

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE SKLEROZ ve NÖROMYELITİS OPTİKA
SPEKTRUM BOZUKLUKLARI HASTALARINDA
NÖRODEJENERASYON, AKSONAL HASAR, ASTROSİT
AKTİVASYONU ve İNFLAMASYONLA İLGİLİ
BELİRTEÇLERİN VÜCUT SIVILARINDA İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURAK ARSLAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYLİN SEPİCİ DİNÇEL**

**ANKARA
ARALIK 2019**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE SKLEROZ ve NÖROMYELITİS OPTİKA
SPEKTRUM BOZUKLUKLARI HASTALARINDA
NÖRODEJENERASYON, AKSONAL HASAR, ASTROSİT
AKTİVASYONU ve İNFLAMASYONLA İLGİLİ
BELİRTEÇLERİN VÜCUT SIVILARINDA İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURAK ARSLAN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2019-38 proje numarası ile desteklenmiştir.

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYLİN SEPİCİ DİNÇEL**

**ANKARA
ARALIK 2019**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.1 Nöroimmunolojik Hastalıklar Nedir?	4
2.1.2 Nöroimmunolojik Hastalıkların Mekanizmaları	5
2.2 <i>Multiple Skleroz</i>	5
2.2.1 Tanım ve Tarihçe.....	5
2.2.2 Klinik Belirtiler.....	6
2.2.3 Klinik Seyir Tipleri	7
2.2.3.1 KİS.....	7
2.2.3.2 Ataklarla Seyreden MS(RRMS).....	8

2.2.3.3 Progresif MS.....	8
2.2.4 Etiyoloji	9
2.2.5 Fizyopatoloji.....	13
2.2.5.1 Lezyon oluşumu	13
2.2.5.2 Santral sinir sistemi dışında immün sistem disregülasyonu.....	14
2.2.5.3 SSS: İmmün Korunaklı Bölge.....	15
2.2.5.4 Multiple Skleroz’da SSS içerisinde erken ve geç dönemde immün sistem disregülasyonu.....	16
2.2.5.4 Primer Progresif Multiple Skleroz	17
2.2.5.5 Multiple Skleroz’da relaps	18
2.2.5.6 İmmün Hücre Aktivasyonu	18
2.2.6 Kan Beyin Bariyeri ve Kan Bos Bariyeri	19
2.2.6.1 Multiple Skleroz’da kan beyin bariyeri destrüksiyonu	20
2.2.7 Tanı	24
2.3 Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları	27
2.3.1 Tanım.....	27
2.3.2 Tarihçe.....	27
2.3.3 Klinik Belirtiler.....	28
2.3.4 Etiyoloji ve Fizyopatoloji	28
2.3.4.1 Aquaporin 4 keşfi, yapısı ve fonksiyonu.....	29
2.3.4.2 Fizyopatoloji.....	30
2.3.5 NMOSB ve anti – MOG	33

2.3.4 Multiple Skleroz ve Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları	
Hastalıklarının bazı klinik ve laboratuvar özellikleri.....	34
2.3.4.1 AQP4 ve MOG antikorlarının ölçümü	35
2.4 Biyobelirteçler	35
2.4.1 Tanım.....	35
2.4.2 Multiple Skleroz’da Biyobelirteçlerin Rolü	36
2.4.3 MS’de Neden Biyobelirteçlere İhtiyaç Vardır ?	36
2.4.4 MS Biyobelirteçlerinin Validasyonu, Klinik Pratiğe Uygulaması .	36
2.4.5 Biyolojik Banka	38
2.4.6 Biyobelirteç olarak BOS	38
2.4.6.1 BOS’un yapısı ve fizyolojik özellikleri.....	38
2.4.6.2 BOS’un biyobelirteç olarak kullanımının avantaj ve dezavantajları.	40
2.5 Tez çalışmasında araştırılan parametreler	41
2.5.1 İnterlökinler	41
2.5.1.1 Hastalık patofizyolojisinde interlökinlerin yeri.....	41
2.5.1.2 İnterlökin 6 ve İnterlökin 17.....	43
2.5.2 Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP).....	46
2.5.2.1 Astrosit ve özellikleri	46
2.5.2.2 Reaktif Astrogliazis.....	47
2.5.2.3 Glial Fibriler Asidik Protein keşif ve özellikleri	48
2.5.3 Nörofilaman Hafif Zincir (NFL)	50
2.5.3.1 Nörofilamanların yapısal özellikleri ve sınıflandırılmaları	51
2.5.3.2 Nörofilaman hafif zincirin yaş ile değişimi.....	52

2.5.3.3 Neden nörofilaman hafif zincir ?.....	53
2.5.3.4 Neden nörofilaman hafif zinciri biyobelirteç olarak araştırıyoruz? ..	53
2.5.3.5 Nörofilamanları tespit etme metotları	54
2.5.3.6 Nörofilaman hafif zincir ve MRG	55
2.5.3.7 NFL analizinde neredeyiz? Neler yapılmalı?	57
2.5.3.8 Periferik kan NFL : Nöroloğun C Reaktif Protein'i mi?.....	57
2.5.3.9 NFL referans aralığı belirlenmesi.....	58
2.5.4 Osteopontin	59
2.5.5 Growth Associated Protein – 43.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
<i>3.1. Çalışmaya Katılacak Bireylerin Seçilmesi.....</i>	<i>61</i>
<i>3.2 Kan ve BOS örneklerinin toplanması</i>	<i>65</i>
<i>3.3 Kan ve BOS Analizleri.....</i>	<i>66</i>
3.3.1 Serum GFAP Western Blot Analizi	67
3.3.2 Serum ve BOS GFAP Analizi.....	71
3.3.3 Serum NFL analizi	73
3.3.4 BOS NFL analizi.....	75
3.3.5 Serum ve BOS Osteopontin Analizi.....	76
3.3.5 Serum ve BOS GAP-43 Analizi.....	78
3.3.5 Serum ve BOS İnterlökin-6 Analizi.....	79
3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	80
4.BULGULAR	82

