1.5 Tesla MR ile saptanması zor olan bu lezyonlar demir yüklü aktif mikrogliya veya makrofajların yol açtığı paramagnetik rim lezyon ile karakterizedir (115). MS'te bildirilen beyin atrofi oranlarının normal yaşlanma için beklenen oranların üzerinde olduğunu ve hastalarda hastalığın en erken evresinden itibaren gözlendiği saptanmıştır (116).

2.1.8. Multipl skleroz tanısında kırmızı bayraklar

MS tanısında başlıca kırmızı bayraklar: 16 yaş öncesi veya 50 yaşından sonra başlangıç, hiperakut başlangıç veya 4 haftadan sonra da devam eden progresif kötüleşme, ensefalopati, şiddetli baş ağrısı, ateş, meningismus, şiddetli pozisyonel vertigo inatçı hıçkırık, bulantı veya kusma arefleksi, bilateral eş zamanlı optik nörit, ciddi görme kaybı ve optik disk ödemi, geniş optik sinir lezyonları, bilateral veya kiazmal tutulum, optik sinir kılıfı genişlemesi (peri-nörit), negatif OKB sonucu, üç veya daha fazla vertebral segmenti içeren uzunlamasına yaygın T2-hiperintens lezyon, simit işareti, Bagel işareti, yaygın ön boynuz hücresi tutulumu, H işareti, kaviter görünümüler mikro ve makro kanama odakları, “Bright spotty sign”, konus medullaris tutulumu, spinal lezyonlarda halka, alev veya noktasal kontrastlanma paterni, T2 hiperintens lezyonlardaki kontrastlanmanın 3 aydan uzun sürmesi olarak sıralanabilir.

2.1.9. Ayırıcı tanı

MS tanısı konulmadan önce ayırıcı tanıların iyi bir şekilde değerlendirmesi, alternatif tanıları düşündüren klinik tablolara ve paraklinik kırmızı bayraklara dikkat edilmesi gerekmektedir (117, 118). MS ayırıcı tanısına diğer demiyelinizan hastalıklar (Tümefaktif MS, Marburg ve Schilder's varyantları ve Balo'nun konsantrik sklerozu) enfeksiyon (sifiliz, HIV, HTLV, toksoplazma, tüberküloz, nöroborrelioz, progresif multifokal lökoensefalopati) ve toksik durumlar, vasküler hadiseler (CADASIL, Lökodistrofiler, serebral hüçük damar hastalığı) genetik, granüloamatöz (nörosarkoidoz, CLIPPERS sendromu vb.) ve infiltratif hastalıklar girmektedir (117-120).

2.1.10. Engellilik takibinde kullanılan değerlendirme ölçeği

MS hastalarında engelliliğin değerlendirilmesi adına yaygın olarak kullanılan EDSS 1983 yılında Kurtzke tarafından yayınlanmıştır. 0 puan, normal nörolojik muayeneyi ve klinik bulgu olmamasını, 4.0-8.0 puanları arası ambulasyonu ifade eder. Piramidal, serebellar, beyin sapı, duyuşsal, görsel, bağırsak-mesane, mental ve diğer olmak üzere 7 işlevsel sistem değerlendirilir (121). Genişletilmiş engellilik durum ölçeği Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Genişletilmiş engellilik durum ölçeği.

EDSS	
Puanı	Klinik
0	Muayenede her şey normaldir
1	Özürlülük durumu yok, bir fonksiyonda bozukluğa dair minimal belirtiler
1.5	Özürlülük durumu yok, birden fazla fonksiyonda bozukluğa dair minimal belirtiler
2	Bir fonksiyonda minimal özürlülük
2.5	Bir fonksiyonda hafif özürlülük ya da iki fonksiyonda minimal özürlülük
3	Bir fonksiyonda orta derecede özürlülük ya da üç veya dört fonksiyonda hafif özürlülük. Yürümede problem yok
3.5	Bir fonksiyonda orta derece özürlülük ve diğer birkaç fonksiyonda hafif ya da minimal özürlülük. Yürümede problem yok.
4	Önemli seviyede özürlülük olsa da 500 metre yardım almadan yürünebilir.
4.5	Önemli seviyede özürlülük olsa da günün büyük bir bölümü ayakta geçirilir. Çalışırken yardıma ihtiyaç duyulabilir. 300 metre yardımsız yürünebilir.
5	Özürlülük günlük aktivitelerin önüne geçmektedir fakat 200 metre yardım almadan yürünebilir.
5.5	Özürlülük bütün günlük aktiviteleri engeller. 100 metre yardım almadan yürünebilir.
6	100 metre boyunca baston ve koltuk değneği olmadan, dinlenerek veya dinlenmeden yürünebilir.
6.5	İki yanlı destek yardımıyla 20 metre boyunca dinlenmeksizin yürünebilir.
7	Tekerlekli sandalye kullanımı zorunlu olsa da tüm gün aktif olunabilir. Yardım olmadan 5 metreden fazla yürünemez.
7.5	Sadece birkaç adım atılabilir, tekerlekli sandalye kullanımı zorunludur, tekerlekli sandalyeye binerken ve inerken yardım gerekebilir.
8	Tekerlekli sandalye ya da yatakta olmak zorunludur. Günün çoğunluğu yataktan dışarıda geçirilebilir. Kollar kullanılabilir.
8.5	Günün çoğunluğu yatakta geçirilir. Kollar bir ölçüye kadar kullanılabilir.
9	Sürekli olarak yatakta durulur. Konuşulabilir, yemek yenilebilir, yutkunulabilir.
9.5	Yatak zorunludur. Konuşulamaz, yemek yenilemez, yutkunulamaz.
10	MS sebebiyle ölüm

2.1.11. Multipl skleroz atak ve uzun dönem tedavi

Akut MS atağı; MS'e özgü semptom ve bulguların olduğu, MSS'deki fokal veya multifokal inflamatuvar demiyelinizan bir olayı yansıtan, en az 24 saat süren, ateş veya enfeksiyon yokluğunda gelişen monofazik bir klinik epizod olarak tanımlanır (88). Klinik nöksler multifokal veya dalgalı bir seyir gösterebilir, iki farklı atağı ayırt etmek için en az 30 günlük bir klinik stabilite veya iyileşme dönemi gereklidir (122).

Yüksek doz kortikosteroidlerin MS'in akut nökslerinin tedavisinde en etkili tedavi seçeneği olduğu düşünülmektedir intravenöz 3-7 gün boyunca günde 1000 mg, doz azaltılarak kademeli veya direk sonlandırılarak kullanılır (123, 124). Steroide cevap vermeyen MS ataklarında; plazma değişimi, güçlü klinik kanıtlarla desteklenen tek ikinci basamak seçenektir (125). MS'in uzun dönem tedavisi için kullanılan birinci basamak enjektabl tedaviler: İnterferon b-1a intramuskuler, interferon b-1a subkutan, interferon b-1b subkutan, pegylated-İnterferon b-1a subkutan, glatiremer asetatıdır. MS uzun dönem oral tedavilerinde ise teriflunomid, dimetilfumarat, fingolimod, kladribin yer almaktadır. Tedavide kullanılan monoklonal antikorlar arasında natalizumab, rituksimab, okrelizumab ve alemtuzumab bulunmaktadır (124, 125).

2.1.12. Multipl sklerozda biyobelirteçler

Otoimmün ve inflamatuvar her hastalıkta olduğu gibi MS'de de biyobelirteç araştırmaları devam etmektedir. En umut verici sonuçlar nörofilamen hafif zincir (NfL)'e aittir (126,127). Araştırılmaya devam eden diğer belirteçlerde; B Kemokin ligand 13 (CXCL13) (128, 129), Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP) (130), İntratekal sentezlenen IgM (131, 132), Osteopontin (133,134), CHI3L1 (135) ve Mikro RNA'lardan miR-155 (136) ve miR-145 (137,138) yer almaktadır.

2.2. ISI ŞOK PROTEİNLERİ:

İşı şok proteinleri, 1962 yılında Ritossa tarafından bir sinek cinsi olan *Drosophila*'da termal strese bir yanıt olarak keşfedilmiştir. Besin yokluğu, ışınlama, hipoksi, ağır metaller, oksidatif ve toksisite, enfeksiyonlar ve enflamatuvar sitokinlere maruz kalma gibi stres koşulları HSP ekspresyonuna neden olmaktadır (139).

Isı şoku proteinleri (HSP), tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan, filogenetik olarak iyi korunmuş bir protein grubudur. Bu proteinler 17 kDa ile 110 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilir. Başlıca HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP'ler (yaklaşık 15-30 kDa) olarak isimlendirilmektedir. Isı şoku kognatları (HSc), HSP'lerin yapısal olarak ifade edilen formlarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Öte yandan, HSP'lerin çoğu strese yanıt olarak indüklenir ve bu da onları önemli hastalık biyobelirteçleri haline getirir (140).

Fizyolojik koşullar altında HSP, yeni sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanmasına yardımcı olan moleküler şaperonlar olarak işlev görür. HSP protein agregasyonunun önlenmesinde, kararsız ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasında

ve proteinlerin hücresel kompartmanlar arasında taşınmasında önemli bir rol oynar. Stres koşulları altında, indüklenebilir HSP, hücresel homeostazı korumak ve hücrenin hayatta kalma fonksiyonlarını geliştirmek için ısı şoku faktörleri (HSF) tarafından modüle edilir (139). HSP'ler hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar yanıtlarda rol alır. HSP'lerin yalnızca konakçı bağışıklık modülasyonunda değil, aynı zamanda otoimmün koşulların gelişiminde de rol oynadıkları düşünülmektedir. Buna ek olarak, bazı HSP'ler antijen işleme ve sunumunda görevlidir (140).

Günümüzde tüm HSP'lerin hücre dışı ortama salındığı kabul edilmektedir. Başlangıçta HSP salınımının hücresel nekrozdan kaynaklandığı düşünülse de artık HSP'leri içeren multiveziküler cisimciklerin ekzozomlar aracılığıyla hücre dışına salındığı bilinmektedir. HSP70 izomerleri (HSPA1A ve HSPA8), HSP60 ve HSP90 izomerlerinin de doğrudan membran vezikülleri yoluyla salındığı gösterilmiştir (141).

2.2.1. Küçük ısı şok proteinleri

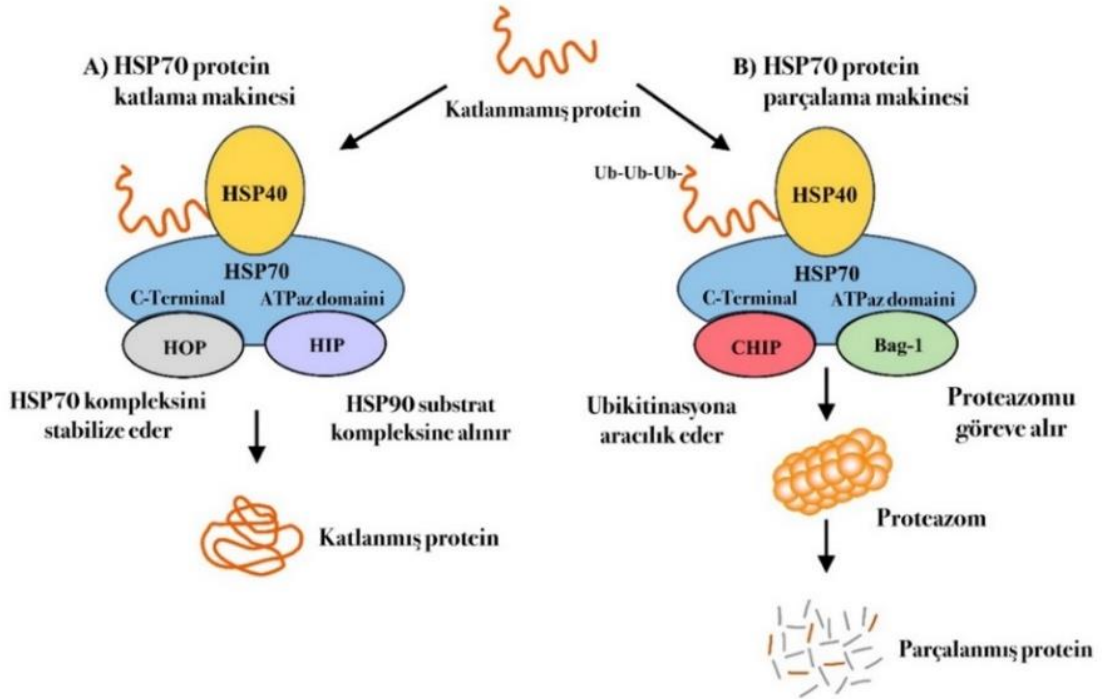
Küçük HSP'ler (HSPB) 12 ila 43 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptir. İnsanlarda 11 adet tanımlanmış HSPB bulunmaktadır. Bu ailedeki tüm proteinler, HSPB4 ve HSPB5'in birincil yapısındaki ilgili bölgeye homolog olan 90 rezidüden oluşan alfa-kristallin alanını içerir. Şaperon proteinler olarak HSPB'ler yanlış katlanmış proteinleri bağlar ve yüksek molekül ağırlıklı şaperonlara benzer şekilde bunların toplanmasını önler (141, 142).

HSPB'ler ATPaz aktivitesinden yoksun oldukları için proteini aktif olarak yeniden katlayamazlar. Büyük bir HSP yeniden katlamaya yardımcı olana kadar agregasyonu önlemek için yanlış katlanmış proteinleri hücre içinde tutarlar. Fizyolojik koşullar altında çoğu HSPB, alfa-kristallin alanları aracılığıyla çok alt birimli oligomerler oluşturur. HSPB1 insanda HSP27, HSPB2 ise MKBP (miyotonik distrofi protein kinaz bağlayıcı protein) olarak adlandırılır iken aA-kristallin ve aB-kristallin sırasıyla HSPB4 ve HSPB5 olarak adlandırılır. HSPB6, HSPB8, HSPB9 ve HSPB11'in alternatif isimleri sırasıyla HSP20, HSP22, CT51 ve HSP16.2'dir. HSPB1, HSPB4, HSPB5 ve HSPB8 ATP'den bağımsız şaperon aktivitesine sahiptir. HSPB4 ve HSPB5 alfa-kristalini temsil etmek için kullanılır. HSPB4 ve HSPB5, 3:1 oranında yapıya katılarak polidispers bir molekül olan alfa-kristallini oluşturur. Bu molekül nöroproteksiyon araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır (141, 142).

2.2.2. Isı şok proteini-70

HSP ailelerinden filogenetik olarak en korunmuş olan HSP70 ailesi, sitozolik ve nükleer konstitütif HSc70 (HSP73-HSPA8), strese bağlı HSP70 (HSP72-HSPA1A),

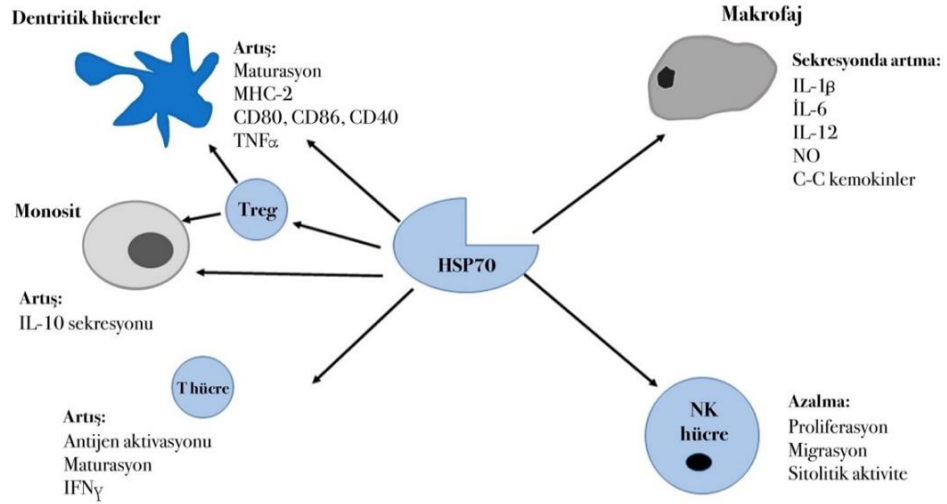
endoplazmik retikulum Bip (Grp78-HSPA5) ve mitokondriyal mt-HSP70 (Grp75-HSPA9) proteinini içerir. Hücre içi HSP70 bir şaperon proteini olarak sitoprotektif işlevler sergiler. Hücre dışı HSP70 immünolojik yanıtları ve stres durumlarında ise tolerans yanıtlarını tetikleyen immünomodülatör bir işlev sergiler (139). HSP70 ve HSP90'ın şaperon olarak, denatüre protein stabilitesini artırmak için koordineli bir şekilde çalışır. HSP70 ve eş şaperonu HSP40 çeşitli proteinlerin parçalanmasına yardımcı olur. Şekil 2.1'de gösterilmiştir (143).



Şekil 2.1. HSP70 ve HSP90'ın şaperon aktivitesinin şematik gösterimi

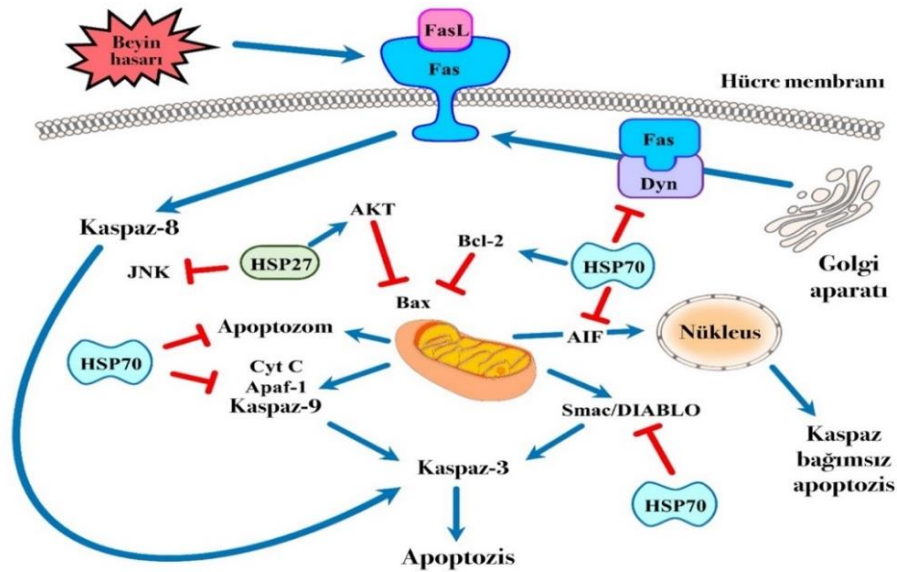
(HIP = HSP70 ile etkileşen protein; HOP = HSP70/HSP90-organizasyon proteini; CHIP= HSP70/HSC70 etkileşimli proteinin C terminali; Bag-1 = Bcl-2 ile ilişkili atanojen).

HSP70'in hücre yüzeyi reseptörlerini bağlama ve internalize olma, antijen sunumunu aktive etme yeteneğinin, inflamatuvar sitokinlerin indüklenmesinden bağımsız olması çok muhtemeldir, ki bu bugüne kadar hala tartışmalıdır (144). HSP70 hem doğuştan gelen hem de edinsel bağışıklık sistemini uyarır. HSP70'in bağışıklık hücreleri tarafından tanınması, sinyal iletiminin başlatılmasına neden olur ve bu da daha sonra sitokinlerin salınmasına neden olur, Şekil 2.2'de gösterilmiştir (140). HSP70 inflamatuvar ortamda; Anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik eder. Endositik reseptörlerine bağlanarak dentritik hücreler, miyeloid türevli supresör hücreler ve monositler ile etkileşime girerek IL-10 salınımına ve immünosupresyona neden olur (144). De Souza ve arkadaşları, insan glial hücrelerinin IL-1, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerle uyarılmasının, ağırlıklı olarak oligodendrositlerde HSP70 ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (145).



Şekil 2.2. HSP70'in doğuştan ve edinsel bağışıklık hücreleri ile ilişkisinin gösterimi.

HSP70; hücre içerisinde protein yeniden katlanmasını başarıyla tamamlarsa, bu işlemde artan fazla HSP70, hücre ölümünü engellemek için apoptotik araçlarla etkileşime girer. Hücre hasara neden olan stres koşulları, HSP70'in proteinleri yeniden katlama kapasitesini aşarsa apoptotik yolak kontrol edilemez ve bu hücre ölümüne neden olur. HSP70'in yetersiz üretimi, yanlış katlanmış proteinlerin hücre içinde birikmesine ve nörodejeneratif süreçlere de hazırlayıcı olan apoptotik hücre ölümüne sebep olmaktadır (146). Beyin hasarı, farklı yollardan apoptotik hücre ölümüne neden olur. İnterensek yol, mitokondriden yayılan sinyaller etrafında gelişirken, ekstrensek veya reseptör aracılı yol ise ölüm reseptörlerinin ligandlarına bağlanmasıyla başlar. Prototip olarak ölüm reseptörü Fas burada gösterilmektedir. HSP70 ve HSP27'nin şekilde gösterildiği gibi apoptoza müdahale ettiği Şekil 2.3.'te gösterilmiştir (143).