<i>4.2 Numune türlerine göre biyobelirteçler için Box-Plot Grafikleri.....</i>	<i>90</i>
<i>4.3 Korelasyon Analizleri</i>	<i>104</i>
5. TARTIŞMA	115
6. SONUÇ	124
7. KAYNAKLAR.....	128
8. ÖZET	147
9. ABSTRACT	149
10. ÖZGEÇMİŞ	151
11.EKLER.....	160
<i>11.1 Olgu Rapor Formu</i>	<i>161</i>
<i>11.2 Araştırma Etik Kurul İzni</i>	<i>162</i>
<i>11.3 Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği.....</i>	<i>164</i>

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel'e, aynı anabilim dalında çalışan tüm hocalarıma; numuneleri ve klinik bilgileri edindiğimiz Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Aslı Tuncer'e ve değerli Nöroloji Anabilim Dalı asistanı arkadaşlarıma; aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışan, araştırmanın bütün aşamalarında desteğini esirgemeyen kıymetli eşim, hayattaki en büyük şansım ve destekçim Dr. Gökçe Ayhan Arslan' a, tüm asistan arkadaşlarım ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimle..

Dr.Burak Arslan

SİMGELER VE KISALTMALAR

MS: Multiple Skleroz

SSS: Santral Sinir Sistemi

NMOSBH: Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları

NMO: Nöromyelitis Optika

Aquaporin – 4 IgG: NMO - IgG, AQP4 – IgG

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

İF: İntermediate Filaman

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

İL – 17: İnterlökin 17

Th17: T Helper 17

İL – 6: İnterlökin 6

GAP – 43: Growth Associated Protein – 43

KBB: Kan Beyin Bariyeri

EBV: Epstein Barr Virüs

KİS: Klinik İzole Sendrom

RİS: Radyolojik İzole Sendrom

RRMS: Ataklarla Seyreden Multiple Skleroz

SPMS: Sekonder Progresif Multiple Skleroz

PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz

CMV: Sitomegalovirüs

Th1: T helper 1

KBSB: Kan Bos Bariyeri

ROT: Reaktif Oksijen Türevleri

MMP: Matriks Metalloproteinaz

OKB: Oligoklonal Bant

AQP4: AQP4

MOG: Myelin Oligodentrosit Glikoprotein

EAAT2: Excitatory Aminoacid Transporter 2

CBA: Cell Based Assay

NIH: The National Institutes of Health

OEM: Otoimmün Ensefalomyelit

Th2: T helper 2

Tnf – α: Tümör Nekrozis Faktör alfa

ASH: Antijen Sunan Hücreler

NFH: Nörofilaman ağır zincir

NFM: Nörofilaman orta zincir

NFL: Nörofilaman hafif zincir

PSS: Periferik Sinir Sistemi

UFL: Unit Length Filament

LP: Lomber Ponksiyon

AF: Ara filaman

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Multiple Skleroz ve hastalık alt tiplerinin klinik gidişatı.....	9
Resim 2: SSS dışında immün sistem disregülasyonu.....	14
Resim 3: Multiple Skleroz’da SSS içerisinde erken ve geç dönemde immün sistem disregülasyonu.....	16
Resim 4: Kan beyin bariyeri(A) ve kan bos bariyeri(B).....	20
Resim 5: Sağlıklı ve MS beyninde KBB’nin rolü.....	22
Resim 6: 2017 Revize McDonald Kriterleri (Thompson ve Arkadaşları).....	25
Resim 7: MS tanısı ve ayırıcı tanısında kullanılan tetkikler.....	27
Resim 8 : NMOSB’da AQP4 ve MOG IgG antikorları.....	32
Resim 9: Multiple skleroz, tanısal, aktivite, tedaviye cevap biyobelirteçleri.....	38
Resim 10: CD4 ⁺ T hücrelerinin farklılaşması ve patogeneizde görevli sitokinler..	42
Resim 11 : Reaktif astrogliazisin tetiklenmesi ve sonuçları.....	50
Resim 12: NFL’nin aksonal hasar sonrası vücut sıvılarında dağılımı.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: BCA standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	68
Şekil 2: GFAP standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	73
Şekil 3: Serum NFL standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	74
Şekil 4: BOS NFL standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	76
Şekil 5: Osteopontin standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	77
Şekil 6: GAP-43 standart absorbens konsantrasyon eğrisi.....	79

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Multiple Skleroz hastalık başlangıcındaki belirtiler ve sıklıkları.....	7
Tablo 2: Multiple Skleroz çevresel risk faktörleri.....	11
Tablo 3: Nicel değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler.....	82
Tablo 4: Serum biyobelirteç düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	84
Tablo 5: Serum biyobelirteç düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	87
Tablo 6: Biyobelirteç değerlerinin numune türlerine göre karşılaştırılması.....	97
Tablo 7: Biyobelirteç serum düzeylerinin NMOSBH altgrupları AQP4+,MOG+ gruplarına göre karşılaştırılması.....	99
Tablo 8: Serum biyobelirteç düzeylerinin bütün hasta gruplarında ilaç kullanımına göre karşılaştırılması.....	100
Tablo 9: NFL düzeylerinin hasta ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması....	103
Tablo 10: Biyobelirteç düzeylerinin birbirleri ve GD+T1 lezyon ile ilişkisi.....	104
Tablo 11: Biyobelirteç düzeylerinin EDSS, relaps sayısı ile ilişkisi.....	105
Tablo 12: Yaş ve hastalık süresinin biyobelirteç düzeyleri ile ilişkisi.....	106
Tablo 13: BOS ve serum örneklerinde biyobelirteçlerin korelasyonu.....	107

Tablo 14: MS Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	108
Tablo 15: NMOSBH Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	109
Tablo 16: RRMS Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	110
Tablo 17: PPMS Sağlıklı Kontrol Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	111
Tablo 18: SPMS Sağlıklı Kontrol Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	112
Tablo 19: RRMS-SPMS Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	113
Tablo 20: RRMS-SPMS Grubu ROC Analizi Sonuçları.....	114