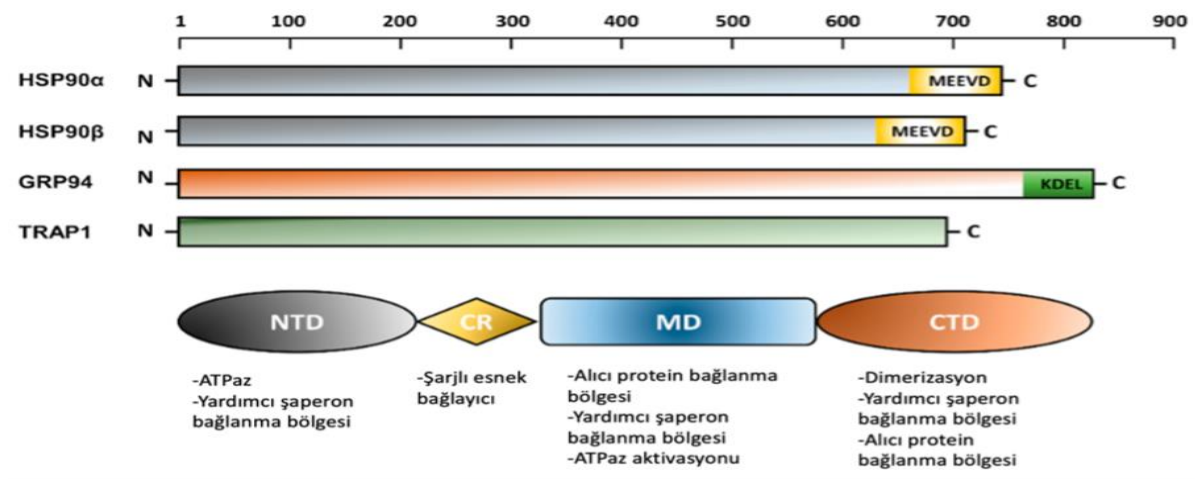
Şekil 2.3. HSP70 ve HSP27'nin apoptoza müdahalesi (FasL = Fas ligand; AIF = apoptoz indükleyici faktör; Akt = protein kinaz B; Apaf-1 = apoptoz proteaz aktive edici faktör-1; Cyt C = sitokrom c; JNK = c-Jun N-terminal kinaz; Dyn = dinamin).

2.2.3. Isı şok proteinini-90

HSP90 dimerik bir protein olup 90 kDa ağırlığa sahiptir. Stres olmayan koşullar altında toplam memeli hücresel proteinlerinin yaklaşık %1-2'sini temsil ederler. Stres koşullarında ekspresyonları yaklaşık 3 kat artış gösterebilir (147).

Memelilerde; HSP90 alfa ($HSP90\alpha$) ve HSP90 beta ($HSP90\beta$) olmak üzere iki formu sitoplazmada, glukoz ile düzenlenen protein-94 (GRP94) endoplazmik retikülümde ve TRAP-1 (tümör nekroz faktörü reseptörüyle ilişkili protein 1) mitokondride bulunur. İnsanda $HSP90\alpha$ indüklenebilir olarak kabul edilirken, $HSP90\beta$ $HSP90$ 'ın yapısal formudur. HSP90, hücrelerin hayatta kalmasındaki hayati rolleri nedeniyle vazgeçilmez şaperonlardan biri olarak kabul edilir. HSP90 proteinleri apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, hücre canlılığı, protein katlanması ve sinyalizasyon olayları gibi temel hücresel süreçlerde yer alır. Ayrıca, antijen sunan hücrelerin ve dendritik hücrelerin aktivasyonu yoluyla adaptif bağışıklığı indüklerler. HSP90'ın aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türleri, viral enfeksiyon, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumla ilişkilendirilmiştir.

Sitozolik HSP90, HSF-1 ile bağlanabilir ve inflamasyon durumunda HSP40, HSP60 ve HSP70 gibi diğer HSP'lerin ekspresyonunu indükleyebilir. Şekil 2.4'te insanlarda HSP90 ailesi üyelerinin alan yapısı ve alanların biyolojik fonksiyonları gösterilmiştir. İnsanlarda HSP90 ailesi üyelerinin alan yapısının şematik gösterimi ile her alanın biyolojik işlevi gösterilmektedir. $HSP90\alpha$, $HSP90\beta$, GRP94 ve TRAP1 sırasıyla 732, 724, 704 ve 803 amino asitten oluşmaktadır (147).



Şekil 2.4. HSP90 ailesi üyelerinin alan yapısı ve alanların biyolojik fonksiyonları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMA YERİ, ZAMANI VE ÖRNEKLEM SEÇİMİ

Bu tek merkezli prospektif kontrollü klinik çalışma İstanbul Medeniyet Üniversitesi S.B. Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Eğitim Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği'nde Aralık 2023 ve Mart 2024 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışmanın etik kurul onayı; İstanbul Medeniyet Üniversitesi S.B. Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2023/0825 karar numarası ile alınmıştır. Çalışma Helsinki Bildirisi, İyi Klinik Uygulamalar ve İyi Laboratuvar Uygulamalarına uygun şekilde gerçekleştirildi.

Çalışmamıza Aralık 2023 ve Mart 2024 tarihleri arasında İstanbul Medeniyet Üniversitesi S.B. Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Nöroloji Kliniği Multipl Skleroz polikliniğine başvuran çalışma dahil edilme kriterlerini karşılayan, McDonald tanı kriterlerine göre kesin RRMS tanısı almış ve çalışmaya katılmak için onam veren 40 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubunda ise yaş ve cinsiyet açısından eşleşen 40 sağlıklı kontrol dahil edildi. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için ihtiyaç duyulan katılımcı sayısı, G*Power analizi yapılarak ve literatürde yerini almış benzer çalışmaların katılımcı sayıları değerlendirilerek belirlenmiştir (148).

Hastalar için çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- 18-50 yaş arasında Mc Donald kriterini karşılayan Relapsing Remitting Multipl Sklerozis tanılı hasta olmak
- Tanıya yönelik yapılan BOS Oligoklonal band sonucu tip 2 pozitif ile uyumlu olmak
- Multipl Skleroz tanısı ile daha önceden herhangi bir atak tedavisi veya koruyucu ilaç kullanımı olmamak ve Multipl Skleroz dışında herhangi bir kronik hastalık tanısı bulunmamak

Çalışmadan dışlama kriterleri:

- 18 yaş altı ve 50 yaş üstünde olmak
- Bilinen başka nörolojik veya ek hastalığı olması
- Daha önceden herhangi bir kronik hastalık nedeniyle immünsüpresan, kemoterapötik ilaç veya immün modülatör kullanımının olması.

Kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan ve ilaç kullanımı olmayan spesifik olmayan baş ağrısı şikâyeti ile nöroloji polikliniğine başvuran hasta olmak.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundaki bireyden çalışmanın amaç ve içeriğini belirten aydınlatılmış onam formu ile onam alındı. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubuna ait her bireyin ayrıntılı fizik ve nörolojik muayeneleri yapıldı. Yapılandırılmış bir form aracılığı ile hastaların; yaş, cinsiyet, eğitim durumu, medeni hal, sigara ve alkol kullanımı, MS tanı süresi, kullandığı ilaçlar, ek hastalık varlığı, atak sayısı, atak belirtileri (beyin sapı, duyusal, piramidal, optik nörit, spinal, serebellar), OKB, EDSS sonuçları kaydedildi.

Çalışmaya katılım sağlayan MS hastaların klinik seyri ile hastalık şiddetinin tespiti için EDSS kullanıldı. Santral sinir sisteminin piramidal, serebellar, beyin sapı, duyusal, visual, bilişsel, üriner-gastrointestinal sistem başta olmak üzere yedi fonksiyonel alanın değerlendirilmesi esasına dayanan bu skorlama ile hastaların fonksiyonel durumu “0=Normal 10=MS nedeni ile ölüm” olmak üzere 0 ile 10 arasında skorlanması planlandı (149).

3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE MUHAFAZASI

Çalışmaya katılması uygun olan tüm katılımcılardan ‘Isı şok proteini 70 ve 90 ’ laboratuvar testi çalışılmak üzere antekübital ven kullanılarak venöz kan örneği mor renk kapaklı 10 cc’lik EDTA’lı kan toplama tüplerine alındı. Kan alındıktan sonra 10 dakika 3000 devirde +4 C’de santrifüj edildi ve serum örnekleri eppendof tüplerine alındı. Serum örnekleri -80 derecede saklanıp tüm örnekler birlikte çalışıldı. Biyokimya laboratuvarı tarafından tercihen kullanılan ELISA kitlerin bilgileri:

BTLAB Human Heat Shock Protein 70 kDa Protein 1A, HSPA1A ELISA kit, katalog numarası:102-E3015Hu, BTLAB Human Heat Shock cognate 71 kDa protein , HSPA8 ELISA kit, katalog numarası:102-E3912Hu , BTLAB Human Heat Shock Protein 90 ELISA

Kit Katalog No:E3061Hu , BTLAB Human Heat Shock Protein 90-alpha A2 ELISA Kit
Katalog No:E7774Hu

Aynı hasta grubuna dahil olan ve atak döneminde olan 6 RRMS hasta, sağlıklı kontrol grubundan 6 kişiden 10 cc antekübital ven kullanılarak venöz kan örnekleri, mor renk kapaklı (EDTA'lı) kan toplama tüplerine alınmıştır. 1 ml RNAlater eklenerek hafifçe alt üst edilerek homojenize edilmesi sağlanmıştır. Kan örneklerinin 1 saat içerisinde laboratuvara transferi tarafımda sağlanmıştır. Çalışmanın bu kısımdan sonraki aşamaları Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.3. KULLANILAN GEREÇLER, SARF VE KİMYASALLAR

Çalışmada kullanılan gereç, sarf ve kimyasallar ve bu maddelerin kullanım alanları Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan gereç, sarf ve maddeler.

Gereç, Sarf ve Kimyasallar	Kullanım Alanı
Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)	RNA izolasyonu
Spektrofotometre (Thermo-Amerika Birleşik Devletleri)	RNA konsantrasyonunun belirlenmesi
Derin dondurucu (-86 oC, Binder-Almanya)	Örneklerin muhafazası
Buzdolabı (-20 oC, Uğur-Türkiye)	Örnek ve kimyasalların muhafazası
Buzdolabı (+4 oC, Uğur-Türkiye)	Örnek ve kimyasalların muhafazası
Real-time PCR Cihazı (BioRad-Almanya)	Gerçek zamanlı PZR
PCR cihazı (Thermo)	PZR
DNA/RNA UV Kabin (Türkiye)	Total RNA izolasyonu, cDNA sentezi hazırlık aşaması
Buz makinesi (HIMS-50-Çin)	Total RNA izolasyonu
Absolute etanol (%99,5-Amerika Birleşik Devletleri)	Total RNA izolasyonu
PBS 1X (Euroclone-İtalya)	cDNA eldesi
Analytik Jena RNA izolasyon kiti (Almanya)	Total RNA izolasyonu
Euroclone SybrGreen Master Mix (İtalya)	DNA amplifikasyonunun belirlenmesi, gen ifadelerinin belirlenmesi
BTLAB Human Heat Shock Protein 70 ELISA Kit	Serum HSP-70 düzeylerinin belirlenmesi
BTLAB Human Heat Shock Protein 90 ELISA	Serum HSP-90 düzeylerinin belirlenmesi
Lab companion, ABD	İnkübatör
Thermo Multiskan GO, İngiltere	ELISA okuyucu

3.4. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.4.1. ELISA yöntemi

Çalışma için ayrılmış örneklerin, kit reaktiflerinin ve mikrolakanın oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Örneklerde İnsan HSP-70 (BTLAB Human Heat Shock Protein 70 kDa Protein 1A, HSPA1A ELISA kit, katalog numarası:102-E3015Hu ve BTLAB Human Heat Shock cognate 71 kDa protein, HSPA8 ELISA kit, katalog numarası:102-E3912Hu) düzeyi Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA, Enzim bağlı immunosorbent yöntem) kullanılarak kit yardımıyla ölçüldü. Bu kit biyotinlenmiş ikili sandviç prensibine göre ölçüm yapmaktadır.

HSPA1A ELISA kiti için; bu kitte saflaştırılmış insan monoklonal HSPA1A antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanılır. 50 µL HSP-70 standartları (48; 24; 12; 6; 3 ng/L) ve örneklerden 40 µL kuyucuklara eklendi. Örnekler üzerine 10 µL biyotinlenmiş anti-HSPA1A antikor eklenildi. Ardından örnek ve standartlara 50 µL streptavidin-HRP eklenip inkübatörde (Lab companion, ABD) 1 saat 37 °C’de bekletildi. İnkübasyon bittikten sonra ELISA manuel mikropipet yardımı ile yıkandı. Daha sonra 50 µL Kromojen A ve Kromojen B solüsyonu eklenip 15 dk 37 °C’de karanlıkta bekletildi. Renk oluşması için karanlıkta bekletilip, asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk yoğunluğu ELISA okuyucu (Thermo Multiskan GO, İngiltere) ile 450 nm’de okundu. İnsan HSP-70 düzeyleri standart grafik yardımıyla hesaplandı.

HSPA8 ELISA kiti için; bu kitte saflaştırılmış insan monoklonal HSPA8 antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanılır. 50 µL HSP-70 standartları (48; 24; 12; 6; 3 ng/L) ve örneklerden 40 µL kuyucuklara eklendi. Örnekler üzerine 10 µL biyotinlenmiş anti-HSPA8 antikor eklenildi. Ardından örnek ve standartlara 50 µL streptavidin-HRP eklenip inkübatörde (Lab companion, ABD) 1 saat 37 °C’de bekletildi. İnkübasyon bittikten sonra ELISA manuel mikropipet yardımı ile yıkandı. Daha sonra 50 µL Kromojen A ve Kromojen B solüsyonu eklenip 15 dk 37 °C’de karanlıkta bekletildi. Renk oluşması için karanlıkta bekletilip, asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk yoğunluğu ELISA okuyucu (Thermo Multiskan GO, İngiltere) ile 450 nm’de okundu. İnsan HSP-70 düzeyleri standart grafik yardımıyla hesaplandı.

Çalışma için ayrılmış örneklerin, kit reaktiflerinin ve mikrolakanın oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Örneklerde İnsan HSP-90 (BTLAB Human Heat Shock Protein 90 ELISA Kit Katalog No: E3061Hu , BTLAB Human Heat Shock Protein 90-alpha A2 ELISA Kit

Katalog No:E7774Hu kullanılarak kit yardımıyla ölçüldü. Bu kit biyotinlenmiş ikili sandviç prensibine göre ölçüm yapmaktadır.

HSP90AB1 ELISA kiti için; bu kitte saflaştırılmış insan monoklonal HSP90AB1 antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanılır. 50 µL HSP-90 standartları (48; 24; 12; 6; 3 ng/L) ve örneklerden 40 µL kuyucuklara eklendi. Örnekler üzerine 10 µL biyotinlenmiş anti-HSP90AB1 antikor eklenildi. Ardından örnek ve standartlara 50 µL streptavidin-HRP eklenip inkübatörde (Lab companion, ABD) 1 saat 37 °C’de bekletildi. İnkübasyon bittikten sonra ELISA manuel mikropipet yardımı ile yıkandı. Daha sonra 50 µL Kromojen A ve Kromojen B solüsyonu eklenip 15 dk 37 °C’de karanlıkta bekletildi. Renk oluşması için karanlıkta bekletilip, asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk yoğunluğu ELISA okuyucu (Thermo Multiskan GO, İngiltere) ile 450 nm’de okundu. İnsan HSP-90 düzeyleri standart grafik yardımıyla hesaplandı.

HSP90AA2 ELISA kiti için; bu kitte saflaştırılmış insan monoklonal HSP90AA2 antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanılır. 50 µL HSP-90 standartları (48; 24; 12; 6; 3 ng/L) ve örneklerden 40 µL kuyucuklara eklendi. Örnekler üzerine 10 µL biyotinlenmiş anti-HSP90AA2 antikor eklenildi. Ardından örnek ve standartlara 50 µL streptavidin-HRP eklenip inkübatörde (Lab companion, ABD) 1 saat 37 °C’de bekletildi. İnkübasyon bittikten sonra ELISA manuel mikropipet yardımı ile yıkandı. Daha sonra 50 µL Kromojen A ve Kromojen B solüsyonu eklenip 15 dk 37 °C’de karanlıkta bekletildi. Renk oluşması için karanlıkta bekletilip, asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk yoğunluğu ELISA okuyucu (Thermo Multiskan GO, İngiltere) ile 450 nm’de okundu. İnsan HSP-90 düzeyleri standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.4.2. RNA izolasyonu

Her iki gruba dâhil olan katılımcılardan alınan 10 cc’lik kan örneklerinden ısı şok proteinleri ile ilişkili TRAP, HSP90AB1, HSP90AB4P, HSPB1, HSPA7, HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HSPA8, HSPAA2, HSPB5 genleri ve kontrol genleri olarak GAPDH ve ACTINB gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu Analytik Jena innuPREP Blood RNA kiti yönergeleri doğrultusunda aşağıda belirtilen basamaklarla yürütülmüştür.

- 0.5 ml’lik kan örnekleri 15 ml’lik reaksiyon tüplerine alındıktan sonra 10 ml’lik (+40C’taki) ELB Tampon tüplere eklendi. Kısa süreli vorteksleme ile karıştırıldı.

- Buz üstünde 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon esnasında iki kez vorteksenerek karıştırıldı. 3,000 rpm'de, +40C'da 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatant karışımdan tamamen uzaklaştırıldı.
- Tüp bir kâğıt havlunun üzerine ters çevirilerek supernatantın tamamen uzaklaştırıldığından emin olundu.
- Hücre peletinin üstüne 5 ml ELB Tampon eklendi. Daha sonra elle şiddetli bir şekilde sallanarak tekrar süspanse edildi. 3,000 rpm'de, +40C'da, 3 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüp bir kâğıt havlunun üzerine ters çevirilerek supernatantın tamamen uzaklaştırıldığından emin olundu.
- 600 µl Lysis RL solüsyonu hücre peletine eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edildi. Pipetaj ile re-suspend edildi. Bu basamakta herhangi bir hücre kümesi/birikintisi kalmamasına özen gösterildi.
- Receiver tüpüne Spin Filter D konuldu. Parçalanmış örnek Spin Filter D filtresinin üstüne konuldu ve 12,000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra filtre çıkarıldı. Bu basamakta örneğin tamamının filtreden geçmediği tespit edildiyse santrifüjleme işlemi tekrarlandı.
- Yeni bir toplayıcı tüpünün içine Spin Filter R filtresi konuldu. 600 µl %70'lik etanol ile 7. Basamaktaki örneğe eklendi. Elde edilen yeni karışım pipetaj ile karıştırıldı. 650 µl'lik örnek Spin Filtre R filtresine konulduktan sonra 12,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Bu basamakta örneğin tamamının filtreden geçmediği tespit edildiyse santrifüjleme işlemi tekrarlandı.
- Santrifüjleme işlemi sonrasında süzöntü ile dolu receiver tüp çıkarıldı ve Spin Filter R filtresi yeni bir receiver tüpüne konuldu. Örneğin kalan kısmı aynı Spin Filter R'ye yüklendi ve 12,000 rpm'de santrifüjlendi.
- Filtrat ve receiver tüp çıkarıldı ve Spin Filter R filtresi yeni bir receiver tüpe konuldu.
- Spin Filter R filtresi açılarak 500 µl Washing Solution HS solüsyonu eklendikten sonra kapağı kapatılarak 12,000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Kalan filtrat ile birlikte receiver tüpü uzaklaştırıldı ve Spin Filter R filtresi yeni bir receiver tüpüne geçirildi.

- Spin Filter R filtresi açılarak 700 µl yıkama çözeltisi LS solüsyonu eklendikten sonra kapağı kapatılarak 12,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Kalan filtrat ile birlikte receiver tüpü uzaklaştırıldı ve Spin Filter R filtresi yeni bir receiver tüpüne geçirildi.
- 12,000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüjlenerek tüm etanol kalıntıları uzaklaştırıldıktan sonra receiver tüpü atıldı.
- 14. Spin Filter R filtresi bir elüsyon tüpüne alındı. Kapağı dikkatlice açılarak 40 µl RNase-free Water eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 8,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.

3.4.3. İzole edilen RNA konsantrasyonunun belirlenmesi

RNA saflık ve konsantrasyonunun belirlenmesi için 260 nm ve 280 nm’de dalga boyunda ışığı soğurma (O.D.) ölçümü gerçekleştirilmiştir. 260 nm’deki O.D./280 nm’deki O.D. oranı üzerinden RNA saflık derecesi belirlenmiştir.

3.4.4. cDNA sentezi

Saflık derecesi belirlenen izole RNA’dan uygun kitler ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez esnasında kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. cDNA sentezi esnasında kullanılan maddeler.

Bileşenler	5x Tampon	Enzim Karışımı	Ultra saf steril su (dH ₂ O)	RNA örneği
Miktar	10 µl	1 µl	8 µl	1µl
Toplam Hacim	20 µl			

cDNA sentezinin gerçekleşebilmesi için uygun polimeraz zincir reaksiyon koşulları ise Tablo 3.3’te belirtildiği gibidir.

Tablo 3.3. Polimeraz zincir Reaksiyon koşulları.