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Numune türü BOS olan gruplarda GFAP değerlerinin dağılımı.....	90
Grafik 2: Numune türü serum olan gruplarda GFAP değerlerinin dağılımı.....	90
Grafik 3: Numune türü BOS olan gruplarda NFL değerlerinin dağılımı.....	91
Grafik 4: Numune türü serum olan gruplarda NFL değerlerinin dağılımı.....	91
Grafik 5: Numune türü BOS olan gruplarda Osteopontin değerlerinin dağılımı.	92
Grafik 6: Numune türü serum olan gruplarda Osteopontin değerlerinin dağılımı.....	92
Grafik 7: Numune türü BOS olan gruplarda GAP-43 değerlerinin dağılımı.....	93
Grafik 8: Numune türü serum olan gruplarda GAP-43 değerlerinin dağılımı.....	93
Grafik 9: Numune türü BOS ve serum olan gruplarda İL-6 değerlerinin dağılımı.....	94
Grafik 10: RRMS, PPMS alt gruplarında immünmodülatör tedavi alanlar ile almayanlar arasında BOS NFL düzeyleri box-plot grafiği.....	101
Grafik 11: Bütün hastalık alt gruplarında immünmodülatör tedavi alanlar ile almayanlar arasında serum NFL düzeyleri box-plot grafiği.....	101

Grafik 12: İmmümodulator tedavi rejimlerine göre NFL ortalama değerlerinin grafiksel gösterimi.....	102
Grafik 13: Multiple Skleroz Grubu ROC eğrisi grafiği.....	108
Grafik 14: NMOSBH grubu ROC eğrisi grafiği.....	109
Grafik 15: RRMS grubu ROC eğrisi grafiği.....	110
Grafik 16: PPMS grubu ROC eğrisi grafiği.....	111
Grafik 17: SPMS grubu ROC eğrisi grafiği.....	112
Grafik 18: RRMS-SPMS grubu ROC Eğrisi.....	113
Grafik 19: RRMS-SPMS grubu ROC Eğrisi.....	114

1.GİRİŞ

Multiple Skleroz (MS) genç erişkinlerde fiziksel ve kognitif engelliliğin en sık sebeplerinden birisi olan; kronik, nörodejeneratif, nöroinflamatuvar santral sinir sistemi (SSS) hastalığıdır. Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları (NMOSBH) ciddi, geri dönüşsüz hasara sebep olabilen ataklarla seyreden; büyük oranda optik sinir ve medulla spinalisi etkileyen kronik, nöroinflamatuvar, otoimmün SSS hastalığıdır.

Nöromyelitis Optika (NMO) on sene öncesine kadar MS'in bir varyantı olarak gösterilirken, hastalığın patolojisini başlatan aquaporin-4 IgG (AQP4 - IgG) otoantikörünün keşfi ile beraber NMO MS'den ayrı bir hastalık olarak tanımlanmaya başlamıştır. NMO tanısı konan hastaların da kendi içerisinde farklı klinik özellikler barındırması sebebi ile bu hastalık grupları NMOSBH olarak kapsayıcı bir tanım altında incelenmeye başlanmıştır.

Bu hastalıklar grubunun kliniğe başvuru sırasında spesifik olmayan klinik ve radyolojik bulgular gösterebilmesi sebebi ile tanısal belirsizlik oranları artmış, yanlış tedavi rejimlerine başlanabilme ihtimalleri ortaya çıkmıştır.

Biyobelirteçler objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen, normal biyolojik süreçlerin, patolojik süreçlerin veya da tedaviye verilen cevapların göstergesi olarak tanımlanmıştır. Doğru ve güvenilir bir biyobelirtecın, hastalığın gidişatını ve sonuçlarını öngörebilen herhangi bir madde, yapı veya süreç olduğu belirtilmiştir.

MS ve NMOSBH'nin fizyopatolojisi günümüzde net olarak bilinmemektedir. Hastalık patolojisi hakkında öne sürülen hipotezler, medikal tedavi ajanlarının keşfinde temel oluşturmuştur. Hastalık fizyopatolojisini net bir şekilde gösterebilecek biyobelirteç, hastalık takibini kolaylaştıracak, belirli bir molekülü hedefleyen yeni terapötik ajanların keşfedilmesine imkan sağlayabilecektir.

Tanısal belirsizlik oranlarını azaltabilmek için kolay ulaşılabilen, invaziv olmayan, subklinik evrede hastalık ile ilgili bilgiler verebilecek biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kronik nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili biyobelirteçler, hastalığın gidişatı hakkında bilgi verebilmeli, prognozunu nasıl olacağını öngörebilmelidir.

MS'de progresif bir kötüleşme olduğu için, seçilecek doğru bir biyobelirteç, hastalık progresyonunun başlangıcında olan hastaları yakalayabilecek, bu sayede daha efektif bir tedavi rejimine geçilmesi ile hastalığın ilerlemesini durdurmaya yardımcı olabilecektir.

Kronik nörodejeneratif hastalıklara sahip hastaların rutin kontrollerinde Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme tetkikleri ile hastaların lezyon takibi yapılmaktadır. MRG ile henüz oluşma aşamasındaki lezyonlar gözden kaçabilmekte, bir sonraki vizite kadar hastada kaçınılmaz kötüleşmeler olabilmektedir. Oysa ki geliştirilecek biyobelirteçler ile minimal invaziv metot ile elde edilebilecek kan numunelerinden, hastalık ile ilgili anlık değerlendirme yapabilme imkanı olabilecektir.

Nörofilamanlar Ara Filamanlar (AF) grubunda bulunan, aksona yapısal destek ve sağlamlılık sağlayan proteinlerdir. Aksonal hasar durumlarında hastalık etyolojisine bakılmaksızın beyin omurilik sıvısı (BOS) ve daha az oranda kana bu proteinlerin geçişinin olması beklenmektedir.

Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) astrositlerde bulunan AF'lerdir. Astrositlere yapısal destek ve sağlamlılık sağlamaktadırlar. Astrogliazis ve astrosit hasarının olduğu süreçlerde BOS ve daha az oranda kanda miktarlarının artması beklenmektedir.

İnterlökin – 6 (İL-6) MS ve NMOSBH fizyopatolojisinde merkezi konumda görev alan bir sitokindir. T helper (Th) 17 ve AQP4 – IgG antikorlarını üreten plazma hücrelerinin aktivasyonu için gereklidir. Hastalık aktivasyonunda düzeylerinin artması beklenmektedir.

Osteopontin nöroinflamasyonun oluşumunda ve ilerlemesinde rolü olan atipik immun regülatördür. T hücre gelişiminde ve farklılaşmasında görevlidir.

Growth Associated Protein – 43 (GAP – 43) aksonal ve sinaptik rejenerasyonda görevli sinaptik membran proteinidir. Büyüyen ve rejenere olan aksonlarda BOS ve kan düzeylerinin artması beklenmektedir.

Tek bir biyobelirteç tanı koymada tek başına yeterli değildir. Hastalık patogenezinde önemi olduğu gösterilen belirteçler, klinik bulgular ve MRG gibi görüntüleme yöntemleri ile beraber tanı koymaya yardımcı olurlar. Özellikle

hastalık takibinde, verilen tedaviye verilen cevabın değerlendirmesinde nörofilamanlar ve GFAP gelecek vadeden belirteçlerdir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.1 Nöroimmunolojik Hastalıklar Nedir?

Nöroimmun hastalıklar; nörodejenerasyon ve otoimmun demyelinizasyonun olduğu, fırsatçı enfeksiyonların hastalık sebebi olabildiği, paraneoplastik ve nöropsikiyatrik hastalıkların görülebildiği bir dizi hastalık ve olayların gözlendiği hastalıklar bütünün hepsine verilen isimdir. Bu hastalıklar multifaktöriyel, kompleks, çoğunlukla da genetik, çevresel faktörler ve bozulmuş immünitenin rol aldığı mekanizmalar ile tetiklenen heterojen klinik ve patolojik özellikleri olan hastalıklardır. Doğal immünite yolaklarının aktivasyonu, efektör T hücrelerinin ve otoantikörlerin üretimi, inflame kan beyin bariyeri (KBB), aktiveleştirilen mikroglialar, astrositler, oligodentrositler ve nöronlar nöroimmün hastalıkların oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hastalıklar hakkındaki güncel çalışmalar genetik , biyobelirteç keşfi, ayırıcı tanı, tedavi seçimi ve nöroimmünolojik yolaklarının temelini araştırmak üzerinedir (1, 2). Bütün nöroimmün hastalıkların temelinde nöronal antijenlere karşı gelişen immün aktivasyon yatmaktadır . Nöroinflamasyon nöroimmün hastalıkların belirgin özelliklerinden birisidir ve nöroinflamasyona karşı geliştirilen immünterapotik ajanlar nöroinflamatuvar hastalıklara karşı önemli faydalar sağlamıştır (3, 4).

2.1.2 Nöroimmunolojik Hastalıkların Mekanizmaları

Nöroinflamasyon, nöronal antijenlere immün cevap ile indüklenir. Doğal ve kazanılmış immün hücrelerin kompleks etkileşimleri, vasküler inflamasyon, astrositler ve mikroglia hücreleri nöroimmün hastalıkların patolojisinde görev almaktadır. **Hücre aracılı otoimmün cevap nöronal otoimmünitenin belirgin özelliğidir.** $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositler patolojinin başlamasını ve yayılmasını tetikler ve nöronal antijenlere karşı otoantikor cevabını destekler. Normal fizyolojide, timusta negatif seleksiyon ile otoreaktif T lenfositlerin büyük çoğunluğu elimine edilmektedir. Fakat, bazı düşük affiniteli self-reaktif T hücreleri timik santral toleranstan kaçır ve periferik lenfoid organlara mobilize olur. Bu otoreaktif T hücrelerinin SSS hasarı yapmak için aktivasyonu nöronal T hücre cevabını indükler. Genetik ve çevresel faktörler nöronal otoimmüniteyi de düzenlediğinden, patojenik mikroorganizmaların antijenleri ile nöronal antijenlerin moleküler benzerlikleri otoreaktif $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu da tetikler. Örnek olarak, Epstein Barr Virüs (EBV) enfeksiyonları ve reaktivasyonları MS gelişme riski ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (1, 2).

2.2 Multiple Skleroz

2.2.1 Tanım ve Tarihçe

MS inflamasyon, demyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterize; beyin ve spinal kordu etkileyen kronik otoimmün SSS hastalığıdır. Bu hastalıkta myelin kılıflar, oligodentrositler ve daha az oranda akson ve nöronlar hasarlanır. 2015’de

dünya çapında yaklaşık 2.3 milyon insanın MS hastalığına sahip olduğu belirtilmiştir (5). İlk olarak 1868 yılında Jean – Martin Charcot tarafından hastalık tanımlanmıştır. Günümüze kadar hastalığın değişik formları tanımlanıp tanı kriterleri değiştirilmiştir. Hastalığın ortalama başlama yaşı 20-50 arasındır; kadınlarda erkeklerden iki kat fazla görülmektedir (6, 7).

MS kişisel ve sosyoekonomik ciddi yükler getirmektedir. Hastalığın ortalama başlama yaşı olan 30, iş ve aile planlaması için belirleyici bir yaş grubudur. Genç erişkinlerde özellikle de kadınlarda ciddi fiziksel engellilik sebebidir. Tanıdan ortalama 25 sene sonra , hastaların yaklaşık yarısı tekerlekli sandalye kullanma ihtiyacı duymaktadır (8).

2.2.2 Klinik Belirtiler

MS hastalarında SSS hasarına bağlı tüm belirti ve bulgular ortaya çıkabilse de bunların görülme sıklıkları değişkendir. Ekstremitelerde güçsüzlük, duysal belirtiler, ataksi, mesane problemleri, yorgunluk, diplopi, görme bulanıklığı gibi görsel belirtiler; dizatri, bellek-konsantrasyon-dikkat bozukluğu gibi kognitif yakınmalar sık görülen belirtilerdir. Buna karşılık hareket bozuklukları, epileptik nöbet, baş ağrısı, demans düzeyinde kognitif yıkım, kortikal belirtiler, işitme kaybı, amyotrofi seyrek görülen belirti ve bulgulardır(9).