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık (°C)	25	42	85	4
Zaman	10	15	5	∞

3.4.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Yöntemiyle Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 6 hasta ve 6 kontrol grubunun total kan numunelerinden 48. Saatte yapılan RNA izolasyonu sonrası elde edilen cDNA’lardan RT-PCR yöntemi ile kullanılan 11

adet gen araştırıldı. TRAP, HSP90AB1, HSP90AB4P, HSPB1, HSPA7, HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HSPA8, HSPAA2, HSPB5 genlerinin gerçek zamanlı PCR ölçümleri BioRad cihazı ile yürütülmüştür. Toplam reaksiyon hacminin 20 µL olduğu amplifikasyonlar, cDNA, bölgeye özgü ileri-geri yönlü primerler, SYBRGreen Master Mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifadelerinin normalize edilmesi için GAPDH ve B2M genlerine özgü primer kullanılarak cDNA örnekleri çalışılmıştır. Gerçek zamanlı PCR bileşenleri Tablo 3.4’de gösterilen miktarlarda kullanılmıştır.

Döngü eşiği (cycle threshold, Ct) floresan sinyalinin saptanabilmesi için gereken döngü sayısı olarak tanımlanır. Ct değeri örnekteki DNA miktarı ile ters orantılıdır. Ct değeri ne kadar düşüğe örnekte o kadar fazla DNA bulunmaktadır ve ilgili genin ekspresyon düzeyi artmıştır şeklinde yorumlanır. Ct değeri ne kadar yüksekse örnekte o kadar az DNA bulunmaktadır ve ilgili genin ekspresyon düzeyi azalmıştır şeklinde yorumlanır. Bu genler sinyal yolları ile kontrol edildiği için ekspresyonu artan ve azalan genler ve ilişkili oldukları sinyal yolları üzerinden analiz edilecektir.

Yapılan analizin ardından elde edilen verilere göre gen ekspresyon değerleri belirlendi ve ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin analizinde 2-ΔΔCt yöntemi kullanıldı.

Gen ekspresyonlarındaki kat değişimi (fold change) hesaplamaları log2’ye uygun yapıldı. 2 ve üzeri ekspresyon farklılığı görülenler yukarı; 0,5 ve altı ekspresyon farklılığı görülenler aşağı regüle genler olarak tanımlandı. Genlerin ekspresyon düzeylerini Livak yöntemiyle hesaplamak için aşağıdaki formüller sırasıyla kullanıldı:

$$\Delta Ct (\text{hasta}) = Ct (\text{hasta}) - Ct (\text{referans hasta})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrol}) = Ct (\text{kontrol}) - Ct (\text{referans kontrol}) \text{ ve}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hasta}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

$$\text{Ekspresyon düzeyi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Reactome, açık kaynaklı, açık erişimli ve uluslararası hakemli bir veritabanıdır. Moleküler ve klinik araştırmalar için; genom analiz verisi, sistem biyolojisi, moleküler yolak verileri gibi birden fazla ve farklı verinin görselleştirilmesi, yorumlanması ve analizi için in silico biyoinformatik araçları kullanmaktadır. Reactome, sinyal ve metabolik moleküllerin arasındaki ilişkisel yapıyı nicel olarak analizyen bir veri tabanıdır. Reaksiyonlara katılan yapıların arasında bir biyolojik ağ oluşturur. Bunları yollar halinde gruplandırılır. (150).

Enrichr, derlenmiş gen setleri için kapsamlı bir kaynak ve daha ileri biyolojik araştırmalar için kullanılan bir arama motorudur. Enrich veri tabanı üzerinden ulaşım sağlanan NCATS BioPlanet, tüm yolakları, bunların sağlıklı ve hastalık durumu ek açıklamalarını ve bunların içindeki hedefleri ve aralarındaki ilişkileri kataloglayan kapsamlı, kamuya açık bir bilişim kaynağıdır (151).

Tablo 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan maddeler.

Bileşenler	İlk Hacim
SYBR green master mix	10 µl
Primerler	1 µl
cDNA örneği	1 µl
Steril su	8 µl
Toplam Hacim 20 µl	

Gerçek zamanlı PCR sıcaklık şartları Tablo 3.5’te gösterildiği gibidir.

Tablo 3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları.

Zaman	Sıcaklık	Döngü Sayısı
5 dk	95 °C	1
15 sn	95 °C	45
60 sn	60 °C	45

3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen veriler doğrultusunda öncelikle tanımlayıcı istatistikler hazırlanmıştır. Gruplardaki katılımcı sayılarında $n < 30$ olması sebebiyle parametrik olmayan testlerin kullanılmasına (152) karar verilmiştir. Bu sebeple, iki kategorili değişkenlerin farkları Mann-Whitney U (M-W U) testi ve ikiden fazla kategorili değişkenlerin farkları ise Kruskal Wallis H (K-W H) testi ile incelenmiştir. K-W H testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunması halinde, farkın hangi iki kategori arasında olduğunu incelemek için M-W U testi kullanılmıştır. İki kategorik değişkenin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki eş hareketin incelenmesi için Spearman korelasyon testi uygulanmıştır.

Çoklu kategorik değişken ve sürekli değişken arasındaki ilişkiyi hesaplamak için η^2 (Eta Kare) testi kullanılmıştır (153). Hasta-kontrol grupları arasındaki değişim ve atak geçiren-atak geçirmeyen gruplar arasındaki eşik değerleri tespit edebilmek için ROC analizi kullanılmıştır. Analiz sonuçları %95 güven aralığında yorumlanmış olup, analizler SPSS v.25 yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ISI ŞOK PROTEİNLERİNİN ELISA İLE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN ANALİZİ

Çalışmaya kabul edilen 40 kontrol ve 40 hasta grubuna ait demografik bilgileri ve hastalık geçmişini içeren değişkenlere ait frekanslar ve yüzdeler Tablo 4.1’de verilmiştir. Tabloda hastalara ait cinsiyet, atak döneminde olup olmadığı, oligoklonal band tipi, EDDS skoru, immünsüpresan ilaç kullanımı, toplam atak sayısı, piramidal atak sayısı, duyuşsal atak sayısı, serebellar atak sayısı, beyin sapı atak sayısı, optik atak sayısı, sigara kullanım durumu ve vaskülit durumu yer almaktadır.

Tablo 4.1. Katılımcı frekans tablosu.

Değişken	Kategori	n	%
Hasta-Kontrol	Kontrol	40	50,00%
	Hasta	40	50,00%
Cinsiyet	Erkek	28	35,00%
	Kadın	52	65,00%
Atak	Yok	24	60,00%
	Var	16	40,00%
OKB	Negatif	0	0,00%
	Pozitif	40	100,00%
İmmünsüpresif İlaç	Yok	40	100,00%
	Var	0	0,00%
Toplam Atak Sayısı	1	14	35,00%
	2	18	45,00%
	3	8	20,00%

Tablo 4.1 (devam). Katılımcı frekans tablosu.

Değişken	Kategori	n	%
Piramidal Atak	0	17	42,50%
	1	18	45,00%
	2	4	10,00%
	3	1	2,50%
Duyusal Atak	0	25	62,50%
	1	14	35,00%
	3	1	2,50%
Serebellar Atak	0	37	92,50%
	1	3	7,50%
Beyin Sapı Atak	0	31	77,50%
	1	9	22,50%
Optik Atak	0	17	42,50%
	1	19	47,50%
	2	4	10,00%
Sigara	Hayır	19	47,50%
	Evet	21	52,50%
Vaskülit Belirteçleri	Yok	40	100,00%
	Var	0	0,00%

Katılımcılar hasta ve kontrol sayıları eşit olarak toplanmıştır. Cinsiyetler değerlendirildiğinde tüm gruplardaki toplam katılımcılar içerisinde %35 (n=28) erkek, %65 (n=52) kadındır. Hasta grubunda yer alan katılımcıların %60'ı (n=24) remisyon döneminde olduğu, %40'ı (n=16) ise atak döneminde olduğu anlaşılmıştır. Atak dönemindeki hastalarda piramidal atak geçirme sıklığı; bir kez n=18 (%45,0) kişi, iki kez n=4 (%10,0) ve üç kez n=1 (%2,5) olarak görülmüştür. Atak dönemindeki hastalarda duyusal atak geçirme sıklığı; bir kere n=14 (%35,0) kişi ve 3 kere n=1 (%2,5) olarak görülmüştür. Serebellar atak geçirme sıklığı; bir kez n=3 (%7,5) kişi, beyin sapı atak geçirme sıklığı; bir kez n=9 (%22,5) kişi , optik atak geçirme sıklığı; bir kez n=19 (%47,5) kişi ve 2 kez n=4 (%10,0) 'dir. Toplam atak

geçirmede ise bir kez n=14 (%35,0) kişi, iki kez n=18 (%45,0) ve 3 kez n=8 (%20,0) olarak görülmüştür. Hastaların tamamında (n=40, %100) oligoklonal band tipinin tip 2 pozitif olduğu, immünsüpresan ilaç kullanımı olmadığını ve vaskülit belirteçlerinin negatif olduğu anlaşılmıştır. Hastaların %52,5'inin (n=21) sigara kullandığı görülmektedir.

Tablo 4.2. Katılımcı özelliklerinde yaş değişkeni farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±Ss. (Min.-Maks.)	p
Hasta-Kontrol	Hasta (n=40)	33,55±10,04 (18-55)	0,847
	Kontrol (n=40)	32,95±9,40 (18-50)	
Cinsiyet	Erkek (n=28)	31,00±7,45 (20-44)	0,135
	Kadın (n=52)	34,46±10,54 (18-55)	
Atak	Yok (n=24)	36,00±10,21 (19-55)	0,045
	Var (n=16)	29,88±9,13 (17-56)	
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	34,50±10,17 (17-56)	0,859
	2 (n=18)	33,72±11,13 (19-55)	
	3 (n=8)	31,50±8,52 (20-48)	
Piramidal Atak	0 (n=17)	33,47±8,65 (20-48)	0,443
	1 (n=18)	35,17±11,82 (17-56)	
	2 (n=4)	30,00±7,16 (23-40)	
	3 (n=1)	20,00±0,0 (20-20)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	31,40±8,67 (17-47)	0,056
	1 (n=14)	38,36±11,03 (22-56)	
	3 (n=1)	20,00±0,0 (20-20)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	33,78±10,29 (17-56)	0,681
	1 (n=3)	30,67±9,24 (20-36)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	33,71±10,26 (17-56)	0,935
	1 (n=9)	33,00±10,28 (20-47)	
Optik Atak	0 (n=17)	37,00±11,31 (17-56)	0,236
	1 (n=19)	30,63±8,40 (19-47)	
	2 (n=4)	32,75±10,37 (25-48)	
Sigara	Hayır (n=19)	34,05±11,81 (17-56)	0,935
	Evet (n=21)	33,10±8,62 (20-48)	

Katılımcılara ait hasta-kontrol ve cinsiyet verileri n=80 kişi ile incelenmiş olup diğer özellikler hasta grubunda hesaplanmıştır. Hastaların ortalama yaşının $33,55 \pm 10,04$ olduğu ve kontrol grubundakilerin de $32,95 \pm 9,40$ olduğu, iki grup arasında yaş olarak istatistiksel bir farkın yoktur ($p > 0,05$). Benzer şekilde cinsiyetler incelendiğinde erkeklerin $31,00 \pm 7,45$ ve kadınların $34,46 \pm 10,54$ yaş istatistikleri arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$). Böylelikle hasta-kontrol grupları ve cinsiyetlere göre yanlılığın olmadığı söylenebilmektedir. Hasta grubunda yer alan katılımcılar için toplam atak sayısı ve atak türleri ile alakalı istatistiksel olarak yaş farkı yoktur. Sigara kullanan ve kullanmayan hastalardaki yaş istatistikleri de benzerdir. Ancak atak dönemindeki hastalarda yaş $29,88 \pm 9,13$ iken remisyon grubunda yaş $36,00 \pm 10,21$ olarak bulunmuştur. Atak dönemindeki hastaların yaş ortalamalarının remisyon dönemindeki hastalardan istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir ($p = 0,045$).

IgG indeksi sonuçlarının fark analizleri hastalar üzerinden yapılmış olup Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Hasta grubunda IGG değişkeni farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Cinsiyet	Erkek (n=14)	1,31±0,88 (0,62-1,31)	0,031
	Kadın (n=26)	1,22±0,57 (0,60-2,82)	
Atak	Yok (n=24)	1,19±0,57 (0,60-2,82)	0,185
	Var (n=16)	0,98±0,33 (0,61-1,61)	
Toplam Atak	1 (n=14)	0,99±0,56 (0,61-2,82)	0,147
	2 (n=18)	1,16±0,46 (0,65-2,58)	
	3 (n=8)	1,18±0,49 (0,60-1,99)	
Piramidal Atak	0 (n=17)	1,08±0,54 (0,60-2,82)	0,130
	1 (n=18)	0,98±0,34 (0,67-1,99)	
	2 (n=4)	1,59±0,72 (0,89-2,58)	
	3 (n=1)	1,63±0,0 (1,63-1,63)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	1,11±0,55 (0,60-2,82)	0,359
	1 (n=14)	1,05±0,40 (0,62-1,99)	
	3 (n=1)	1,63±0,0 (1,63-1,63)	

Tablo 4.3 (devam). Hasta grubunda IGG değışkeni farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Serebellar Atak	0 (n=37)	1,09±0,51 (0,60-2,82)	0,158
	1 (n=3)	1,30±0,34 (0,96-1,63)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	1,07±0,44 (0,61-2,58)	0,549
	1 (n=9)	1,23±0,67 (0,60-2,82)	
Optik Atak	0 (n=17)	1,15±0,62 (0,62-2,82)	0,873
	1 (n=19)	1,09±0,40 (0,61-1,99)	
	2 (n=4)	0,99±0,40 (0,60-1,55)	
Sigara	Hayır (n=19)	0,99±0,48 (0,60-2,58)	0,062
	Evet (n=21)	1,20±0,5 (0,7-2,82)	

Ortalama IgG indeks değeri Erkeklerde 1,31±0,88 ve kadınlarda 1,22±0,57'dir. Kadınların IgG indeks ortalamasının erkeklerden istatistiksel olarak yüksek olduğu hesaplanmıştır. Toplam atak sayısı, atak türleri ve sigara kullanımı kategorilerinde IgG indeksi değeri benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Katılımcıların özelliklerine göre HSP90AB1 düzeyleri fark analizleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Katılımcı özelliklerinde HSP90AB1 düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Hasta-Kontrol	Hasta (n=40)	5,89±4,44 (1,99-15,71)	0,045
	Kontrol (n=40)	7,17±4,44 (1,22-18,2)	
Cinsiyet	Erkek (n=28)	6,34±4,65 (1,22-15,7)	0,379
	Kadın (n=52)	6,63±4,4 (2,18-18,2)	
Atak	Yok (n=24)	3,4±2,67 (1,99-15,7)	<0,001
	Var (n=16)	9,63±3,92 (2,94-15,71)	

Tablo 4.4 (devam). Katılımcı özelliklerinde HSP90AB1 düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±Ss. (Min.-Maks.)	p
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	8,18±5,47 (1,99-15,71)	0,405
	2 (n=18)	4,94±3,79 (2,06-15,47)	
	3 (n=8)	4,03±1,62 (2,61-7,18)	
Piramidal Atak	0 (n=17)	6,76±4,79 (2,06-15,7)	0,845
	1 (n=18)	5,56±4,59 (1,99-15,71)	
	2 (n=4)	4,38±1,97 (2,96-7,18)	
	3 (n=1)	3,12±. (3,12-3,12)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	5,96±4,37 (1,99-15,71)	0,919
	1 (n=14)	5,97±4,83 (2,06-15,7)	
	3 (n=1)	3,12±. (3,12-3,12)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	6,16±4,51 (1,99-15,71)	0,095
	1 (n=3)	2,6±0,53 (2,06-3,12)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	6,48±4,76 (1,99-15,71)	0,257
	1 (n=9)	3,85±2,26 (2,31-9,6)	
Optik Atak	0 (n=17)	6,06±5,15 (1,99-15,71)	0,815
	1 (n=19)	6,01±4,27 (2,31-15,47)	
	2 (n=4)	4,62±1,65 (2,98-6,35)	
Sigara	Hayır (n=19)	6,12±4,44 (2,61-15,7)	0,267
	Evet (n=21)	5,68±4,53 (1,99-15,71)	

Katılımcıların HSP90AB1 düzeyleri değişkeninde farkı incelendiğinde, hasta-kontrol arasında ve atak dönemindeki hastalarda farklılık olduğu görülmüştür. Diğer değişkenlerde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Kontrol grubunda 7,17±4,44, hasta grubunda 5,89±4,44 saptanması ile; kontrol grubunun hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek HSP90AB1 ölçümüne sahip olduğunu göstermektedir. Atak dönemindeki hastalarda 9,63±3,92 ve remisyondaki hastalarda 3,4±2,67 olup atak dönemindeki hastaların istatistiksel olarak daha yüksek HSP90AB1 düzeylerine sahiptir. Hasta ve Kontrol grupları cinsiyete göre ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5'te yer almaktadır.

Tablo 4.5. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSP90AB1 düzeyleri farkı.

Hasta-Kontrol	Cinsiyet	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Kontrol	Erkek (n=14)	6,53±4,37 (1,22-15,23)	0,444
	Kadın (n=26)	7,51±4,52 (2,18-18,2)	
Hasta	Erkek (n=14)	6,15±4,9 (1,99-15,7)	0,288
	Kadın (n=26)	5,75±4,26 (2,45-15,71)	
p (Erkek)		0,358	
p (Kadın)		0,070	

Tablo 4.5'ten de anlaşılabileceği gibi kontrol grubunda erkekler (6,53±4,37) ve kadınlar (7,51±4,52) arasında HSP90AB1 düzeylerinde anlamlı fark yoktur. Benzer şekilde hasta grubunda da erkekler (6,15±4,9) ve kadınlar (5,75±4,26) arasında HSP90AB1 düzeylerinde anlamlı fark hesaplanamamıştır. Ek olarak cinsiyetlerin kendi içerisinde hasta-kontrol gruplarında farkı incelenmiştir. Bu incelemede ne erkeklerde ne de kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır. HSP90AB1 düzeyleri arasındaki farklılık kontrol grubu, atak dönemindeki hastalar ve remisyondaki hastalar arasında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSP90AB1 düzeyleri farkı.

Değişkenler		Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Atak	Yok (n=24)	3,4±2,67 (1,99-15,7)	<0,001 ^a
	Var (n=16)	9,63±3,92 (2,94-15,71)	
Kontrol (n=40)		7,17±4,44 (1,22-18,2)	
a: p _{Atak (Yok)-Atak (Var)} <0,001; p _{Atak (Yok)-Kontrol} <0,001; p _{Atak (Var)-Kontrol} =0,032			

Atak döneminin HSP90AB1 düzeyine etkisi açısından yapılan hesaplamalar sonucunda atak dönemi, remisyon ve kontrol gruplarındaki katılımcıların HSP90AB1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. İkili karşılaştırmalarda ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu anlaşılmıştır. Katılımcıların özelliklerine göre HSP90AA2 düzeyleri fark analizleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Katılımcı özelliklerinde HSP90AA2 düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Hasta-Kontrol	Hasta (n=40)	11,56±9,97 (3,15-33,55)	0,005
	Kontrol (n=40)	14,46±8,96 (4,62-32,26)	
Cinsiyet	Erkek (n=28)	13,33±10,42 (3,15-32,26)	0,772
	Kadın (n=52)	12,84±9,14 (3,21-33,55)	
Atak	Yok (n=24)	4,67±0,78 (3,15-6,15)	<0,001
	Var (n=16)	21,90±8,20 (8,42-33,55)	
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	16,69±12,33 (3,15-33,55)	0,270
	2 (n=18)	9,45±8,40 (3,21-28,39)	
	3 (n=8)	7,33±3,91 (4,14-14,83)	
Piramidal Atak	0 (n=17)	12,57±9,24 (3,98-28,39)	0,664
	1 (n=18)	12,00±11,68 (3,15-33,55)	
	2 (n=4)	6,84±3,78 (3,21-11,41)	
	3 (n=1)	5,55±0,0 (5,55-5,55)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	12,04±10,73 (3,15-33,55)	0,972
	1 (n=14)	11,14±9,07 (3,98-27,87)	
	3 (n=1)	5,55±0,0 (5,55-5,55)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	12,11±10,18 (3,15-33,55)	0,342
	1 (n=3)	4,85±0,61 (4,46-5,55)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	12,60±10,40 (3,15-33,55)	0,710
	1 (n=9)	7,99±7,76 (4,18-28,39)	
Optik Atak	0 (n=17)	13,08±12,24 (3,21-33,55)	0,943
	1 (n=19)	10,54±8,51 (3,15-30,8)	
	2 (n=4)	9,96±5,86 (4,73-15,25)	
Sigara	Hayır (n=19)	10,38±9,34 (3,15-33,55)	0,882
	Evet (n=21)	12,63±10,61 (3,21-33,17)	

Katılımcıların HSP90AA2 düzeyleri değişkeninde farkı incelendiğinde, hasta-kontrol arasında ve atak dönemindeki hastalarda farklılık olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda $14,46 \pm 8,96$, hasta grubunda $11,56 \pm 9,97$ istatistiklerinin elde edilmesi; kontrol grubunun hasta grubuna göre daha yüksek HSP90AA2 ölçümüne sahip olduğunu göstermektedir. Atak dönemindeki hastalarda $21,90 \pm 8,20$ ve remisyon grubundaki hastalarda $4,67 \pm 0,78$ olarak bulunmuş olup atak geçiren hastaların istatistiksel olarak daha yüksek HSP90AA2 ölçümüne sahip olduğunu göstermektedir. Hasta ve Kontrol grupları cinsiyet açısından ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.8’de yer almaktadır.

Tablo 4.8. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSP90AA2 düzeyleri farkı.

Hasta-Kontrol	Cinsiyet	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Kontrol	Erkek (n=14)	13,11±9,35 (5,14-32,26)	0,335
	Kadın (n=26)	15,18±8,84 (4,62-30,94)	
Hasta	Erkek (n=14)	13,29±11,44 (3,15-30,8)	0,999
	Kadın (n=26)	10,63±9,19 (3,21-33,55)	
p (Erkek)		0,251	
p (Kadın)		0,006	

Cinsiyet açısından yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda erkekler ($13,11 \pm 9,35$) ve kadınlar ($15,18 \pm 8,84$) arasında HSP90AA2 düzeylerinde anlamlı fark hesaplanamamıştır. Benzer şekilde hasta grubunda da erkekler ($13,29 \pm 11,44$) ve kadınlar ($10,63 \pm 9,19$) arasında HSP90AA2 düzeylerinde anlamlı fark hesaplanamamıştır. Cinsiyetlerin kendi içerisinde, hasta ve kontrol gruplarında farkı incelenmiştir. Bu incelemede erkeklerde anlamlı bir fark hesaplanmamıştır. Kadınlarda hasta grubunun HSP90AA2 düzeyinin kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak düşük olduğu saptanmıştır. HSP90AA2 düzeyleri arasındaki farklılık kontrol grubu, atak dönemindeki ve atak geçirmeyen hastalar arasında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSP90AA2 düzeyleri farkı.

Değişkenler		Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Atak	Yok (n=24)	4,67±0,78 (3,15-6,15)	<0,001 ^a
	Var (n=16)	21,9±8,2 (8,42-33,55)	
Kontrol (n=40)		14,46±8,96 (4,62-32,26)	
a: p _{Atak (Yok)-Atak (Var)} <0,001; p _{Atak (Yok)-Kontrol} <0,001; p _{Atak (Var)-Kontrol} =0,008			

Yapılan hesaplamalar sonucunda atak dönemi, remisyon dönemi ve kontrol gruplarındaki katılımcıların HSP90AA2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. İkili karşılaştırmalarda ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu anlaşılmıştır. Katılımcıların özelliklerine göre HSPA1A fark analizleri Tablo 4.10'da verilmektedir.

Tablo 4.10. Katılımcı özelliklerinde HSPA1A düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±Ss. (Min.-Maks.)	p
Hasta-Kontrol	Hasta (n=40)	14,89±12,18 (4,37-45,22)	0,018
	Kontrol (n=40)	17,61±9,75 (5,3-36,37)	
Cinsiyet	Erkek (n=28)	16,89±12,13 (5,22-41,33)	0,996
	Kadın (n=52)	15,93±10,56 (4,37-45,22)	
Atak	Yok (n=24)	6,57±1,06 (4,37-9,82)	<0,001
	Var (n=16)	27,37±10,34 (10,41-45,22)	
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	22,00±15,74 (5,22-45,22)	0,271
	2 (n=18)	11,62±8,73 (4,37-31,28)	
	3 (n=8)	9,81±4,80 (6,1-18,72)	
Piramidal Atak	0 (n=17)	16,62±11,93 (6-41,33)	0,536
	1 (n=18)	14,94±13,71 (5,22-45,22)	
	2 (n=4)	9,17±4,98 (4,37-15,62)	
	3 (n=1)	7,47±0,0 (7,47-7,47)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	15,80±13,44 (4,37-45,22)	0,862
	1 (n=14)	13,79±10,20 (6-34,54)	
	3 (n=1)	7,47±0,0 (7,47-7,47)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	15,53±12,45 (4,37-45,22)	0,778
	1 (n=3)	7,04±0,52 (6,46-7,47)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	16,41±12,93 (4,37-45,22)	0,323
	1 (n=9)	9,65±7,47 (5,7-29,19)	

Tablo 4.10 (devam). Katılımcı özelliklerinde HSPA1A düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Optik Atak	0 (n=17)	16,12±14,72 (4,37-45,22)	0,908
	1 (n=19)	14,30±10,88 (5,22-41,33)	
	2 (n=4)	12,47±6,50 (6,78-18,72)	
Sigara	Hayır (n=19)	14,29±12,39 (5,22-43,8)	0,776
	Evet (n=21)	15,43±12,27 (4,37-45,22)	

Katılımcıların HSPA1A düzeyleri değişkeninde farkı incelendiğinde, hasta-kontrol arasında ve atak dönemindeki hastalarda istatistiksel farklılık vardır. Kontrol grubunda $17,61 \pm 9,75$ istatistikleri ile hasta grubunda $14,89 \pm 12,18$ istatistiklerinin elde edilmesi; kontrol grubunun hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek HSPA1A ölçümüne sahiptir. Atak dönemindeki hastalarda $27,37 \pm 10,34$ ve remisyon dönemindeki hastalarda $6,57 \pm 1,06$ hesaplanması ile atak dönemindeki hastalar istatistiksel olarak daha yüksek HSPA1A ölçümüne sahiptir. Hasta ve Kontrol grupları cinsiyete göre ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.11’de yer almaktadır.

Tablo 4.11. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSPA1A düzeyleri farkı.

Hasta-Kontrol	Cinsiyet	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Kontrol	Erkek (n=14)	16,52±10,61 (6,13-36,37)	0,59
	Kadın (n=26)	18,19±9,43 (5,3-34,14)	
Hasta	Erkek (n=14)	16,89±13,54 (5,22-41,33)	0,999
	Kadın (n=26)	13,82±11,51 (4,37-45,22)	
p (Erkek)		0,335	
p (Kadın)		0,019	

Cinsiyet açısından yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda erkekler ($16,52 \pm 10,61$) ve kadınlar ($18,19 \pm 9,43$) arasında HSPA1A düzeylerinde anlamlı fark yoktur. Benzer şekilde hasta grubunda da erkekler ($16,89 \pm 13,54$) ve kadınlar ($13,82 \pm 11,51$) arasında HSPA1A düzeylerinde anlamlı fark yoktur. Ek olarak cinsiyetlerin kendi içerisinde hasta-kontrol gruplarında farkı incelenmiştir. Bu incelemede erkeklerde anlamlı bir fark hesaplanamasa da kadınlarda hasta grubunun HSPA1A düzeyinin kontrol grubundaki

kadınlara göre istatistiksel olarak düşük olduğu hesaplanmıştır. HSPA1A düzeyleri arasındaki farklılık kontrol grubu, atak geçiren hastalar ve atak geçirmeyen hastalar arasında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.12. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSPA1A düzeyleri farkı.

Değişkenler		Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Atak	Yok (n=24)	6,57±1,06 (4,37-9,82)	<0,001 ^a
	Var (n=16)	27,37±10,34 (10,41-45,22)	
Kontrol (n=40)		17,61±9,75 (5,3-36,37)	
a: p _{Atak (Yok)-Atak (Var)} <0,001; p _{Atak (Yok)-Kontrol} <0,001; p _{Atak (Var)-Kontrol} =0,003			

HSPA1A düzeylerinde atak dönemi, remisyon dönemi ve kontrol gruplarındaki katılımcılar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. İkili karşılaştırmalarda ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Katılımcıların özelliklerine göre HSPA8 düzeyleri fark analizleri Tablo 4.13’te verilmektedir.

Tablo 4.13. Katılımcı özelliklerinde HSPA8 düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Hasta-Kontrol	Hasta (n=40)	6,91±5,95 (1,16-18,74)	0,011
	Kontrol (n=40)	9,03±5,28 (2,27-18,36)	
Cinsiyet	Erkek (n=28)	8,19±6,38 (1,62-18,36)	0,839
	Kadın (n=52)	7,86±5,37 (1,16-18,74)	
Atak	Yok (n=24)	2,54±0,65 (1,16-3,77)	<0,001
	Var (n=16)	13,48±3,85 (5,51-18,74)	
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	9,96±7,07 (1,62-18,74)	0,222
	2 (n=18)	5,60±5,24 (1,16-16,82)	
	3 (n=8)	4,55±2,96 (2,22-9,89)	

Tablo 4.13 (devam). Katılımcı özelliklerinde HSPA8 düzeyleri farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±Ss. (Min.-Maks.)	p
Piramidal Atak	0 (n=17)	7,95±6,12 (1,67-17,68)	0,666
	1 (n=18)	6,76±6,36 (1,62-18,74)	
	2 (n=4)	4,25±3,14 (1,16-8,05)	
	3 (n=1)	2,69±0,0 (2,69-2,69)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	7,15±6,31 (1,16-18,74)	0,884
	1 (n=14)	6,8±5,59 (2,06-15,9)	
	3 (n=1)	2,69±0,0 (2,69-2,69)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	7,28±6,05 (1,16-18,74)	0,13
	1 (n=3)	2,39±0,26 (2,22-2,69)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	7,59±6,17 (1,16-18,74)	0,486
	1 (n=9)	4,58±4,72 (1,67-16,82)	
Optik Atak	0 (n=17)	7,30±6,84 (1,16-18,74)	0,951
	1 (n=19)	6,70±5,67 (1,62-17,68)	
	2 (n=4)	6,30±4,03 (2,65-9,89)	
Sigara	Hayır (n=19)	6,60±6,05 (1,62-18,74)	0,675
	Evet (n=21)	7,20±6,00 (1,16-16,82)	

Katılımcıların HSPA8 düzeylerinin değişkeninde farkı incelendiğinde, hasta-kontrol arasında ve atak dönemindeki hastalarda farklılık olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda $9,03\pm5,28$ ile hasta grubunda $6,91\pm5,95$ istatistiklerini elde edilmiştir. Kontrol grubu hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek HSPA8 ölçümüne sahiptir. Atak dönemindeki hastalarda $13,48\pm3,85$ ve remisyon dönemindeki hastalarda $2,54\pm0,65$ hesaplanmış olup atak dönemindeki hastalar istatistiksel olarak daha yüksek HSPA8 düzeylerine sahiptir. Hasta ve Kontrol grupları cinsiyete göre ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.14'te yer almaktadır.

Tablo 4.14. Hasta-kontrol gruplarında cinsiyete göre HSPA8 düzeyleri farkı.

Hasta-Kontrol	Cinsiyet	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Kontrol	Erkek (n=14)	8,34±5,58 (2,63-18,36)	0,444
	Kadın (n=26)	9,41±5,19 (2,27-17,84)	
Hasta	Erkek (n=14)	7,92±7,1 (1,62-17,68)	0,865
	Kadın (n=26)	6,37±5,31 (1,16-18,74)	
p (Erkek)		0,251	
p (Kadın)		0,014	

Cinsiyet açısından yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda erkekler (8,34±5,58) ve kadınlar (9,41±5,19) arasında HSPA8 düzeylerinde anlamlı fark yoktur. Benzer şekilde hasta grubunda da erkekler (7,92±7,1) ve kadınlar (6,37±5,31) arasında HSPA8 düzeylerinde anlamlı fark yoktur. Ek olarak cinsiyetlerin kendi içerisinde hasta-kontrol gruplarında farkı incelenmiştir. Bu incelemede erkeklerde anlamlı bir fark olmayıp kadınlarda hasta grubunun HSPA8 düzeyinin kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak düşük olduğu hesaplanmıştır. HSPA8 düzeyleri arasındaki farklılık kontrol grubu, atak dönemindeki hastalar ve remisyonadaki hastalar arasında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. Hasta-kontrol ve atak dönemine göre HSPA8 düzeyleri farkı.

Hasta.Kontrol		Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
Atak	Yok (n=24)	2,54±0,65 (1,16-3,77)	<0,001
	Var (n=16)	13,48±3,85 (5,51-18,74)	
Kontrol (n=40)		9,03±5,28 (2,27-18,36)	
a: p _{Atak (Yok)-Atak (Var)} <0,001; p _{Atak (Yok)-Kontrol} <0,001; p _{Atak (Var)-Kontrol} =0,005			

Atak dönemindeki, remisyonadaki hastalar ve kontrol gruplarındaki katılımcıların HSPA8 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. İkili karşılaştırmalarda ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu anlaşılmıştır. Katılımcıların özelliklerine ve hastalık süresine göre fark analizleri Tablo 4.16'da verilmektedir.

Tablo 4.16. Hasta özelliklerinde hastalık süresi farkı.

Değişken	Kategori	Ort.±Ss. (Min.-Maks.)	p
Cinsiyet	Erkek (n=14)	22,00±28,48 (1-108)	0,468
	Kadın (n=26)	31,19±38,66 (1-120)	
Atak	Yok (n=24)	38,75±40,76 (3-120)	0,018
	Var (n=16)	11,81±15,26 (1-60)	
Toplam Atak Sayısı	1 (n=14)	17,07±28,53 (1-108)	0,005 ^a
	2 (n=18)	25,56±36,69 (1-120)	
	3 (n=8)	52,50±35,10 (12-120)	
Piramidal.Atak	0 (n=17)	27,47±39,14 (1-120)	0,635
	1 (n=18)	26,89±35,19 (1-120)	
	2 (n=4)	27,00±26,15 (6-60)	
	3 (n=1)	60,00±0,0 (60-60)	
Duyusal Atak	0 (n=25)	20,48±26,7 (1-108)	0,136
	1 (n=14)	39,07±45,92 (1-120)	
	3 (n=1)	60,00±0,0 (60-60)	
Serebellar Atak	0 (n=37)	26,35±36,16 (1-120)	0,070
	1 (n=3)	48,00±12,00 (36-60)	
Beyin Sapı Atak	0 (n=31)	24,00±33,57 (1-120)	0,190
	1 (n=9)	41,67±39,81 (3-120)	
Optik Atak	0 (n=17)	25,65±35,80 (1-120)	0,573
	1 (n=19)	25,16±30,31 (1-120)	
	2 (n=4)	51,25±55,45 (1-120)	
Sigara	Hayır (n=19)	35,26±43,24 (1-120)	0,561
	Evet (n=21)	21,38±25,58 (1-108)	
a: p ₁₋₃ =0,001; p ₂₋₃ =0,019			

Hastalık sürelerinin hasta özelliklerine göre farklı olup olmadığı Tablo...’da gösterilmiştir. Hastalık süresi ay cinsinden hesaplanmış olup atak dönemindekilerde

11,81±15,26 ve remisyon dönemindeki hastalarda 38,75±40,76'dır. Buna göre, remisyon dönemindeki hastaların, hastalık süresi ortalamasının atak dönemindeki hastalardan istatistiksel olarak yüksek olduğu hesaplanmıştır. Toplam atak sayısında hastalık süresi değişkeninin farklı olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Toplam atak sayısı 1 olan hastalarda 17,07±28,53; 2 olan hastalarda 25,56±36,69 ve 3 olan hastalarda 52,50±35,10 hesaplanan hastalık süresi; atak sayısı 1 ve atak sayısı 3 ($p=0,001$) ile atak sayısı 2 ve atak sayısı 3 olanlarda istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ($p=0,019$).

4.2. KORELASYON ANALİZİ

Hastaların EDSS'leri ile serum ısı şok proteinleri arasındaki korelasyon analiz sonuçları Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17. EDSS ve proteinler arasındaki η^2 sonuçları.

Protein	EDSS
HSP90-AB1	0,590
HSP90-AA2	0,734
HSP70-HSPA1A	0,782
HSP70-HSPA8	0,773

Elde edilen sonuçlara göre EDSS ile HSP90-AB1 arasında pozitif yönlü orta dereceli bir ilişki olduğu hesaplanmıştır. Dolayısıyla, EDSS skorlarının HSP90-AB1 değerlerini bir miktar etkilediğini, ancak bu etkinin çok büyük olmadığını gösterir. EDSS ile diğer proteinler arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki olduğu hesaplanmıştır. Böylelikle, EDSS skorlarının HSP90-AA2, HSP70-HSPA1A ve HSP70-HSPA8 değerlerini önemli ölçüde etkilediği anlaşılmaktadır. Sürekli değişkenlerin eş hareketlerini incelemek amacıyla hasta ve kontrol gruplarına ayrı ayrı korelasyon analizi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.18 ve Tablo 4.19'da gösterilmektedir.

Tablo 4.18. Atak sonrası geçen süreye göre hastaların dağılımı.

Atak Sonrası Geçen Süre	n	%
3-6 Ay	9	37,5%
6-12 Ay	7	29,2%
12+ Ay	8	33,3%
Toplam	24	100,0%

Tablo 4.19. Atak sonrası süreye göre ısı şok proteinleri ölçüm farkı.

Değişken	Atak Sonrası Geçen Süre	Ort.±.Ss. (Min.-Maks.)	p
HSP90AB1	3-6 Ay (n=9)	4,43±4,29 (2,06-15,70)	<0,001 ^a
	6-12 Ay (n=7)	2,82±,45 (1,99-3,46)	
	12+ Ay (n=8)	2,74±,25 (2,41-3,04)	
	Atak (n=16)	9,63±3,92 (2,94-15,71)	
HSP90AA2	3-6 Ay (n=9)	5,00±,98 (3,15-6,15)	<0,001 ^b
	6-12 Ay (n=7)	4,25±,67 (3,21-5,13)	
	12+ Ay (n=8)	4,66±,45 (4,14-5,55)	
	Atak (n=16)	21,90±8,20 (8,42-33,55)	
HSPA1A	3-6 Ay (n=9)	7,22±1,33 (5,22-9,82)	<0,001 ^c
	6-12 Ay (n=7)	5,96±,80 (4,37-6,78)	
	12+ Ay (n=8)	6,38±,39 (5,70-6,95)	
	Atak (n=16)	27,37±10,34 (10,41-45,22)	
HSPA8	3-6 Ay (n=9)	2,63±,81 (1,62-3,77)	<0,001 ^d
	6-12 Ay (n=7)	2,39±,68 (1,16-3,37)	
	12+ Ay (n=8)	2,56±,46 (2,03-3,47)	
	Atak (n=16)	13,48±3,85 (5,51-18,74)	
a: p _{3-6 Ay-Atak} <0,001; p _{6-12 Ay-Atak} <0,001; p _{12+ Ay-Atak} <0,001			
b: p _{3-6 Ay-Atak} <0,001; p _{6-12 Ay-Atak} <0,001; p _{12+ Ay-Atak} <0,001			
c: p _{3-6 Ay-6-12 Ay} <0,001; p _{3-6 Ay-Atak} <0,001; p _{6-12 Ay-Atak} <0,001; p _{12+ Ay-Atak} <0,001			
d: p _{3-6 Ay-Atak} <0,001; p _{6-12 Ay-Atak} <0,001; p _{12+ Ay-Atak} <0,001			

Hastaların atak geçirmeleri sonrasındaki sürelerle göre yapılan fark analizinde; süre ile tüm ısı şok protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar hesaplanmıştır. Buna göre, tüm grupların ısı şok proteinlerinde atak geçiren gruptan istatistiksel olarak düşük olduğu hesaplanmıştır (p<0,05). Ek olarak HSPA1A ölçümünde 3-6 Ay ve 6-12 ay grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık hesaplanmıştır.

Tablo 4.20. Kontrol grubunda korelasyon analizi sonuçları.

Değişken	İstatistik	Yaş	HSP90.AB1	HSP90.AA2	HSP70.HSPA1A
HSP90AB1	r	-0,194	1		
	p	0,23	-		
HSP90AA2	r	0,252	0,333	1	
	p	0,116	0,036	-	
HSPA1A	r	0,214	0,281	0,918	1
	p	0,185	0,079	<0,001	-
HSPA8	r	0,253	0,331	0,984	0,919
	p	0,116	0,037	<0,001	<0,001

Kontrol grubunda yer alan katılımcıların korelasyon sonuçları yaş, HSP90AB1, HSP90AA2, HSPA1A ve HSPA8 arasında gerçekleştirilmiştir. Yaşın herhangi bir değişken ile ilişkili olmadığı anlaşılmaktadır. HSP90AA2 ile HSP90AB1 arasında pozitif yönlü zayıf bir ilişki hesaplanmıştır. HSPA1A ile HSP90AA2 arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki hesaplanmıştır. HSPA8 ile HSP90AB1 arasında pozitif yönlü zayıf bir ilişki; HSP90AA2 ve HSPA1A değişkenleri arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki hesaplanmıştır. Hasta grubunda yapılan korelasyon analizi Tablo 4.21’de yer almaktadır.

Tablo 4.21. Hasta grubunda korelasyon analizi sonuçları.