Tablo 1: Multiple Skleroz hastalık başlangıcındaki belirtiler ve sıklıkları (9)

Bir ya da daha fazla ekstremitede güçsüzlük	%35
Optik Nörit	%20
Parestezi	%20
Diplopi	%10
Vertigo	%5
Mesane Problemleri	%5
Diğer	<%5

2.2.3 Klinik Seyir Tipleri

MS klinik alt tipleri 2013 yılında Lublin ve arkadaşları tarafından Klinik İzole Sendrom (KİS), relapsing (ataklı) ve progresif (kötüleşen) MS olarak üç başlık altında tanımlanmıştır (9). Bu klinik tipleri tanımlamada, hastalığın aktive olması ya da hastalığın ilerlemesi, özürllülüğün giderek artması göz önünde bulundurulmuştur. Daha önce ki kılavuzlarda kullanılmış bir terim olan progresif-relapsing terimi artık kullanılmamaktadır çünkü bu hastalar progresif-aktif hastalar grubu içine alınmıştır. KİS, MS fenotipleri arasına dahil edilmiştir. Radyolojik izole sendrom (RİS) grubuna ait hastalar klinik belirti ve bulgulara sahip olmadığından bir MS fenotipi olarak belirlenmemiştir (9).

2.2.3.1 KİS

İzole optik nöropati, medulla spinalis tutulumu, beyin sapı sendromu ve daha az oranda hemisferik tutulum şeklinde bulgu vererek ortaya çıkan, MRG’de MS’i düşündüren semptomatik ya da asemptomatik (sessiz) lezyonların gözlendiği,

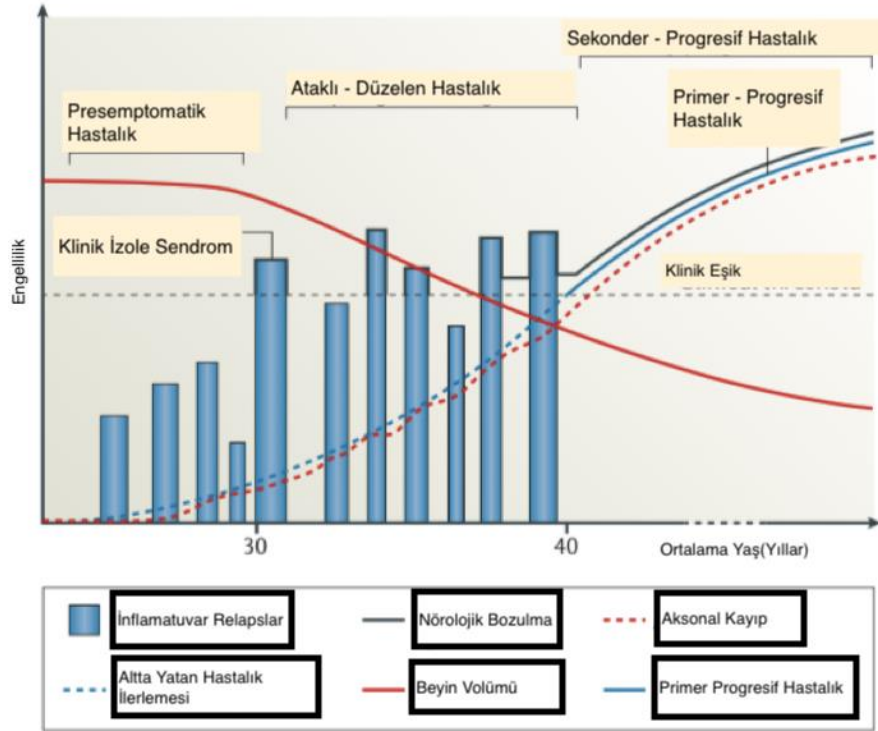
SSS'nin inflamatuvar demyelinizan özellikte etkilendiği ilk nörolojik tablo KİS olarak adlandırılmaktadır (9).

2.2.3.2 Ataklarla Seyreden MS (RRMS)

Akut atakları izleyen tam ya da tama yakın düzelme dönemleri mevcuttur, ataklar arasında hastalıkta ilerleme gözlenmez (9). MS hastalarının %85'ini etkileyen, en sık görülen formdur (10).

2.2.3.3 Progresif MS

Hastalık seyri sırasında özörlölölölöl eklendiği alt tiptir. Atak ve iyileşmeler ile giden ortalama 5-6 senelik erken dönem sonrası atak sayısının azaldığı, düzelmenin az olduğu, özörlölölölöl giderek arttığı ikinci ilerleyici dönem gözlenebilir (sekonder progresif MS (SPMS)). SPMS'de inflamatuvar lezyonlar spesifik değildir. SSS atrofisine ilerleyici nörolojik fonksiyon kaybı da eşlik eder. Hastalık ilerledikçe beyin volümü azalır, artmış aksonal kayıp bu azalmaya eşlik eder (10). Başlangıçtan itibaren ilerleyici bir kötüleşme varsa, bu durum primer progresif MS (PPMS) olarak adlandırılmaktadır (9) . PPMS, MS hastalarının yaklaşık %10'unu oluşturur. Burada ataklar kötüleşmeye eşlik etmez (10).



Resim 1: Multiple Skleroz ve hastalık alt tiplerinin klinik gidişatı (10)

2.2.4 Etiyoloji

MS' in kesin sebebi bilinmemektedir. Genetik olarak yatkın kişilerde çevresel faktörler ve tetikleyicilerin etkisi ile hastalığın oluştuğu düşünülmektedir. MS hastalarının büyük çoğunluğunda hastalık ile ilişkili olabilecek aday genlerin immünolojik patolojiler ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. MS ve diğer otoimmün hastalıkların ilişkili olduğu genomik bölgeler birbiri ile ilişkili olabilir. MS dışında başka bir otoimmün hastalığın , MS ile beraber aynı genomik bölgeyi paylaştığı durumlarda bu durum MS'in başlaması için predispose edici bir faktör olabilmektedir. Genetik olarak yatkın kişilerde otoimmünite direkt olarak tetiklenebildiği gibi, immün hücrelerin aktivasyonuna çevresel faktörlerin de katkısı olabilmektedir (11, 12).

Çevresel faktörler otoreaktif T hücrelerinin direkt tetiklenmesinde görev alır. Bu hastalıkta etyoloji genellikle viral veya mikrobiyal etkenlerdir. Moleküler mimikri ile (çevresel antijenlerin, SSS’de hedef olan moleküle benzemesi) bu antijenler etkilerini gösteriler. Aynı zamanda SSS’ye affinitesi yüksek olan enfeksiyöz ajanlar SSS antijenlerinin perifere salınmasını kolaylaştırır (11, 12).

Enfeksiyona bağlı periferik inflamasyonun SSS üzerine direkt etkisi olabilir. Lokal olarak salınan sitokinler afferent sinir sonlanmalarını uyarır. İmmün sistem hücreleri uyarıldıktan sonra dolaşımda yüksek konsantrasyonlarda sitokinler görülmeye başlar. Bu sitokinler KBB’yi geçer ve perivasküler makrofajları uyarır. İmmün sistem SSS iletişimi sonucunda mikrogial hücrelerin aktivasyonu meydana gelir. Bazı vakalarda MS; SSS’ye karşı direkt bir otoreaktif cevap olmaksızın, indirekt olarak periferik inflamasyonun mikrogial nörodenerasyonu tetiklemesi ile meydana gelmektedir (13).

Bugüne kadar literatürde raporlanan MS riskini arttıran çevresel faktörler çok çeşitlidir. Bunlar vitamin D eksikliği, Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu, sirkadyan ritmin bozulması, sigara içimi, EBV enfeksiyonlarıdır. Bu şüpheli çevresel faktörler arasında MS riskini artırdığı en iyi gösterilenler sigara içimi ve EBV enfeksiyonudur (14).

Tablo 2: Multiple Skleroz çevresel risk faktörleri (15)

RİSK FAKTÖRÜ	ODDS RATIO	HLA ANTİJEN GENİ İLE ETKİLEŞİMİ	KANITIN GÜÇLÜLÜĞÜ
Epstein -Barr virüs seropozifliği	3.6	Evet	+++
Gençlik obezitesi	2	Evet	+++
Sigara İçimi	1.6	Evet	+++
Vitamin D eksikliği	1.4	Muhtemel	+++
Düşük güneş ışığı maruziyeti	2	Muhtemel	++
Vardiyalı işte çalışma	1.7	Hayır	++
Enfeksiyöz mononükleozis	2	Evet	++
Pasif sigara içimi	1.3	Bilinmiyor	+
Oral tütün kullanımı	0.5	Bilinmiyor	+
Kahve	0.7	Bilinmiyor	+
Alkol	0.6	Bilinmiyor	+

MS ile ilişkili şu ana kadar, hastalık ile kesin ilişkisi tanımlanan tek bir otoantijen, otoantikor veya enfeksiyöz ajan tanımlanmamıştır. Fakat diğer otoimmün hastalıklarla ortak şüpheli gen bölgelerini paylaştığı görülmüştür. İmmünsüpresif tedavilerin hastalık gidişatını modifiye ettiği görüldükten sonra birçok araştırmacı MS'in primer organ spesifik otoimmün hastalık olabileceğini düşünmüştür. Otoimmün tiroid hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve psöriasis gibi bazı otoimmün hastalıkların ortaya çıkma riskinin MS hastalarında arttığı görülmüştür (16).

Nöroimmünite ve nöroinflamasyon, MS patogeneziindeki temel patolojilerdir. Patofizyolojik olaylar kaskadının başlatıcısı inflamasyon mu, bilinmeyen bir enfeksiyöz ajana ikincil cevap mı, intrinsik/primer SSS dejenarasyonu mu hala tartışmalıdır ve şüphelidir (17, 18). Birçok çalışmaya göre, **self-reaktif immün hücrelerin SSS'ye girmesi ve myelin kılıf komponentlerine saldırması primer patojenik olaydır.** İmmün toleransın etkisiz hale gelmesi ile otoreaktif lenfositler prolifer olmaya başlar. Fakat bu hücrelerin nasıl aktive olup prolifer oldukları, SSS'ye ulaştıkları, patolojik olayları yönetip nörolojik disfonksiyona yol açtıkları net değildir. Bu olaylarda genetik ve çevresel faktörlerin beraber rol aldıkları düşünülmektedir (15). Hastalığa spesifik çevresel faktörler olsa bile bu hastalar klinik bulgu ile hastaneye başvurduğu zaman, predispoze edici faktörün üzerinden uzun yıllar geçmiş olabilmektedir. Bu da predizpoze edici çevresel faktörleri tanımlamayı oldukça zor hale getirmektedir (19). Çevresel faktörleri tanımlamak zor olsa da, modifiye edilebilen risk faktörlerini tanımlayabilmek, hastalığı önlemeye yönelik yapılacak çalışmaların önünü açabilecektir (15).

Genetik yatkınlığı olan kişilerde hayatın erken döneminde çevresel faktörlere maruziyet, bozulmuş immün tolerans, otoreaktif kazanılmış immün hücrelerin aktivasyonu ve bu hücrelerin SSS'ye ulaşması patolojik olaylar zincirini başlatarak demyelinizasyon, aksonal, nöronal hasar ve gliosis ile sonuçlanır. Zaman geçtikçe tamir mekanizmaları yetersiz kalır, SSS içerisinde doğal immünite aktivasyonu olur. Oksidatif hasar, anormal enerji metabolizması ve meninkslerde lenfoid folikül benzeri oluşumlar meydana gelmeye başlar. Zamanla koruyucu mekanizmalar kaybolur ve nörolojik kötüleşme ile süreç sonuçlanır (20).

Otoreaktif lenfositlerin SSS'ye girmesi ile beraber demyelinizasyon, nöroaksonal dejenerasyon, **sinaptik kayıp**, **oligodendrogliopati** en sonunda doku kaybı, astroglizis ile süreç sonuçlanır. İmmünopatolojik olaylar beyaz ve gri cevherde demyelinize alanların oluşmasına sebebiyet verir. Oligodentrositlerin ve myelin kılıfın kaybı, astrositik skar, MS için karakterize demyelinizan plakların oluşumu ile sonuçlanır (16).

2.2.5 Fizyopatoloji

MS, plak veya lezyon olarak adlandırılan, beyin ve spinal kordun beyaz ve gri cevherindeki demiyelinize alanlarla karakterizedir. Demiyelinize alanlar myelin kılıf ve oligodentrositlerin kaybını göstermektedir (21).