Değişken	İstatistik	Yaş	IGG	HSP90.AB1	HSP90.AA2	HSP70.HSPA1A	HSP70.HSPA8
IGG	r	-0,145	1				
	p	0,373	-				
HSP90AB1	r	-0,222	-0,128	1			
	p	0,168	0,431	-			
HSP90AA2	r	-0,285	-0,079	0,829	1		
	p	0,075	0,628	<0,001	-		
HSPA1A	r	-0,275	-0,066	0,799	0,943	1	
	p	0,086	0,686	<0,001	<0,001	-	
HSPA8	r	-0,286	-0,108	0,818	0,928	0,927	1
	p	0,073	0,508	<0,001	<0,001	<0,001	-
Süre.Ay	r	0,303	0,042	-0,267	-0,284	-0,194	-0,24
	p	0,057	0,796	0,096	0,076	0,231	0,136

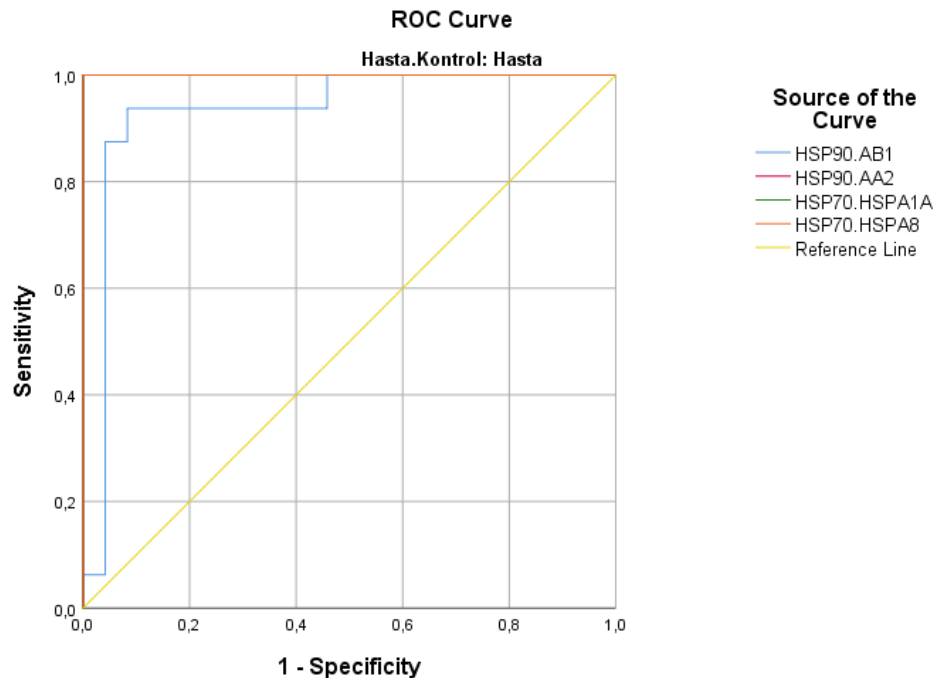
Hasta grubunda yer alan katılımcıların korelasyon sonuçları yaş, IgG indeksi, HSP90AB1, HSP90AA2, HSPA1A, HSPA8 ve hastalık süresi ile gerçekleştirilmiştir. Yaş, IgG indeksi değerleri ve hastalık süresini herhangi bir değişken ile ilişkili olmadığı anlaşılmaktadır. HSP90AA2 ile HSP90AB1 arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki hesaplanmıştır. HSPA1A ile HSP90AB1 arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki; HSP90AA2 değişkeni arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki hesaplanmıştır. HSPA8 ile HSP90AB1 arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki; HSP90AA2 ve HSPA1A değişkenleri arasında pozitif yönlü çok güçlü bir ilişki hesaplanmıştır.

4.3. ROC ANALİZİ SONUÇLARI

Hasta kontrol arasındaki değişimin hesaplandığı ROC analizi sonuçları Tablo 4.22’de ve Şekil 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.22. Hasta grubunda atak durumunun ROC analiz sonuçları.

Değişken	Alan	Sdt. Hata	p	%95 Güven Aralığı		Duyarlılık	Özgüllük	Eşik Değer
				Alt Sınır	Üst Sınır			
HSP90AB1	0,932	0,046	<0,001	0,842	1,000	93,8%	91,7%	4,08
HSP90AA2	1,000	0,000	<0,001	1,000	1,000	100,0%	100,0%	7,28
HSPA1A	1,000	0,000	<0,001	1,000	1,000	100,0%	100,0%	10,12
HSPA8	1,000	0,000	<0,001	1,000	1,000	100,0%	100,0%	4,64

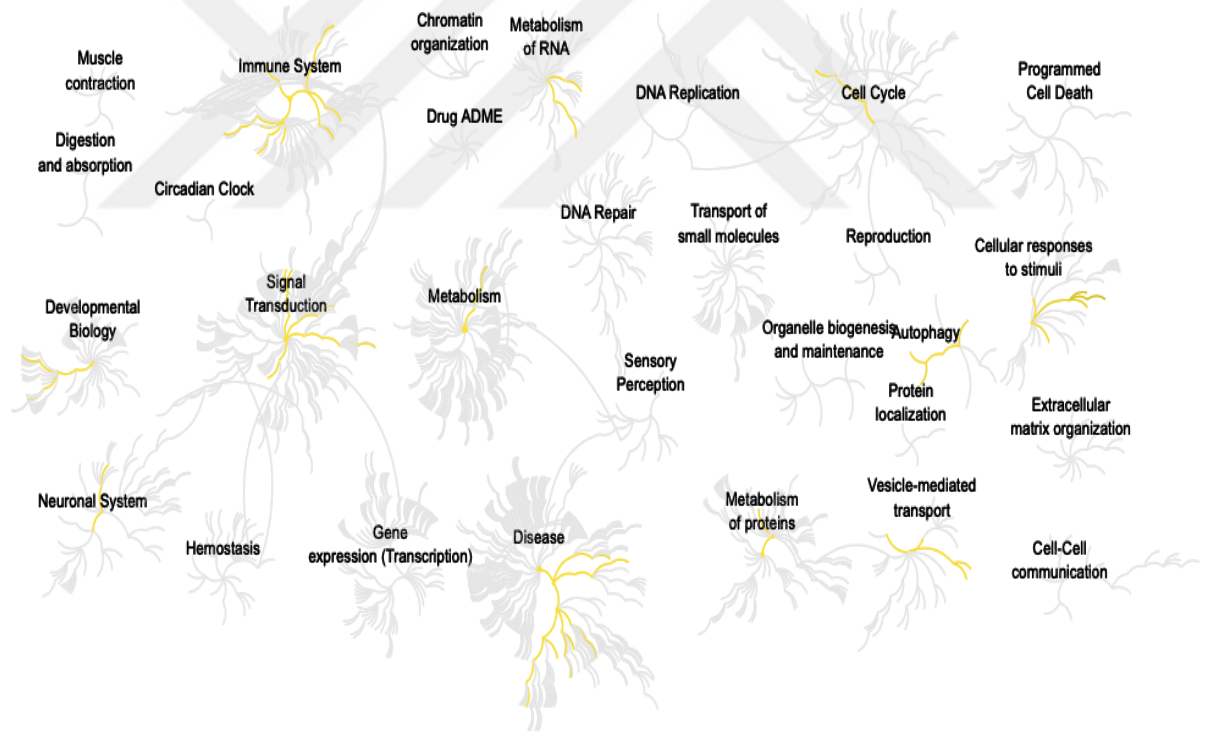


Şekil 4.1. Hasta grubunda atak durumunun ROC analiz sonuçları.

Isı şok proteinlerinin değerlerine göre katılımcıların atak dönemi ya da remisyon grubuna ait olmalarını incelemek ve bu duruma karar verebilmek için eşik değer hesaplanmıştır. ROC analizi sonuçlarına göre tüm ısı şok proteinlerinde atak durumu ve remisyon dönemi ayrımının yapılabileceği bir eşik değerin olduğu hesaplanmıştır ($p < 0,05$). HSP90AB1 düzeyinin 4,08 eşik değerinin üstüne çıkması ile %93,2 ihtimalle atak grubuna dahil olunabileceği hesaplanmıştır. HSP90AA2 düzeyinin 7,28 eşik değerinin üstüne çıkması ile %100 ihtimalle atak grubuna dahil olunabileceği hesaplanmıştır. HSPA1A düzeyinin 10,12 eşik değerinin üstüne çıkması ile %100 ihtimalle atak grubuna dahil olunabileceği hesaplanmıştır. HSPA8 düzeyinin 4,64 eşik değerinin üstüne çıkması ile %100 ihtimalle atak grubuna dahil olunabileceği hesaplanmıştır.

4.4. HSP GEN İFADELERİNİN ANALİZİ

Gen düzeylerinin Reactome ve Enrichr veri tabanında yapılan istatistikleri Şekil 4.2 ve Tablo 4.23 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Reactome veri tabanından elde edilen sinyal yolları analizi.

Tablo 4.23. Enrichr veri tabanı kullanılarak elde edilen tablo.

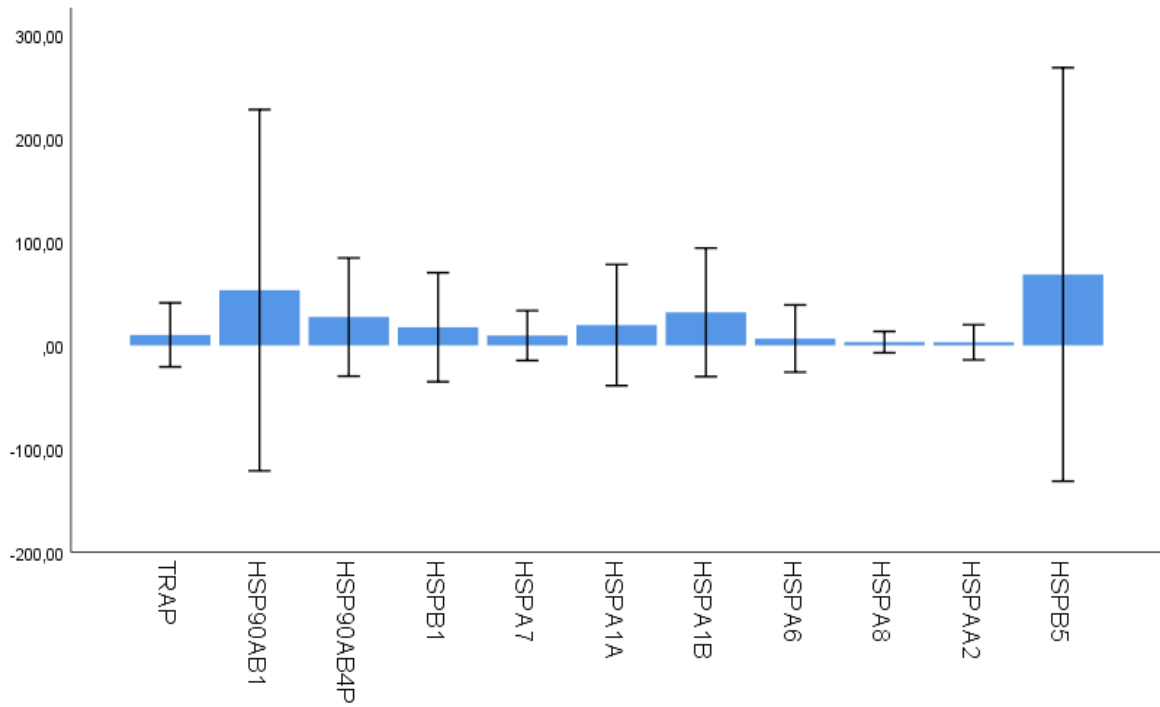
Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Comblned score
1	Antigen processing and presentation	4.356e-10	2.614e-8	218.34	4706.23
2	Protein processing in the endoplasmic reticulum	1.645e-8	4.936e-7	102.63	1839.40
3	Mitochondrial pathvvay of apoptosis: multidomain Bcl-2 family	4.721 e-8	9.442e-7	169.91	2866.17
4	MAPK signaling pathvvay	3.951 e-7	0.000005926	53.07	782.54
5	Spliceosome	4.943e-7	0.000005932	92.29	1340.10
6	Endocytosis	0.000003092	0.00003092	57.41	728.34
7	Destabilization of mRNAby AUF1 (hnRNP DO)	0.000005557	0.00004763	118.61	1435.20
8	BDNF signaling pathvvay	0.000008703	0.00005903	43.87	511.21
9	Mitochondrial pathvvay of apoptosis: caspases	0.000008854	0.00005903	100.92	1174.17
10	mRNA stability regulation by proteins that bind AU-rich elements	0.00001235	0.00007412	89.94	1016.42

Tablo 4.24. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile belirlenen gen ifadelerinin ısı haritası üzerinde gösterimi.

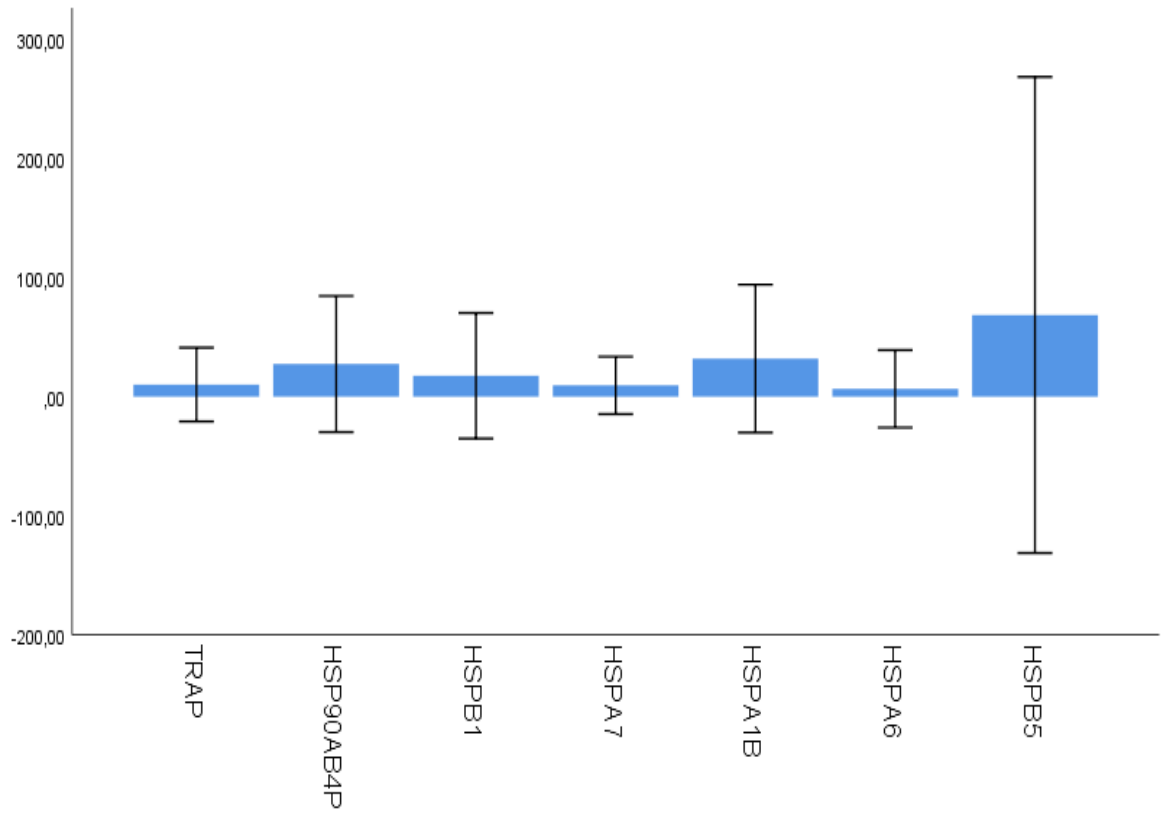
	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	HASTA 4	HASTA 5	HASTA 6	ORTALAMA
TRAP	1,563739	23,26356	1,356604	35,38338	-3,23777	2,411616	10,123522
HSP90AB1	1,952064	79,89316	6,588728	1,664397	220,5558	9,38268	53,339473
HSP90AB4P	-9,61309	27,28432	27,47409	1,160704	61,60604	56,49299	27,400844
HSPB1	1,342573	69,55103	19,29293	3,351949	2,181015	9,57983	17,549887
HSPA7	2,020903	13,92881	32	6,168843	1,479388	1,22264	9,4700972
HSPA1A	1,783857	64,44516	42,51795	23,02294	-9,88335	-3,78423	19,683719
HSPAİB	3,215404	30,48442	13,17746	68,83164	71,25898	4,85678	31,97078
HSPA6	3,171137	21,25897	25,10669	12,95108	-6,75053	-16,4498	6,5479214
HSPA8	-1,3333	13,45434	1,404445	2,337554	1,428994	2,013911	3,2176581
HSPAA2	-3,02095	7,568461	18,37917	-1,97931	-1,69937	-1,39474	2,9755438
HSPB5		205,0739	174,8532	-3,47015	-26,2637	-7,4127	68,55609

Çalışmanın hasta grubunda kontrol grubuna göre kıyasla tüm gen ekspresyonları artış göstermiştir. TRAP (10,12 kat), HSP90AB1 (53,33 kat), HSP90AB4P (27,40 kat), HSPB1 (17,54 kat), HSPA7 (9,47 kat), HSPA1A (19,68 kat), HSPA1B (31,97 kat), HSPA6 (6,54 kat), HSPA8 (3,21 kat), HSPAA2 (2,97 kat), HSPB5 (68,55 kat) ekspresyon seviyelerinin artış gösterdiği izlenmiştir.

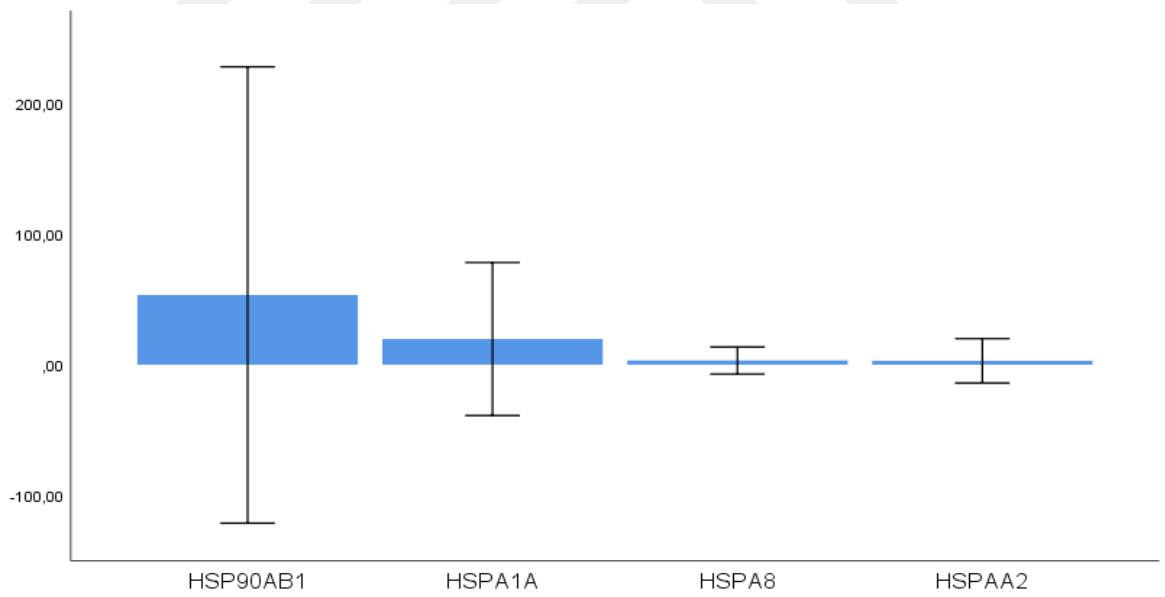
Araştırmada kullanılan genlerin göreceli gen ifadelerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) karşılaştırmaları Şekil 4.3 Şekil 4.4, Şekil 4.5'teki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Göreceli gen ifadeleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) –1.



Şekil 4.4. Göreceli gen ifadeleri (2-ΔΔCT) –2.



Şekil 4.5. Göreceli gen ifadeleri (2-ΔΔCT) –3.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, merkezi sinir sisteminin enflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklarında üzerinde yoğun araştırmaların olduğu ısı şok proteinlerinden HSP-70 ve HSP-90'ın multipl sklerozda inflamasyonun en yoğun olduğu atak döneminde, patogenezinde olası rolünü araştırmak ve bu proteinler ile ilişkili genlerin değişimini ortaya koymaktır.

Araştırmamız yöntem olarak gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) ve ELISA'dan oluşmaktadır. Çalışmada RT-PCR yöntemi ile son 30 gün içerisinde MS atağı geçirmiş olan hastalarda; TRAP, HSP90AB1, HSP90AB4P, HSPB1, HSPA7, HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HSPA8, HSP90AA2, HSPB5 genlerinin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyelerindeki değişimi saptamak amaçlanmıştır. Örnekler iki kopya halinde analiz edilmiş ve mRNA miktarı $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Çalışmanın ELISA kolunda ise HSP-70 ve 90'nın indüklenebilen HSPA1A ve HSP90AA2 ve konstitütif formları olan HSPA8 ve HSP90AB1'in ELISA yöntemi ile serum seviyeleri saptanmaya çalışılmış, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Hastalığın özellikle en yüksek enflamatuvar aktiviteye sahip olan atak döneminde, remisyonadaki hasta grubuna ve sağlıklı kontrollere göre değişimi görmek amaçlanmıştır.

Hasta ve kontrol grubunda kadın-erkek katılımcı sayısı eşit tutulmuştur. Hastaların %35 erkek, %65 kadındır. Literatürde MS hastalarında kadın cinsiyet baskınlığı 2-3:1 oranı arasında bildirilmiş olup hasta grubumuz ile uyumlu saptanmıştır (38).

Glukokortikoid tedavileri hücre ve hayvan çalışmalarında HSF1'i ve HSF aracılı HSR'yi aktive etmekte ve bunun sonucunda HSP70 düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Aynı şekilde deksametazonun HSP90 inhibitörü olduğu bilinmektedir (154). Çalışma sonuçlarının etkilenmemesi adına hasta grubu herhangi bir immünsüpresan tedavi almamış olan hastalardan oluşturulmuştur.

Çalışmamızda atak döneminde olan MS hastalarının, serum ELISA HSP90AB1, HSP90AA2, HSPA1A, HSPA8 seviyeleri, remisyon grubu ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Total hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise serum HSP90AB1 ($p=0,045$), HSP90AA2 ($p=0,005$),

HSPA1A(p=0,018), HSPA8 (p=0,011) seviyeleri istatistiksel olarak sağlıklı kontrol grubundan düşük saptanmıştır. Bu farkın ana sebebinin MS'in remisyon dönemindeki hasta grubunun serum ısı şok protein düzeylerinin çok düşük olmasından kaynaklandığı görülmektedir.

Özellikle MS atak grubundaki bu bulguların, HSP'lerin şaperon aktivitelerinin ön plana çıkarak MS atağı sırasında proteinlerin yanlış katlanmasını ve birikmesini önlemek için nöroprotektif bir yanıt olarak artmış olduğunu düşündürebilir (139, 155). İndüklenebilir HSP70 seviyeleri hücre homeostazdayken düşüktür; ancak hücrenin hasar alması durumunda ekspresyonunu büyük ölçüde artırır. Bu nedenle, HSP70'in hücrelerde bir stres belirteci olduğu gösterilmiştir (139, 156). Çalışmamızda atak dönemindeki hasta grubunda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyumludur.

HSP gen regülasyonu HSF1 ile sağlanır. Hücredeki akut stres durumunda, katlanmamış proteinlerin konsantrasyonu HSP70'in protein katlama kapasitesini aşar. HSP70, HSF1'den uzaklaşarak HSF1'i daha fazla HSP70 indüklemesi için serbest bırakır. Proteostazı yeniden sağlamak için yeterli HSP70 üretildiğinde, HSP70 HSF1'i bağlar ve devre dışı bırakır. HSF1'in HSP70 ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediği ve HSP70'in HSF1 aktivitesini negatif olarak düzenlediği modellenmiştir (157, 158). Aynı zamanda HSP90'ın HSF1 aktivitesini kontrol eden ana düzenleyicilerden biri olarak işlev gördüğü, HSP70'e benzer şekilde, hücre havuzunda HSP90 miktarının artışı ile HSF-1 miktarının azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla kendi ekspresyonlarının negatif düzenleyicileri olduğu öne sürülmüştür (158).

Akut stres döneminden sonra yüksek miktarda eksprese edilen bu proteinlerin negatif geri besleme ile HSF üzerinden kendi sentezini azalttığı sonucu çıkmaktadır. Özellikle akut ve ciddi hücresel stres sonrasında üretilen HSP'ler sitoplazmada çok yüksek düzeylere ulaştığında, HSF-1'i deaktive ederek kendi üretimini de ciddi oranda baskılamaktadır. HSF-1 'in sürekli devam eden yüksek ekspresyonu organizma için tehdit oluşturur bu inflamatuvar hastalıkların ve karsinogenezin altında yatan patolojilerden biridir (157). Bazı çalışmalar, MS hastalarında HSP70 seviyelerindeki artışın daha ciddi hastalık sonuçlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (159). Bu durum remisyon dönemindeki hastalarımızda incelediğimiz tüm ısı şok proteinlerindeki serum seviyelerinde izlenen baskılanmayı açıklayabilir.

Remisyon dönemindeki hastalarda, en son ataklarının üzerinden geçen süreye göre HSPA1A, HSPA8, HSP90AA2, HSP90AB1 serum ELISA seviyeleri arasında yapılan fark analizinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar hesaplanmıştır. Ataktan sonraki ısı şok

proteinlerinin seviyelerindeki belirgin düşüş 3.aydan sonraki grupta görülmektedir ($p<0,05$). Bu azalma diğer aylarda da sabit kalmakta daha da artmamaktadır.

HSP70'in serum seviyesinin KIS ve RRMS hasta grubunda incelendiği bir çalışmada, atak ve remisyon grubu karşılaştırıldığında, HSP70 serum düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Söz konusu çalışmanın atak grubundaki 8 hastanın atak tedavisi nedeniyle kortikosteroid aldığı ve 22 hastanın ise DMT kullandığı not edilmiştir. Çalışmanın sonucunda KIS ve RRMS grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek serum HSP70 seviyeleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada progresif hasta grubunun dahil edilmesi ile daha yüksek EDSS ve hastalık süreleri elde edilmiştir ve özellikle progresif hasta grubunda daha yüksek HSP70 seviyeleri saptandığı belirtilmiştir. Bu söz konusu çalışmada remisyon gruplarındaki yüksek HSP70 sonuçlarını açıklayabilir. Öncelikle çalışmamız hasta grubunun herhangi bir medikal tedavi almamış olması ile bu çalışmadan farklılaşmaktadır. Araştırmamızda çalışma gruplarında toplam hastalık süresi daha kısadır ve hastaların EDSS'leri daha düşüktür. Bu çalışma ile benzer şekilde bizim çalışmamızda da HSP70 seviyeleri yaş ve cinsiyet ile anlamlı şekilde değişmemiştir (159).

HSP70'i kodlayan üç gen (HSPA1A, HSPA1B ve HSP-HOM) HLA sınıf III alt bölgesinde (kromozom 6p21.3) bulunur ve HSPA1A ile HSPA1B %99 oranında aynıdır (148). HSP70 ailesinin stres ile en çok indüklenen proteinlerin iki üyesi HSPA1A ve HSPA1B geni tarafından, İndüklenebilir olmayan protein formu (yani HSP70-hom) HSPA1L geni tarafından kodlanır (161). HSP 70 büyük ölçüde eksprese edildiğinde hücre dışı ortama salınmaktadır. HSP70'lerin aşırı ekspresyonu inme, epilepsi, Alzheimer ve Parkinson hastalığında koruyucu bir rol ile ilişkilendirilmiştir (162).

MS gibi otoinflamatuvar hastalıklarda literatürde çelişkili durumlar mevcuttur. Gerçekten de HSP'lerin ılımlı yüksekliği koruyucu bir rol ile ilişkilendirilebilir, ancak HSP'lerin güçlü bir yukarı regülasyonu bağışıklık sistemini tetikleyen bir uyarı sinyali olarak hareket edebilir (163). Yüksek miktarda salınan HSPA1A, T hücrelerle hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla etkileşime girerek bağlanabilir. Hücre dışı HSPA1A'nın miyelin peptitlerine karşı gelişen otoimmün yanıtta bir adjuvan görevi görüp, proinflamatuvar bir sitokin olarak hareket ederek immün yanıtı şiddetlendirebilir. HSPA1A'nın MHC sınıf I ve sınıf II ilişkili yolaklar üzerinden T hücre aracılı antijen sunumunu arttırdığı bildirilmiştir (141, 164).

Isı Şoku Proteini 90'ın bir üyesi olan HSP90AB1, HSP70 ile antijen sunumu sürecinde yer alır. HSP70'in aşırı ekspresyonu miyelinelere karşı oto-antijen sunumunu teşvik ediyor gibi görünmektedir (163). HSP70'in MS beyin dokusunda MBP ile spesifik olarak

birleştğini gösterilmiştir. Bu ilişki, MS’de MBP’nin bağışıklık sistemi tarafından daha fazla tanınmasıyla da ilgili olabilir (165). HSP 70 indüksiyonu ilk olarak bir inme modelinde çalışılmıştır, global iskemi modellerinde de benzer olarak iskemiden en çok etkilenen alanlarda HSP70 mRNA’sının tespit edilmesine rağmen proteinin indüklenmemesi, HSP70 ekspresyonunun hasarın bir epifenomeni mi olduğu yoksa hücrenin hayatta kalmasını mı kolaylaştırdığı konusunda tartışma yaratmıştır (143).

Mansilla ve ark. MS hastalarının PBMC’lerinde sağlıklı kontrollere kıyasla HSPA1A geninin artmış ekspresyonunu saptamışlardır. Gen ekspresyon bulgularının, T lenfositlerde (CD4 ve CD8) ve monositlerde HSP70-1A/B’nin artmış protein ekspresyonu ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir (166). Çalışmamızda benzer şekilde HSPA1A geninin total kan RNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla 19,68 kat artmış olduğunu saptadık, atak döneminde olan bu hastaların serum HSPA1A ELISA düzeyleri remisyon ($p<0,001$) ve kontrol grubuna ($p<0,003$) kıyasla anlamlı derecede yüksek saptandı.

HSP70 ‘nın hücre içerisinde protein-protein etkileşim yoluyla nükleer faktör-kB ile etkileşime girdiği bulunmuştur (167). HSP70, proinflamatuvar yanıtı zayıflatan, NF-kB inhibisyonundan sorumludur. İnme modelleri ve TNF-alfa ile indüklenen apoptoz modellerinde NF-kB’nin inhibisyonu, çeşitli immün genlerin transkripsiyonunun azalmasına, nöroproteksiyona yol açmıştır. Bu yanıtı indüklenabilir nitrik oksit düzeylerinin azalması da katkıda bulunmuştur (168, 169). EAE modellerinde ısı şok tepkisi sonrasında elde edilen sonuçlara paralel olarak; MS’da atak döneminde HSP70’in hücre içi aşırı ekspresyonunun, astrositlerde NF-kB aktivasyonunu azaltarak proinflamatuvar yanıtın modülasyonuna etki edebileceğini düşündürmektedir.

Enflamasyon MS’in tüm evrelerinde görülür. En fazla aktif plaklarda görülmekle beraber normal görülen ak madde, inaktif ya da yeniden miyelinize olan plaklarda da görülebilir (170). MS de gelişen kortikal atrofinin hastalığın en erken aşamalarından itibaren başladığı ve progresyon ile ilerlediği bilinmektedir (171). MS’in özellikle progresif döneminde daha sıklıkla izlenen yavaş genişleyen lezyonlar hastalığın patogenezinde kronik aktif inflamasyonun önemli bir yer kapladığını göstermektedir (96). Mansilla ve ark. MS hastalarında, lipopolisakkarit aracılı inflamatuvar uyarıdan sonra HSP70-1A/B protein ekspresyonuna, CD4 T lenfositlerinin yanı sıra monositlerin de azalmış yanıt gösterdiğine dair kanıtlar sağlamıştır. Bu durum özellikle hastalığın kronik inflamasyon fazında bağışıklık yanıtının değiştiğine işaret etmektedir ve MS hastalarında ise kronik stres durumuna işaret ediyor olabilir (166). Sözü geçen çalışma ile paralel olarak, remisyon dönemindeki hastaların serum HSP seviyelerinin atak döneminden sonra düşüş göstermesi;

akut ve şiddetli bir inflamasyon sonrası devam eden kronik enflamatuvar süreçte, değişken immün yanıtlar ile ilişkili olabilir.

Bir araştırmada MS ve motor nöron hastalığı (MNH) olan 25 hastanın BOS numunelerinde HSP70 ve HSC70 proteinlerine karşı gelişen antikor titreleri incelenmiştir. MS'li hastalardan elde edilen BOS'ta HSP70 ve HSC70 proteinlerine karşı antikor titreleri, MNH ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. HSP70'e karşı antikor titrelerinin progresif vakalarda remisyon vakalarına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir ancak bu çalışmada HSP'lerin serum düzeyleri incelenmemiştir. Stabil hastalık durumundaki MS hastaları ise kortikosteroid tedavisi altındadır. BOS'daki çeşitli HSP türlerine karşı oluşan bu antikorların patofizyolojik rolü hala net olmamakla birlikte anti HSP70 antikorları HSP70 aracılı antijen sunumunu değiştirebilir. HSP'ler anti-HSP antikorları tarafından modifiye edilebilir, inhibe edilebilir ya da güçlendirilebilir (172).

Postmortem MS ve sağlıklı beyin parankiminde yapılan bir çalışmada; HSP70 ailesinden HSPA1A, HSPA1B, HSPA7, HSPA6, HSPH1 ve HSPA4L'nin yukarı regülasyonu gösterilmiştir; bunlar arasında HSPA1A ve HSPA1B tüm beyin alanlarında yukarı regüle edilmiştir (163). Bizim çalışmamız bu çalışmadan farklı olarak stabilize edilmiş total kandan RNA izolasyonu ile yürütülmüş olup bu çalışmaya benzer şekilde HSPA1A, HSPA1B, HSPA6, HSPA7 genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış izlendi. HSP'lerin ekspresyonunda düşük düzeyde artış hücreleri stresten korurken, aşırı yukarı regülasyon MS gibi otoimmün inflamatuvar hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir. HSP'lerin güçlü yukarı regülasyonu bağışıklık sistemini tetikleyen bir uyarı sinyali olarak hareket edebilir (173).

Çalışmamızda atak grubunda HSPA8'in serum seviyesi kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) iken remisyon grubunda, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0.011$). RT-PCR sonuçlarımızda ise atak döneminde HSPA8 geninin ekspresyon seviyesinin 3,21 kat artmış olduğu izlenmiştir. Mycko ve arkadaşlarının çalışmasında normal koşullar altında, HSPA8'in miyelin kılıfının 2 ana miyelin proteininden biri olan MBP için bir şaperon görevi gördüğü gözlemlenmiştir (174). HSPA8'in MS'in iyileşme evresindeki lezyon onarımı sürecinde remiyelinizasyon için gerekli olduğu düşünülebilir. Şaperon aktivitesi gösteren HSPA8'in miyelin proteinleriyle birleşmesi, aynı zamanda bağışıklık tepkisinin ek bir hedefi haline gelebilir. Remiyelinizasyon, hücresel HSPA8 içeriğindeki azalma nedeniyle de bozulabilir. Postmortem MS lezyonlarındaki HSPA8 içeriğinin normal beyin dokusundakinin %30-%50 altında olduğu ve kronik lezyonlarda bu düzeyin daha da düşük olduğu saptanmıştır (141). Bu sonuç postmortem

doku araştırmalarından elde edilen bir sonuç olmakla beraber kronik lezyonlardaki HSPA8 seviyelerinin azalması başarısız remiyelinizasyon ile uyumlu olabilir. Bu sonuca paralel olarak akut inflamasyon sonrası remisyon dönemindeki hastalarda inflamatuvar sürecin azalması ile serum HSPA8 düzeyleri bir miktar azalma gösteriyor olabilir.

HSP90 proteinleri hücresel lokalizasyonlarına göre sınıflandırılabilir; sitoplazmik üyeler arasında HSPC1 (HSP90AA1), HSPC2 (HSP90AA2-HSP90ALPHA) ve HSPC3 (HSP90AB1-HSP90BETA), Endoplazmik retikulum'da; HSPC4 veya GRP94 (GP96) mitokondride; HSPC5 (TRAP1) bulunur. HSP90β Konstitütif olarak ifade edilirken, HSP90α stres koşullarında indüklenir (147).

TRAP1, HSP90'ın mitokondriyal versiyonudur ve çoğunlukla mitokondriyal matrikste lokalizedir. Mitokondri içindeki protein agregasyonuna karşı koyar ve protein katlanmasını destekler (175). TRAP1'in ana işlevi mitokondriyal bütünlüğü korumak ve mitokondriyal apoptoza karşı koruma sağlamaktır. Serbest oksijen radikallerinin veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) artan üretiminden kaynaklanan oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyonun ve hücre ölümünün ana nedenidir. Nörodejeneratif, kardiyak, neoplastik ve inme gibi çeşitli hastalıklar aşırı ROS üretiminin potansiyel sonuçlarıdır. TRAP1'in aşırı ROS üretiminin neden olduğu apoptoza karşı koruma sağlayabildiği gösterilmiştir. Aşırı eksprese edilen TRAP1, ROS birikimini azaltabilirken, aşağı regülasyonunda ise ROS oluşumu artırmıştır (147).

TRAP1, diğer tüm HSP90'larla birlikte Alzheimer demansta (AD) azalmış olduğu gösterilmiştir (164). Sitozolik HSP90'ların AD'de nöronlarda kümelenen Tau ile etkileşime girmesi bunun nedenlerinden biri olabilir. En çok azalmanın TRAP1 seviyelerinde olduğu saptanmış ancak henüz TRAP1 için benzer bir bağlantı kurulamamıştır. TRAP1 seviyelerinin azalması, AD'de oksidatif strese ve mitokondriyal disfonksiyona katkıda bulunabilir (177).

TGF-β/Smad yolağı, MS'de kritik öneme sahip olan bağışıklık tepkisini ve enflamatuvar süreçleri düzenler. MS lezyonlarında Smad sinyal yolağının CD4⁺ T hücrelerinin gelişimini ve işlevini düzenlediğini ve bunun da MS patolojisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TGF-β ve IL-6'nın Th17 hücre farklılaşmasına yol açtığı, TGF-β ve IL-4'ün de in vitro olarak Th9 hücre farklılaşmasına yol açtığı gösterilmiştir. İnfiamasyon sürecinde TGF-β, Th1 hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimini uyarır (178).

Qingxiu Zhang ve arkadaşlarının rat çalışmasında TGF-β, TRAP1, TGFβRII, p-Smad2/3 ve Smad 4'n yüksek ekspresyonunun ve IL-17 tarafından aktive edilen astrositlerde GFAP ve pro-inflamatuvar sitokin üretimi ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

TRAP1'in Smad4 ile etkileşimi EAE'de (in vivo) ve IL-17 ile aktive edilmiş astrositlerde (in vitro) meydana gelmiştir. Astrositlerde TRAP1'in devre dışı bırakılması hem in vivo hem de in vitro proinflatuvar sitokin üretimini baskılamakla kalmamış, aynı zamanda EAE farelerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve demiyelinizasyonu da inhibe etmiştir. Hastalığın atak fazında periferik kan hücrelerinde aldığımız sonuçlar ile paralellik göstererek TRAP1 seviyesinin artışı proinflatuvar sitokinlerin salınımının artışına ve hastalığın patogeneze katkıda bulunuyor olabilir (178).

Literatürde MS'da periferik kan hücrelerinde TRAP1 geni ile ilgili henüz bir araştırma bulunmamakla beraber, bizim sonuçlarımızda total kan hücrelerinde TRAP1 geninin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 10,12 kat artmış olduğu saptanmıştır. MS atak döneminde artan bu ekspresyon seviyeleri Alzheimer veya Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezeinden ayrı değerlendirilmesini gerektirir.

Houlihan ve arkadaşları çalışmalarında, HSP90 izoformlarının potansiyel olarak yabancı antijenlere karşı gelişen T hücre yanıtlarını düzenleyebileceğini öne sürülmüştür (179). Cristina ve arkadaşları MS hastalarının BOS'unda oligodentrosit progenitör hücreler (OPC)'nin yüzeyindeki antijeni tanıyan HSP90B'ye karşı IgG tipinde antikorlar saptamışlardır. MS hastalarındaki anti-HSP90 antikorlarının hücre kültüründe OPC'leri hedefi alabildiğini göstermişlerdir (180). Yine Cristina ve arkadaşlarının monoklonal ve poliklonal anti-HSP90 antikorları kullanılarak yapmış olduğu çalışmalarda, OPC'lerde HSP90'ın spesifik ekspresyonu doğrulanmıştır. MS hastalarının BOS antikorlarının OPC yüzeyine bağlanması kompleman aktivasyonuna ve OPC popülasyonunun önemli ölçüde apoptozuna yol açmıştır. Bu sonuçlar, OPC'lerin MS hastalarında anti-HSP90 antikorlarının hedefi olabileceğini ve bunun demiyelinizasyonu önleyebileceğini düşündürmektedir (181).

MS ve Tip 1 diabetes mellitusta ortak genleri ve otoimmün yolakları inceleyen bir çalışmada, MS'li atak ve remisyon dönemindeki 26 hasta çalışmaya alınmıştır. MS hastalarının BOS ve PMBC'lerinde ısı şok proteini HSP 90-beta (HSP90AB1) kompleksinin aşağı regüle edildiğini saptanmıştır. HSP90AB1'in T ve B hücrelerinin apoptoz yolağına dahil olduğunu belirtmişlerdir. T hücresi olgunlaşmasında apoptoz çok önemli bir role sahiptir. Gelişim sırasında işlevsel olmayan veya oto reaktif TCR'lerin ortadan kaldırılması ve immün yanıtlar sırasında efektör T hücrelerinin kontrolü apoptoz ile gerçekleşmektedir. Bağışıklık sistemindeki apoptozun düzensizliği otoimmün hastalıklarla sonuçlandığı bilinmektedir (182).

Bizim çalışmamızda ise atak döneminde olan MS hastaların total kan RNA ile yapılan RT-PCR da HSP90AB1 ve HSP90AA2 ekspresyon seviyesinin artış gösterdiği ve bunun serum ELISA düzeylerinin de paralel olarak remisyon ve kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p<0,001$). Çalışmalarda HSP90AB1'nin Akt ifadesini ve Akt'nin SMARCC1 ifadesini düzenleyebildiği, Ayrıca SMARCC1, T hücre aktivitesini düzenlemek için AP-1 ekspresyonunu azaltabildiği gösterilmiştir. İn vitro olarak HSP90AB1 aşırı ekspresyonu, p-Akt, SMARCC1, p-c-Fos ve p-c-Jun ekspresyon seviyelerini artırarak ve reaktif oksijen seviyesini azaltarak T hücre apoptozunu önemli ölçüde inhibe etmektedir (183). HSP90AB1 aşırı ekspresyonu MS'in patogenezinde de yer alan otoreaktif T hücrelerin apoptoz yollarına girmesinde engelleyici bir faktör olabilir. Otoreaktif T hücrelerde artmış HSP90AB1 ekspresyonu hastalığın atak döneminde artan otoimmün inflamasyon ile de paralellik göstermektedir.