2.2.5.1 Lezyon oluşumu

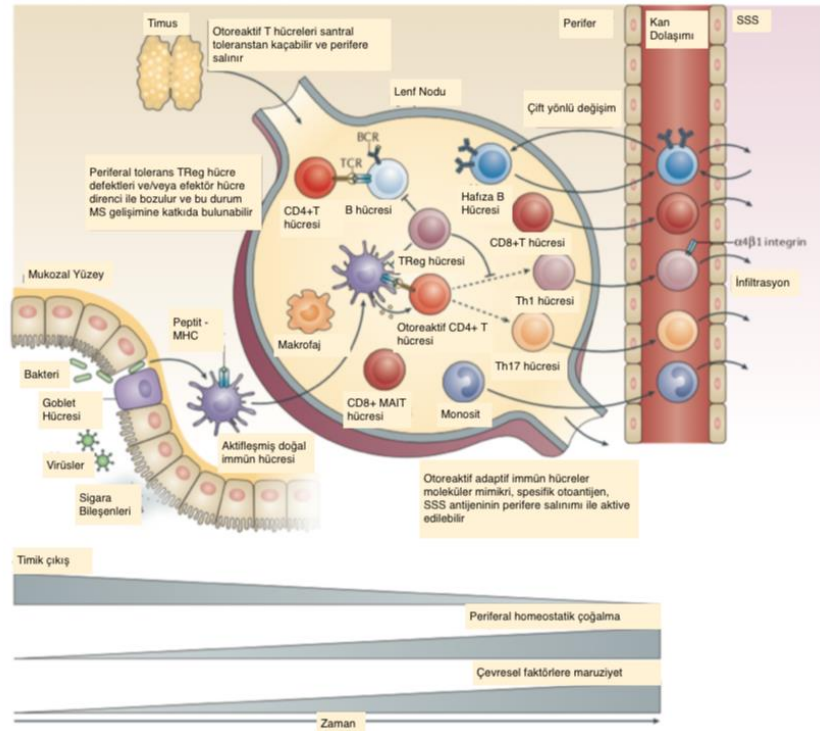
İnflamasyon MS'in bütün evrelerinde vardır. Fakat akut fazda kronik faza göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Erken lezyonlarda KBB'nin periferal immün hücreler ile invazyonu ve hücrelerin KBB'ye sızıntıları olduğu iddia edilmiştir. Makrofajlar bu lezyonlarda büyük bir alanı kaplar. Lezyonlarda miktarlarına göre makrofajları sırası ile CD8⁺ T hücreleri ve daha az sayıdaki CD4⁺ T hücreleri izlemektedir. B hücreleri ve plazma hücreleri daha az oranda bulunmaktadır (22).

Hastalık ilerledikçe, lezyonlarda diffüz inflamatuvar T ve B hücreleri infiltratları, mikrogliya, astrosit aktivasyonu ve diffüz myelin kaybı ve aksonal hasar belirginleşir. Bu olaylar neticesinde gri ve beyaz cevherde daha fazla atrofi meydana gelir (21). Hastalık ilerledikçe infiltrattaki T hücre kompozisyonu

değişmezken, B hücreleri ve plazma hücrelerinin oranı artmaktadır (23). İnflamasyon, SSS içinde zaman geçtikçe daha organize hale gelir. Hastalık ilerledikçe periferden MSS'ye olan inflamatuvar hücre akışı azalır . SPMS'de meninkslerde üçüncül lenfoid yapılar bulunur. Bu inflamatuvar agregatlar kortikal demyelinizasyona ve doku hasarına katkıda bulunurlar (24).

Akson ve nöronlar MS'in erken dönemlerinde çoğunlukla korunurlar. Devam eden hastalık nöroaksonal kayıp ve bu kayıpla orantılı olarak hasta engelliliğinde artma sonrasında beyin atrofisi ile sonuçlanır. Astrositler beyaz cevher lezyonlarında glial skar oluştururlar. Beyaz cevherdeki demyelinize alanlar remyelinizasyonla kısmi olarak tamir edilmeye çalışılır (21).

2.2.5.2 Santral sinir sistemi dışında immün sistem disregülasyonu



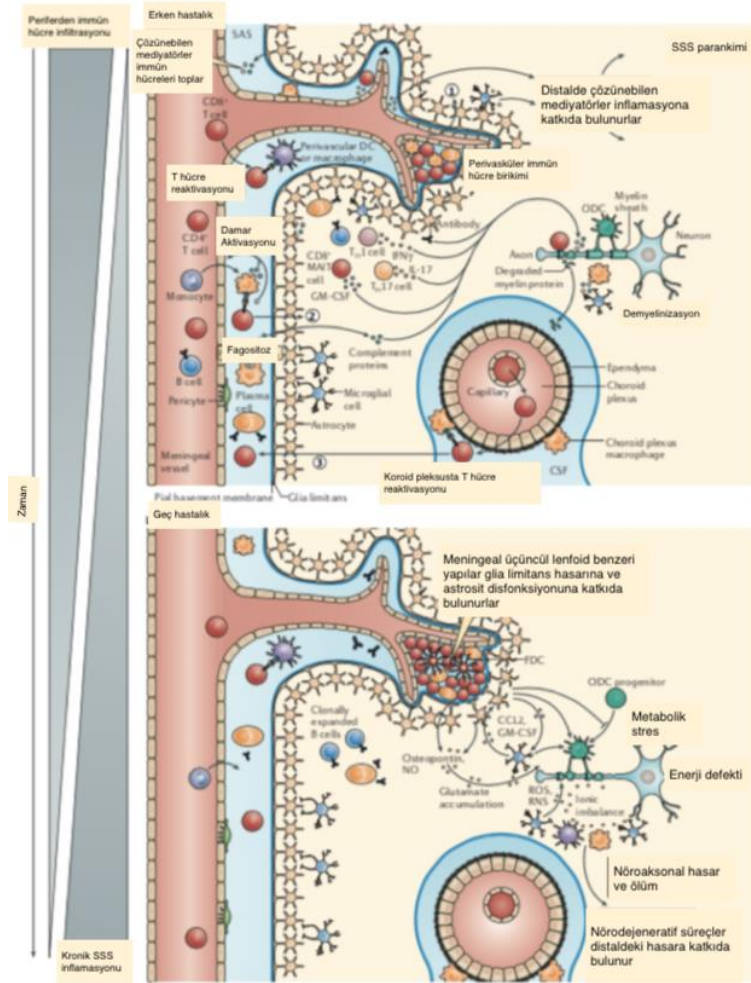
Resim 2: SSS dışında immün sistem disregülasyonu (10)