HSPB'ler beyinde düşük seviyelerde konstitütif olarak ifade edilir. HSPB1 (HSP27) ve HSPB5 (aB kristallin) hücrel strese yanıt olarak indüklenir. HSPB'lerin anti apoptotik işlevleri olduğu da bildirilmiştir. HSPB1 ve HSPB5 AD gibi çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Hem HSPB1 hem de HSPB5 ekzozomlar yoluyla salgılanabilir, bu da hücre dışında ek rolleri olabileceğini düşündürmektedir. Hücre dışı HSPB'lerin genel bir işlevi, enflamasyon sırasında makrofajların veya makrofaj benzeri hücrelerin aktivasyonudur. Diğer HSP'lerde olduğu gibi, bu etkiye TLR'ler veya diğer çöpçü reseptörlerinin aracılık etmesi muhtemeldir (141).

Ce ve arkadaşlarının toplam 50 RRMS ve sekonder progresif MS hastasında yapmış olduğu bir çalışmada; MS hastalarının serum HSPB1 düzeyleri akut ataklar sırasında ve her bir ataktan 2 ay sonra ölçülmüştür. Atak geçiren tüm MS hastaları, intravenöz metilprednizolon 1 gr/gün ile 5 gün süre ile tedavi edilmiştir. Yazarlar MS'in atağı sırasında HSPB1 seviyelerinde ciddi düzeyde bir artış gözlemlemişlerdir. MS hastalarında serum HSPB1 seviyeleri remisyon döneminde kontrol grubuna kıyasla sadece hafif bir artış gösterdiği saptanmıştır (158).

Van Noort ve meslektaşları hem MS hastalarından hem de sağlıklı bireylerden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinin MS beyinlerinden elde edilen HSPB5 içeren miyelin fraksiyonuna reaktivasyon gösterdiğini söylemişlerdir. Bu fraksiyonun TNF, IL-17, CCL5 ve CCL1 gibi lökosit çağırıcı faktörlerin ve IL-10, TGF-beta ve IL-13 gibi bağışıklık düzenleyici sitokinlerin salgılanmasını uyarak mikrogliya tarafından verilen tepkileri aktive ettiğini göstermişlerdir. Bu bulgular, HSPB5'in MS'te bir otoantijen olabileceğini ve MS patogenezinin bir parçası olarak bağışıklık hücrelerinin endojen HSPB5'e saldırdığını

düşündürmüştür (184). HSPB5'in plazma düzeylerinin MS hastalarında normal bireylere kıyasla artmış olduğu gösterilmiştir (185). MS omurilik lezyonlarında beyin dokusundan farklı olarak, belirgin olarak astrositlerde artmış HSPB1 ve HSPB5 ekspresyonu gözlenmiştir (186). Başka bir çalışmada beyaz maddede özellikle kronik aktif MS lezyonlarının merkezinde HSPB1, HSPB6 ve HSPB8'in ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı, ancak HSPB11'in artmadığı bulunmuştur (187).

Başka bir çalışmada MS'li hastaların PBMC'lerinde HSP70 ve HSP27 ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle incelenmiş ve serum protein düzeyleri ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. HSP70 ve HSP27'nin hem gen ekspresyonunda hem de serum düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu çalışma, MS hastalarında hücrelerdeki gen ekspresyonu ve protein konsantrasyonu arasında güçlü korelasyonlar olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmada özellikle bu ısı şok proteinlerinin anti-apoptoz etkileri ve protein yanlış katlanması ve agregasyonunu önlemeleri nedeniyle nöroprotektif etkilerine atıfta bulunulmuştur (188).

Çalışmamızda literatüre benzer olarak total kan RNA RT-PCR sonuçlarında HSPB1 ve HSPB5 ekspresyon düzeyi sırasıyla 17,54 ve 68,55 kat artış göstermiştir. HSPB5'in gerek MS hastalarının beyin dokularında gerek serumda MS'in seyri sırasında ekspresyon seviyeleri artış gösteriyor olsa da hastalıktaki rolü patolojik olabileceği gibi ekstraselüler ortamda şaperon aktiviteleri ile nöroprotektif özellikler de gösteriyor olabilir (141).

HSPA1L geni üzerinde HSP70-hom rs2227956 C taşıyıcılarında artmış MS riskini ve hastalığın daha ağır bir formuna sahip MS hastalarında HSP70-hom'un artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Patogenez hala çok net olmasa da HSP-70 kodlayan HSP70-hom'un MSS hücrelerini enflamatuvar hasardan koruma rolüne kıyasla, proenflamatuvar bağışıklık sistemi aktivasyonunu ve miyelin antijenlerine karşı etkili bir T hücresi yanıtını teşvik etmede daha önemli bir rol oynayabileceği söylenmiştir (189). HSPA1B geninde +1267 A/G polimorfizmi, genin resesif olarak kalıtılması halinde MS'e yatkınlığı artırıyor gibi görünmektedir, oksidatif strese karşı koymaya katkıda bulunabilecek HSP70-2 proteininin ifadesini azalması ile bu durum açıklanabilir (190). Isı şok proteinlerinin kodlayan genlerin izoformları ve genlerdeki mutasyonlar bu proteinlerin hastalıkların patogenezindeki fonksiyonları tanımlamamızda zorluk çıkarmaktadır ve bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız literatürdeki çoğu çalışmadan farklı olarak hasta gruplarının tamamen naif hastalardan oluşturulmuş olmasıyla ayrılmaktadır. Çalışmamızda atak dönemindeki Multipl Skleroz hastalarının serum örneklerinde ELISA yöntemi ile HSPA1A, HSPA8 seviyelerini, remisyon ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptadık.

Literatürde yeni olarak MS hastalığında, HSP90AB1 ve HSP90AA2 serum seviyelerini incelediğimiz çalışmamızda HSP70 ailesine benzer şekilde atak döneminde bu proteinlerin remisyon ve kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiğini tespit ettik. Serum HSP 70 ve HSP90 üyeleri arasında pozitif yönlü güçlü ilişki saptadık. Atak dönemindeki hastaların total kan RNA'da RT-PCR yöntemi ile HSPA1A, HSPA8, HSP90AB1 ve HSP90AA2 gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğunu göstermiş olduk. Böylelikle ELISA yöntemi ile almış olduğumuz bu sonuçları RT-PCR ile de desteklemiş bulunmaktayız. Çalışmamızda ek olarak çeşitli ısı şok proteinlerinin ekspresyonu gerçekleştiren TRAP, HSP90AB4P, HSPB1, HSPA7, HSPA1A, HSPA6, HSPB5 genlerinin RT-PCR yöntemi ile ekspresyon seviyelerinin atak dönemindeki hastalarda artmış olduğunu saptanmış olduk.



6. TEZİN KISITLILIKLARI

- Multipl skleroz gerek atak dönemi gerek ise takibinde medikal tedaviye başlama sürecinin geciktirilmemesi gereken bir hastalıktır. Çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir medikal tedavi kullanmama şartı ve diğer geniş dışlama kriterlerimiz nedeniyle çalışmaya alınan hasta sayısı sınırlıdır.
- Çalışmadaki atak dönemindeki hastaların çoğunluğu yeni tanı MS hastalarından oluşmaktadır. Remisyon grubu ise RRMS klinik alt tipinden oluşmaktadır. MS hastalığının progresif formlarını içeren çalışma grupları ile daha geniş hasta popülasyonu ile araştırma yapılması daha güvenilir sonuçlar sunacaktır.
- Atak grubuna dahil edilen hastaların remisyon döneminde takip edilmesi ve aynı yöntemlerle çalışmaya dahil edilmesi incelenen ısı şok proteinlerinin hastalığın süreç içerisinde nasıl bir değişim gösterdiğinin anlaşılması açısından daha objektif sonuçlar verecektir. Çalışmanın kesitsel olması bu açıdan kısıtlılıklar taşımaktadır. Klinik değerlendirme anındaki verileri incelediği için nedensellik açısından sınırlı yorum imkânı vermektedir.
- Biyobelirteç çalışmalarında RT-PCR, ELISA yöntemine göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir. PCR yönteminin maliyeti fazla olup klinik pratikte kullanımı ve ulaşılması zordur. ELISA çalışmaları daha uygulanabilir olup maliyeti daha düşüktür. Bir hastalıkta kullanılabilecek biyobelirteçlerin ulaşılabilir ve düşük maliyetli olması önemli bir husus olduğundan öncelikle amacımız serum ısı şok proteinlerinin ELISA yöntemi ile atak ve remisyon hasta gruplarında değişkenliği saptamak oldu. Çalışmanın PCR basamağı atak dönemindeki hastalarda HSP'lerin gen ekspresyon düzeylerinin ELISA sonuçları ile benzer sonuçlar vermesi ile doğrular nitelikteydi. Çalışmanın mali destekleyicisi olmaması nedeniyle PCR çalışma grubu hasta ve kontrol grubu küçük bir popülasyondan oluşturulabilmiştir.

7. SONUÇ

- Çalışmamızda atak döneminde olan MS hastaların serum ELISA HSP90AB1, HSP90AA2, HSPA1A, HSPA8 seviyeleri, remisyon grubu ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.
- Total hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise serum HSP90AB1 HSP90AA2, HSPA1A, HSPA8 seviyeleri sağlıklı kontrol grubundan düşük saptanmıştır.
- Serumda HSPA1a, HSPA8, HSP90AA2, HSP90AB1 seviyeleri analiz edildiğinde MS hastalarında atak döneminde en yüksek olduğu, atak sonrası giderek bu seviyelerin düştüğü ve 3. ay itibariyle en düşük seviyelerde izlendiği daha sonra bu proteinlerin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermediği saptanmıştır.
- Isı şok proteinlerinin serum seviyesi yaş, atak sayısı ve atağın klinik prezantasyonundan etkilenmemiştir. IgG indeks düzeyleri ile serum ısı şok proteinleri arasında istatistiksel ilişki saptanmamıştır. Serum HSP70 ve HSP90 grupları arasında ve kendi üyeleri içerisinde pozitif yönlü güçlü bir ilişki hesaplanmıştır.
- Atak döneminde olan hastaların total kan RNA RT-PCR analizinde incelenen tüm genlerin ekspresyonları artış göstermiştir. Bu sonuçlar HSPA1A, HSPA8, HSP90AA2, HSP90AB1 serum ELISA düzeyleri ile paralellik göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372:1502–17.
2. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14:406-19.
3. Lindquist S, Craig E. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631–77.
4. Gusev NB, Bukach OV, Marston SB. structure, properties, and probable physiological role of small heat shock protein with molecular mass 20 kD (Hsp20, HspB6). *Biochemistry*. 2005;70:629-37.
5. Giffard RG, Xu L, Zhao H ve et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *Journal of Experimental Biology*. 2004;207:3213-20.
6. Yenari MA. Heat shock proteins and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol*. 2002;513:281-99
7. Feng D, Zhao WL, Ye YY et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010;11:675-87.
8. Wu B, Hunt C, Morimoto R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol*. 1985;5:330-41
9. Buchner J, Li J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. *Biomed J*. 2013;36:106-117.
10. Ruggiero V. Involvement of IL-1R/TLR signalling in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *CMM*. 2012;12:218-236.
11. Wallin RP, Lundqvist A, Mor'e SH et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2002;23:130-135.
12. Wang Y, Mei Y, Feng D, et al. Triptolide modulates T-cell inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J of Neuroscience Research*. 2008;86:2441-9.
13. Ward M, Goldman MD. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2022;28:988–1005.
14. Kale N. Multipl sklerozun immunopatogenezi, nöroinflamasyon, demyelinizasyon, remyelinizasyon, nörodejenerasyon ve aksonal kayıp. Duman T, editör. *Multipl Skleroz*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.1-4.
15. Sormani MP, Naismith RT. Measuring disability in multiple sclerosis: Walking plus much more. *Neurology*. 2019;93:919–20.
16. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:43.
17. Medaer R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurologica Scandinavica*. 1979;60:189-92.
18. Compston A, Lassmann H, McDonald I. The story of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Elsevier; 2006;3-68.
19. Lehmann HC, Compston A, Hartung HP. 150th anniversary of clinical description of multiple sclerosis: Leopold Ordenstein's legacy. *Neurology*. 2018;90:1011-16.
20. Compston A. The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1988;51:1249-52
21. Thormann J, Steinberg H. Friedrich Theodor von Frerichs (1819–1885). *J Neurol*. 2014;261:248-9.
22. Zalc B. One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. *Brain*. 2018;141:3482-88.
23. Boullerne AI. The history of myelin. *Experimental Neurology*. 2016;283:431-45.

24. Koritschoner R, Schweinburg F. Klinisch und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Z Immunitäts Forsh.* 1925;42:217-83.
25. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* 1933;61:689-701.
26. Paterson PY. Experimental allergic encephalomyelitis and autoimmune disease. *Adv Immunol.* 1966;5:131-208.
27. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest.* 1942;21:571-7.
28. Holmøy T. the discovery of oligoclonal bands: A 50-year anniversary. *Eur Neurol.* 2009;62:311-5.
29. Hershey LA, Gado MH, Trotter JL. Computerized tomography in the diagnostic evaluation of multiple sclerosis. *Annals of Neurology.* 1979;5:32-9.
30. Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. Diagnosis and differential diagnosis. *Multiple Sclerosis Clinical Practice.* Martin Dunitz; 2003;70:55-102.
31. Grossman RI, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW et al. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology.* 1986;161:721-5.
32. Simpson-Yap S, Maddox D, Reece J et al. Longitudinal epidemiology of multiple sclerosis in Townsville, Queensland, Australia, 2012-2022. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2023;77:104845.
33. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J et al. Multiple sclerosis. *The Lancet.* 2018;391:1622-36.
34. Amato MP, Derfuss T, Hemmer B et al. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler.* 2018;24:590-603.
35. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology.* 2019;18:269-85.
36. Ward M, Goldman MD. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.* 2022;28:988-1005.
37. Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis. İçinde: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier; 2014;122:231-66.
38. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology.* 2008;71:129-35.
39. Gökçe ŞF, Çiğdem B, Nemmezi Karaca S, et al. Prevalence of multiple sclerosis in an urban population of Sivas province in Turkey. *Turk J Med Sci.* 2019;49:288-94.
40. Kotzamani D, Panou T, Mastorodemos V et al. Rising incidence of multiple sclerosis in females associated with urbanization. *Neurology.* 2012;78:1728-35.
41. Akdemir N, Terzi M, Arslan N, et al. Prevalence of multiple sclerosis in the Middle Black Sea region of Turkey and demographic characteristics of patients. *Arch Neuropsychiatr.* 2017;54:11-4.
42. Alp R, Alp SI, Planci Y et al. The prevalence of multiple sclerosis in the north caucasus region of Turkey: Door-to-door epidemiological field study. *Nöro Psikiyatr Arş.* 2012;49:272-5.
43. Türk Börü Ü, Taşdemir M, Güler N et al. Prevalence of multiple sclerosis: door-to-door survey in three rural areas of coastal Black Sea regions of Turkey. *Neuroepidemiology.* 2011;37:231-5.
44. Türk Börü Ü, Alp R, Sur H et al. Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology.* 2006;27:17-21.
45. Ventura RE, Antezana AO, Bacon T et al. Hispanic Americans and African Americans with multiple sclerosis have more severe disease course than Caucasian Americans. *Mult Scler.* 2017;23:1554-7.
46. Affinito G, Palladino R, Carotenuto A et al. Epidemiology of multiple sclerosis in the Campania Region (Italy): Derivation and validation of an algorithm to calculate the 2015-2020 incidence. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2023;71:104585.
47. Charabati M, Wheeler MA, Weiner HL et al. Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting. *Cell.* 2023;186:1309-27.

48. Gourraud PA, Sdika M, Khankhanian P et al. A genome-wide association study of brain lesion distribution in multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136:1012-24.
49. Gregory SG, Schmidt S, Seth P et al. For the Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007;39:1083-91.
50. Waubant E, Lucas R, Mowry E et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6:1905-22.
51. Yang J, Hamade M, Wu Q et al. Current and Future Biomarkers in Multiple Sclerosis. *IJMS*. 2022;23:5877.
52. Lin J, Zhou J, Xu Y. Potential drug targets for multiple sclerosis identified through Mendelian randomization analysis. *Brain*. 2023;146:3364-72.
53. Goris A, Vandebergh M, McCauley JL et al. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *The Lancet Neurology*. 2022;21:830-42.
54. Damania B, Kenney SC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*. 2022;185:3652-70.
55. Aloisi F, Giovannoni G, Salvetti M. Epstein-Barr virus as a cause of multiple sclerosis: opportunities for prevention and therapy. *The Lancet Neurology*. 2023;22:338-49.
56. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375:296-301.
57. Hedström AK, Huang J, Michel A et al. High levels of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1-specific antibodies and infectious mononucleosis act both independently and synergistically to increase multiple sclerosis risk. *Front Neurol*. 2020;10:1368.
58. Hawkes CH, Giovannoni G, Lechner-Scott J, Levy M, Waubant E. Multiple sclerosis and migration revisited. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2019;34:A1-A2.
59. Munk Nielsen N, Corn G, Frisch M et al. Multiple sclerosis among first- and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study. *Brain*. 2019;142:1587-97.
60. Yeh WZ, Gresle M, Jokubaitis V et al. Immunoregulatory effects and therapeutic potential of vitamin D in multiple sclerosis. *British J Pharmacology*. 2020;177:4113-33.
61. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr KM, et al. Dietary Vitamin D3 Supplements Reduce Demyelination in the Cuprizone Model. *PLoS ONE*. 2011;e26262.
62. Smolders J, Damoiseaux J. Vitamin D as a T-cell Modulator in Multiple Sclerosis. *Çinde: Vitamins & Hormones*. Elsevier. 2011;86:401-28.
63. Miclea A, Bagnoud M, Chan A, Hoepner R. A Brief Review of the Effects of Vitamin D on Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2020;11:781.
64. Niino M, Miyazaki Y. Genetic polymorphisms related to vitamin D and the therapeutic potential of vitamin D in multiple sclerosis. *Physiol Pharmacol*. 2015;93:319-25.
65. Boltjes R, Knippenberg S, Gerlach O, et al. Vitamin D supplementation in multiple sclerosis: An expert opinion based on the review of current evidence. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021;21:715-25.
66. Jagannath VA, Filippini G, Borges Do Nascimento IJ, et al. Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Multiple Sclerosis and Rare Diseases of the CNS Group*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;9:CD008422.
67. Arneth B. Multiple Sclerosis and Smoking. *The American Journal of Medicine*. 2020;133(7):783-8.
68. Fitzgerald KC, Salter A, Tyry T et al. Measures of general and abdominal obesity and disability severity in a large population of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2020;26(8):976-86.
69. Lavery AM, Waubant E, Casper TC et al. Urban air quality and associations with pediatric multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5:1146-53.
70. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:175628642110076.
71. Gold R. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis Research. *Brain*. 2006;129:1953-71.

72. Liu R, Du S, Zhao L, Jain S et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol.* 2022;13:996469.
73. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE et al. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology.* 2009;66:739-53.
74. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:545-58.
75. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2010;162:1-11.
76. Perumal NB, Kaplan MH. Regulating IL9 transcription in T helper cells. *Trends in Immunology.* 2011;32:146-50.
77. Midgley A, Barakat D, Braitch M et al. PAF-R on activated T cells: Role in the IL-23/Th17 pathway and relevance to multiple sclerosis. *Immunobiology.* 2021;226:152023.
78. Pikor NB, Astarita JL, Summers-Deluca L et al. Integration of Th17- and Lymphotoxin-derived signals initiates meningeal-resident stromal cell remodeling to propagate neuroinflammation. *Immunity.* 2015;43:1160-73.
79. Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R et al. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. *Annals of Neurology.* 2018;83:739-55.
80. Magliozzi R, Howell OW, Calabrese M, et al. Meningeal inflammation as a driver of cortical grey matter pathology and clinical progression in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2023;19:461-76.
81. Ponath G, Ramanan S, Mubarak M et al. Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain.* 2017;140:399-413.
82. Mirza M. Multiple skleroz etiyopatogenezi. *Türkiye Klin J Neurol-Special Top.* 2017;10:292-9.
83. Kantarci OH. Phases and Phenotypes of Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.* 2019;25:636-54.
84. Jacques FH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.* 2015;84:963-8.
85. Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A et al. Radiologically isolated syndrome: 10-YEAR risk estimate of a clinical event. *Annals of Neurology.* 2020;88:407-17.
86. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology.* 2012;11:157-69.
87. Calabrese M, Marastoni D, Crescenzo F et al. Early multiple sclerosis: diagnostic challenges in clinically and radiologically isolated syndrome patients. *Current Opinion in Neurology.* 2021;34:277-85.
88. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology.* 2018;17:162-73.
89. Förster M, Graf J, Mares J, et al. Drug treatment of clinically isolated syndrome. *CNS Drugs.* 2019;33:659-76.
90. Kalincik T. Multiple sclerosis relapses: Epidemiology, outcomes and management, a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2015;44:199-214.
91. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83:278–86.
92. Cree BAC, Arnold DL, Chataway J et al. Secondary progressive multiple sclerosis: New insights. *Neurology.* 2021;97:378-88.
93. Francois JH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83:278-86.
94. Bevan RJ, Evans R, Griffiths L, et al. Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis. *Annals of Neurology.* 2018;84:829-42.
95. Koch M, Kingwell E, Rieckmann P et al. The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73:1996-2002.