Timusda ki santral tolerans ile otoreaktif T hücrelerinin çoğu ortadan kaldırılır. Fakat bu sistem her zaman mükemmel işlemez. Otoreaktif T hücrelerinin bazıları perifere salınır. Normal şartlarda, periferel tolerans mekanizmaları perifere kaçan bu hücreleri kontrol altında tutar. Eğer bu periferel tolerans bozulursa (Treg hücre fonksiyonu azalması/Efektör T ve B hücrelerinin süpresyon mekanizmalarına artmış direnci) moleküler mimikri mekanizması ile periferde aktive olurlar. Genetik ve çevresel faktörler, enfeksiyöz ajanlar, sigara içimi bu olaylara katkıda bulunur. CD8⁺ T hücreleri aktive olur, CD4⁺ T helper, T helper 1 (Th1) ve Th17'ye diferansiye olur. B hücreleri ve doğal bağışıklık hücreleri SSS'ye infiltre olur, inflamasyon ve doku hasarına yol açarlar (10).

2.2.5.3 SSS: İmmün Korunaklı Bölge

Yabancı antijenlere karşı azalmış immün cevapla karakterize vücut bölümleri immün korunaklı bölgeler olarak isimlendirilmektedir. SSS'de immün korunaklı (immune-privileged) bölge olarak tanımlanmaktadır. İmmünojenik ajanlar SSS parankimine uygulandığı takdirde adaptif immün yanıt ortaya çıkmaz. Bu durumun belli başlı sebepleri vardır. Endotelial ve epitelyal bariyerler lökosit hareketlerini sınırlandırır (KBB, kan-BOS bariyeri (KBSB) ve kan-leptomeningeal bariyerler). Aynı zamanda beyin parankiminin anti-inflamatuvar çevresi ile BOS ve lenfatik sistemin anatomik izolasyonu da bu duruma katkıda bulunur. Fakat farelerde yapılan bir çalışmada SSS lenfatiklerinin dural sinüslere drene olduğu, SSS ve lenfatik sistem arasındaki anatomik bağlantı yetersizliği hakkındaki bu hipotezin tekrar değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (25, 26).

2.2.5.4 Multiple Skleroz'da SSS içerisinde erken ve geç dönemde immun sistem disregülasyonu



Resim 3: Multiple Skleroz'da SSS içerisinde erken ve geç dönemde immun sistem disregülasyonu (10)

MS'in erken ve geç döneminde hastalık patogenezinin katkıda bulunan olaylar farklılık göstermektedir. Hastalığın erken dönemlerinde periferden SSS'ye olan immün hücre infiltrasyonu çok belirgin iken hastalığın geç fazlarına doğru

gidildikçe periferden SSS'ye olan immün hücre infiltrasyonu azalmaktadır. Periferden gelen immün hücreler meningeal damarlardan direkt KBB'ye geçerek, subaraknoid aralıktan veya da koroid pleksustan KBSB bariyerini geçerek MS'in erken dönem belirtilerini oluşturur. Sonrasında direkt hücre aracılı hasar mekanizmaları ile, çözünebilen inflamatuvar ve nörotoksik mediyatörlerin etkisi ile demyelinizasyon ve aksonal hasar ortaya çıkar. **Hastalık ilerledikçe, periferden SSS'ye gelen immün hücrelerin infiltrasyonu azalır. Bu azalmanın da sebebi olarak kronik antijen maruziyetine bağlı adaptif immün hücre tükenmesi gösterilmektedir.** İlerleyen evrelerde, kronik SSS-intrinsik inflamasyonu ve nörodejenerasyon devam eder. Meningeal üçüncül lenfoid-benzeri yapılar ,hastalığın bu döneminde (progresif dönem), özellikle de SPMS'de gösterilmiştir. Bu yapılar MS'deki geç dönem inflamasyona katkıda bulunmaktadır. Hastalığın geç döneminde ayrıca, astrositlerin hasarlanmasına bağlı olarak glutamat birikimi, reaktif oksijen metabolitlerinin birikimi, iyonik imbalans, metabolik stress enerji azlığı gibi sebepler bu süreçlere katkıda bulunur (10).

2.2.5.4 Primer Progresif Multiple Skleroz

PPMS patofizyolojisi çok net olmamakla beraber, inflamasyonun tetiklediği demyelinizasyon, B ve T lenfositlerin aktivasyonu, mitokondrial disfonksiyon ve demir birikimi gibi çeşitli mekanizmaların patofizyolojide rol aldığı düşünülmektedir (27). Glial aktivasyonun da nöroaksonal hasar, nöronal ölüm progresyonunda belirleyici rolü olduğu öne sürülmektedir (28). Glial aktivasyon PPMS'deki nörodejenerasyon progresyonunun varsayılan sebebidir. MS'de astrosit

aktivasyonu iki ucu keskin kılıç gibidir. Glial skar formasyonu dokuyu diğer gelecek olan hasarlara karşı korurken, oluşan skar aynı zamanda remyelinizasyonu önler (28). Progresif hastalıkta ki patogeneze çok net olmadığı için bu hastalık alt tipine karşı geliştirilen tedavi rejimleri de hastalığın ilerlemesini ve nöroaksonal kaybı durduramamaktadır (10).

2.2.5.5 Multiple Skleroz'da relaps

MS'de **relapsların**, SSS'nin belirli bölümlerinde ki inflamatuvar agregatların subakut gelişimi ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bu inflame alanlar gelişimi ile orantılı olarak kan beyin bariyeri destrüksiyonu ile ilişkilidir ve MRG'da gadolinium-enhancing (Gd+) lezyonlar olarak görülmektedir (29). MS **relaps** patogenezinde dikkate alınan bir diğer hipotez, periferde aktive olan otoreaktif lenfositlerin, KBB'ye