96. Filippi M, Preziosa P, Barkhof F et al. Diagnosis of progressive multiple sclerosis from the imaging perspective: A review. *JAMA Neurol.* 2021;78:351-64.
97. Kraft GH. Evoked potentials in multiple sclerosis. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America.* 2013;24:717-20.
98. Fuhr P, Kappos L. Evoked potentials for evaluation of multiple sclerosis. *Clinical Neurophysiology.* 2001;112:2185-9.
99. Pryce G, Baker D. Oligoclonal bands in multiple sclerosis; Functional significance and therapeutic implications. Does the specificity matter? *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2018;25:131-7.
100. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62:865-70.
101. Deisenhammer F. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology.* 2019;10:726.
102. Costello F, Coupland S, Hodge W et al. Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Annals of Neurology.* 2006;59:963-9.
103. Lambe J, Saidha S, Bermel RA. Optical coherence tomography and multiple sclerosis: Update on clinical application and role in clinical trials. *Mult Scler.* 2020;26:624-39.
104. Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS et al. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 2021;20:653-70.
105. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain.* 2019;142:1858-75.
106. Pareto D, Sastre-Garriga J, Auger C et al. Juxtacortical lesions and cortical thinning in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:2270-6.
107. Ciccarelli O, Cohen JA, Reingold SC et al. Spinal cord involvement in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders. *The Lancet Neurology.* 2019;18:185-97.
108. Dutra BG, Da Rocha AJ, Nunes RH et al. Neuromyelitis Optica spectrum disorders: Spectrum of MR imaging findings and their differential diagnosis. *RadioGraphics.* 2018;38:169-93.
109. Traboulsee A, Simon JH, Stone L et al. Revised recommendations of the consortium of MS centers task force for a standardized MRI protocol and clinical guidelines for the diagnosis and follow-up of multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37:394-401.
110. He J, Grossman RI, Ge Y, et al. Enhancing patterns in multiple sclerosis: Evolution and persistence. 2001;22:664-9.
111. Thaler C, Faizy T, Sedlacik J et al. T1- Thresholds in black holes increase clinical-radiological correlation in multiple sclerosis patients. Ramagopalan SV, editor. *PLoS ONE.* 2015;10:e0144693.
112. Chen Z, Feng F, Yang Y, et al. MR imaging findings of the corpus callosum region in the differentiation between multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *European Journal of Radiology.* 2012;81:3491-5.
113. Cagol A, Cortese R, Barakovic M et al. Diagnostic performance of cortical lesions and the central vein sign in multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2024;81:143-53.
114. Eshaghi A, Prados F, Brownlee WJ et al. Deep gray matter volume loss drives disability worsening in multiple sclerosis. *Annals of Neurology.* 2018;83:210-22.
115. Gill AJ, Schorr EM, Gadani SP, et al. Emerging imaging and liquid biomarkers in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2023;53:2250228.
116. Vollmer T, Signorovitch J, Huynh L et al. The natural history of brain volume loss among patients with multiple sclerosis: A systematic literature review and meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences.* 2015;357:8-18.
117. Solomon AJ, Arrambide G, Brownlee WJ et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: an updated consensus approach. *The Lancet Neurology.* 2023;22:750-68.
118. Wildner P, Stasiulek M, Matysiak M. Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 2020;37:101452.
119. Solomon AJ. Diagnosis, differential diagnosis, and misdiagnosis of multiple sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.* 2019;25:611-35.

120. Siva A. Common clinical and imaging conditions misdiagnosed as multiple sclerosis. *Neurologic Clinics*. 2018;36:69-117.
121. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;1444-52.
122. Galea I, Ward-Abel N, Heesen C. Relapse in multiple sclerosis. *BMJ*. 2015;350:h1765.
123. Perumal JS, Caon C, Hreha S et al. Oral prednisone taper following intravenous steroids fails to improve disability or recovery from relapses in multiple sclerosis. *Euro J of Neurology*. 2008;15:677-80.
124. Berkovich RR. Acute multiple sclerosis relapse. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2016;22:799-814.
125. Jacob S, Mazibrada G, Irani SR et al. The role of plasma exchange in the treatment of refractory autoimmune neurological diseases: A narrative review. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021;16:806-17.
126. Reyes S, Smets I, Holden D et al. CSF neurofilament light chain testing as an aid to determine treatment strategies in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7:e880.
127. Thebault S, Booth RA, Freedman MS. Blood neurofilament light chain: The neurologist's troponin? *Biomedicines*. 2020;8:523.
128. DiSano KD, Gilli F, Pachner AR. Intrathecally produced CXCL13: A predictive biomarker in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal-Experimental, Translational and Clinical*. 2020;6:205521732098139.
129. Pike SC, Gilli F, Pachner AR. The CXCL13 index as a predictive biomarker for activity in clinically isolated syndrome. *IJMS*. 2023;24:11050.
130. Rival M, Galoppin M, Thouvenot E. Biological markers in early multiple sclerosis: The paved way for radiologically isolated syndrome. *Front Immunol*. 2022;13:866092.
131. Oechtering J, Schaedelin S, Benkert P et al. Intrathecal immunoglobulin m synthesis is an independent biomarker for higher disease activity and severity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2021;90:477-89.
132. Villar LM, Casanova B, Ouamara N et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2014;76:231-40.
133. Stampanoni Bassi M, Buttari F, Gilio L et al. Osteopontin is associated with multiple sclerosis relapses. *Biomedicines*. 2023;11:178.
134. Agah E, Zardoui A, Saghaazadeh A, et al. Osteopontin (OPN) as a CSF and blood biomarker for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2018;13:e0190252.
135. Talaat F, Abdelatty S, Ragaie C, et al. Chitinase-3-like 1-protein in CSF: a novel biomarker for progression in patients with multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2023;44:3243-52.
136. Zhang J, Cheng Y, Cui W, et al. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 2014;266:56-63.
137. Keller A, Leidinger P, Lange J et al. Multiple sclerosis: MicroRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS ONE*. 2009;4:e7440.
138. Ma X, Zhou J, Zhong Y et al. Expression, regulation and function of MicroRNAs in multiple sclerosis. *Int J Med Sci*. 2014;11:810-8.
139. Mansilla MJ, Montalban X, Espejo C. Heat shock protein 70: Roles in multiple sclerosis. *Mol Med*. 2012;18:1018-28.
140. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat shock proteins as immunomodulants. *Molecules*. 2018;23:2846.
141. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G et al. Positive or negative involvement of heat shock proteins in multiple sclerosis pathogenesis: An overview. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73:1092-106
142. Zhu Z, Reiser G. The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*. 2018;115:69-79.
143. Kim JY, Barua S, Huang MY, et al. Heat shock protein 70 (HSP70) induction: Chaperonotherapy for neuroprotection after brain injury. *Cells*. 2020;9:2020.

144. Borges TJ, Wieten L, Van Herwijnen MJC et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immun.* 2012;3:95.
145. D'Souza SD, Antel JP, Freedman MS. Cytokine induction of heat shock protein expression in human oligodendrocytes: an interleukin-1-mediated mechanism. *J. Neuroimmunol.* 1994;50:17–24.
146. Becker T, Hartl FU, Wieland F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70–peptide complexes. *The Journal of Cell Biology.* 2002;158:1277-85.
147. Hoter A, El-Sabban M, Naim H. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *IJMS.* 2018;19:106-17.
148. Faul F, Erdfelder E, Lang A et al. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods,* 2007;39:175-191.
149. Piri Cinar B, Guven Yorgun Y. What We learned from the history of multiple sclerosis measurement: Expanded Disease Status Scale. *Archives of Neuropsychiatry.* 2018;55:69-75.
150. Cellular response of external stimuli pathway. Reactom. Available from: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-8953897> (12 May 2024).
151. Huang R, Grishagin I, Wang Y et al. The NCATS bioplanet – an integrated platform for exploring the universe of cellular signaling pathways for toxicology, systems biology, and chemical genomics. *Front Pharmacol.* 2019;10:445.
152. Montgomery DC, Runger GC. *Applied Statistics and Probability for Engineers* (6. bs.). Wiley; 2014.
153. Richardson JT. Eta squared and partial eta squared as measures of effect size in educational research. *Educational Research Review.* 2011;6(2):135-47.
154. Sinha P, Verma B, Ganesh S. Dexamethasone-induced activation of heat shock response ameliorates seizure susceptibility and neuroinflammation in mouse models of Lafora disease. *Experimental Neurology.* 2021;340:113656.
155. Beretta G, Shala AL. Impact of heat shock proteins in neurodegeneration: Possible therapeutical targets. *Annals of Neurosciences.* 2022;29(1):71-82.
156. Abe K, Tanzi RE, Kogure K. Induction of HSP70 mRNA after transient ischemia in gerbil brain. *Neuroscience Letters.* 1991;125(2):166-8.
157. Krakowiak J, Zheng X, Patel N et al. Hsf1 and Hsp70 constitute a two-component feedback loop that regulates the yeast heat shock response. *eLife.* 2018;7:e31668.
158. Masser AE, Ciccarelli M, Andréasson C. Hsf1 on a leash – controlling the heat shock response by chaperone titration. *Experimental Cell Research.* 2020;396:112246.
159. Lechner P, Buck D, Sick L et al. Serum heat shock protein 70 levels as a biomarker for inflammatory processes in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical.* 2018;4:205521731876719.
160. Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters.* 2007;581:3702-10.
161. Boiocchi C, Monti MC, Osera C et al. Heat shock protein 70-hom gene polymorphism and protein expression in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology.* 2016;298:189-93.
162. Turturici G, Sconzo G, Geraci F. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochemistry Research International.* 2011;2011:1-18.
163. Chiricosta L, Gugliandolo A, Bramanti P et al. Could the heat shock proteins 70 family members exacerbate the immune response in multiple sclerosis? An in silico study. *Genes.* 2020;11:615.
164. Fleshner M, Johnson JD. Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: Releasing signal(s) and function. *International Journal of Hyperthermia.* 2005;21:457-71.
165. Cwiklinska H. Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *International Immunology.* 2003;15:241-9.
166. Mansilla MJ, Comabella M, Río J et al. Up-regulation of inducible heat shock protein-70 expression in multiple sclerosis patients. *Autoimmunity.* 2014;47:127-33.
167. Kizelsztejn P, Komarnytsky S, Raskin I. Oral administration of triptolide ameliorates the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by induction of HSP70 and stabilization of NF- κ B/I κ B α transcriptional complex. *Journal of Neuroimmunology.* 2009;217:28-37.

168. Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol.* 2013;46:1-7.
169. Heneka MT, Sharp A, Murphy P et al. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Journal of Neurochemistry.* 2001;77:568-79.
170. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8:a028936.
171. Ziemssen T, Derfuss T, De Stefano N et al. Optimizing treatment success in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2016;263:1053-65.
172. Chiba S, Yokota S ichi, Yonekura K et al. Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences.* 2006;241:39-43.
173. Raška M, Weigl E. Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149:243-9.
174. Mycko MP, Cwiklinska H, Szymanski J et al. Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *The Journal of Immunology.* 2004;172:202-13.
175. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, et al. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2012;1823:767-73.
176. Koopman MB, Rüdiger SGD. Alzheimer cells on their way to derailment show selective changes in protein quality control network. *Front Mol Biosci.* 2020;7:214.
177. Dekker FA, Rüdiger SGD. The mitochondrial Hsp90 TRAP1 and alzheimer's disease. *Front Mol Biosci.* 2021;8:697913.
178. Zhang Q, Yang Y, Chen Y et al. The LncRNA AK018453 regulates TRAP1/Smad signaling in IL-17-activated astrocytes: A potential role in EAE pathogenesis. *Glia.* 2022;70:2079-92.
179. Houlihan JL, Metzler JJ, Blum JS. HSP90 α and HSP90 β Isoforms Selectively Modulate MHC Class II Antigen Presentation in B Cells. *The Journal of Immunology.* 2009;182:7451-8.
180. Cid C, Álvarez-Cermeño JC, Camafeita E et al. Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implications for demyelination in multiple sclerosis. *FASEB J.* 2004;18:1-23.
181. Cid C, Álvarez-Cermeño JC, Salinas M, et al. Anti-heat shock protein 90 β antibodies decrease pre-oligodendrocyte population in perinatal and adult cell cultures. Implications for remyelination in multiple sclerosis. *Journal of Neurochemistry.* 2005;95:349-60.
182. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Mohammad Tabatabaei S, et al. Identification of common key genes and pathways between type 1 diabetes and multiple sclerosis using transcriptome and interactome analysis. *Endocrine.* 2020;68:81-92.
183. Zhang S, Fan S, Wang Z et al. Capecitabine Regulates HSP90AB1 Expression and Induces Apoptosis via Akt/SMARCC1/AP-1/ROS Axis in T Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2022;2022:1-15.
184. Van Noort JM, Bsibsi M, Gerritsen WH, et al. α B-Crystallin is a target for adaptive immune responses and a trigger of innate responses in preactive multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69:694-703.
185. Rothbard JB, Kurnellas MP, Brownell S et al. Therapeutic effects of systemic administration of chaperone α B-Crystallin associated with binding proinflammatory plasma proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287;13:9708-21.
186. Gorter RP, Nutma E, Jahrei MC et al. Heat shock proteins are differentially expressed in brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2018;194:137-52.
187. Peferoen LAN, Gerritsen WH, Breur M et al. Small heat shock proteins are induced during multiple sclerosis lesion development in white but not grey matter. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:87.
188. Sokolowski I, Kucharska-Lusina A, Miller E et al. Exploring the mRNA and Plasma Protein Levels of BDNF, NT4, SIRT1, HSP27, and HSP70 in Multiple sclerosis patients and healthy controls. *IJMS.* 2023;24:16176.

189. Boiocchi C, Monti MC, Osera C et al. Heat shock protein 70-hom gene polymorphism and protein expression in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2016;298:189-93.
190. Boiocchi C, Osera C, Monti MC et al. Are Hsp70 protein expression and genetic polymorphism implicated in multiple sclerosis inflammation? *Journal of Neuroimmunology*. 2014;268:84-8.



EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAYI

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64) KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 29.11.2023

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Relapsing Remitting Multipl Skleroz Hastalarında 15 Şok Proteini 70 (Hsp-70) ile 90 (Hsp-90)'nın Metabolit ve Gen Ekspresyonlarının Sinyal Yolak Analizi'
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TELEFON	216 570 91 90
FAKS	216 565 55 26
E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr

BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof Dr. Temel Tombul- Dr. Nestuğ Keskin Zereyak- Dr. Merve Nur Al			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÖRÜTCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUTUK vb. gibi kayıtlardan destek alınır.)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	FAZ 2	☐
		FAZ 3	☐	FAZ 4	☐
		Gözetimel ilaç çalışması	☐	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐
	In vitro tıbbi test cihazları ile yapay performans değerlendirme çalışmaları	☐	İlaç dışı klinik araştırma	☒	
	Retrospektif	☐			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Version Numarası	Dil	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BELGELENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	ILAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENİLİRLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
DİĞER:	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2023-0825	Tarih: 29.11.2023			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/galınının gereke, amaç, yaklaşımlar ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/galınının başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel salıkla bularınıdır. Toplantıya katılan etik kurul üyeleri tam sayıların salt çoğunluğu ile karar vermiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamındaki yer alan araştırmalar/galınlar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tıbbi test cihazının gerektirir.				

Etik Kurulu Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Şikri Sadık ÖNER

İmza:

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-66)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 29.11.2023

KONU: Etik Kurul Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Relapsing Remitting Multipl Skleroz Hastalarında Isı Şok Proteini 70 (Hsp-70) ile 90 (Hsp-90)'nın Metabolit ve Gen Ekspresyonlarının Sinyal Yolak Analizi'
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Öroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Süleyman Dağdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamili Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Sıdıka Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hacer Hicran Mada	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr Öğretim Üyesi Ergül Demirçivi	Kadın Hastalıkları ve Doğum	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Saliha Şahin	İşçi		E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:

*:Toplantının Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi

Etik Kurul Başkanı:

Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER

İmza:

EK 2: HASTA TAKİP FORMU

Hasta no:

İsim:

Soyisim:

Yaş:

Eğitim düzeyi:

Sigara:

Medeni durumu:

Alkol:

Ms tanı yılı:

Kullanılan ms ilaçlar:

Ek hastalık:

Kullandığı diğer ilaç:

Kaç atak:

Ataktaki belirtisi:

Okb:

Vep:

Edss:

Görme keskinliği:

Beyin sapı bulguları:

Pramidal bulgular:

Serebellar bulgular:

Duyusal bulgular:

Barsak mesane fonksiyonları:

Serebral fonksiyonlar:

Ambulasyon skoru:

EK 3: BENZERLİK RAPORU

RELAPSİNG REMİTTİNG MULTİPL SKLEROZ HASTALARINDA ISI ŞOK PROTEİNİ 70 (HSP-70) İLE 90 (HSP-90)'NIN METABOLİT VE GEN EKSPRESYONLARININ SİNYAL YOLAK ANALİZİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **13**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **12**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **2**

YAYINLAR

% **6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
3	www.medikaynak.com İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to Istanbul Medeniyet Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	d-nb.info İnternet Kaynağı	<% 1
7	dspace.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

Submitted to Fırat Üniversitesi

9	Öğrenci Ödevi	<% 1
10	openaccess.izu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
11	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
12	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
13	turkhokey.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
14	acikerisim.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	acikerisim.tbmm.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
16	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
17	worldwidescience.org İnternet Kaynağı	<% 1
18	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
19	www.tdx.cat İnternet Kaynağı	<% 1
20	ilacvetedavidernegi.org İnternet Kaynağı	<% 1

21	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
22	DOĞAN, Hulusi. "Procedural fairness and communication satisfaction as factors in mission attachment of employees: An applied research in a motorcycle firm", Çukurova Üniversitesi, 2008. Yayın	<% 1
23	Submitted to Tikrit University Öğrenci Ödevi	<% 1
24	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
26	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
27	www2.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
28	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
29	www.genecards.org İnternet Kaynağı	<% 1
30	doczz.net İnternet Kaynağı	<% 1

31	acikerisim.lib.comu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
32	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
33	HALİLOĞLU, Sema, İÇAĞASIOĞLU, Afitap, BAKLACIOĞLU, H. Şule, YUMUŞAKHUYLU, Yasemin, ATLIĞ, R. Şirin, DEMİRHAN, Esmâ and IŞIK, Nihal. "Multipl sklerozda yaşam kalitesinin fonksiyonel durum ile ilişkisi", LOGOS Yayıncılık, 2009. Yayın	<% 1
34	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
35	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1
36	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
37	Submitted to Sabancı Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
38	Submitted to Victoria University of Wellington Öğrenci Ödevi	<% 1
39	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
40	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University	<% 1

41	Sinay Önen, Ahmet İnel, Bilgen Kanat, İbrahim Taymur, Ersin Budak, Suna Eraybay. "Comparison of Childhood Traumatic Experience and Attachment Styles among Patients in Suicide Attempts with Drugs and the Healthy Control Group", Journal of Cognitive-Behavioral Psychotherapy and Research, 2017 Yayın	<% 1
42	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
43	Submitted to Suleyman Demirel University Öğrenci Ödevi	<% 1
44	acikerisim.ybu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
45	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
46	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
47	revistanefrologia.com İnternet Kaynağı	<% 1
48	www.tkbbv.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
49	acikerisim.nevsehir.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

50	ash.silverchair-cdn.com İnternet Kaynağı	<% 1
51	noroloji.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
52	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<% 1
53	Zhihui Zhu, Georg Reiser. "The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases", <i>Neurochemistry International</i> , 2018 Yayın	<% 1
54	gcris.pau.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
55	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
56	unis.kafkas.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
57	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
58	Abdullah Hoter, Marwan El-Sabban, Hassan Naim. "The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease", <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2018 Yayın	<% 1

59	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
60	Massimo Filippi, Maria A. Rocca. "White Matter Diseases", Springer Science and Business Media LLC, 2020 Yayın	<% 1
61	acikerisim.alanya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
62	acikerisim.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
63	cancerimmunolres.aacrjournals.org İnternet Kaynağı	<% 1
64	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
65	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
66	en.isarconference.org İnternet Kaynağı	<% 1
67	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
68	vetkontrol.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
69	Christiane Richter-Landsberg. "Heat Shock Proteins in Neural Cells", Springer Science	<% 1

70	K. Udaya BHASKHAR, Harini N. DEVI, Aparna R. BITLA, Srinivasa . RAO, Siva V. KUMAR, Alok B. SACHAN. "Ischemia Modified Albumin Levels in Patients with Diabetic Nephropathy", The Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, 2018 Yayın	<% 1
71	Rocío del Carmen Bravo-Miana, Jone Karmele Arizaga-Echebarria, David Otaegui. "Central nervous system-derived extracellular vesicles: the next generation of neural circulating biomarkers?", Translational Neurodegeneration, 2024 Yayın	<% 1
72	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
73	openaccess.acibadem.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
74	openaccess.biruni.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
75	www.powershow.com İnternet Kaynağı	<% 1
76	www.utsakcongress.com İnternet Kaynağı	<% 1

77	Eiman MA Mohammed. "Environmental Influencers, MicroRNA, and Multiple Sclerosis", Journal of Central Nervous System Disease, 2020 Yayın	<% 1
78	Proteases In The Brain, 2005. Yayın	<% 1
79	The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation, 2014. Yayın	<% 1
80	Zhu, Xiaodan, Shuting Hu, Lingqin Zhu, Juan Ding, Yongzhong Zhou, and Guanghua Li. "Effects of Lycium barbarum polysaccharides on oxidative stress in hyperlipidemic mice following chronic composite psychological stress intervention", Molecular Medicine Reports, 2014. Yayın	<% 1
81	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde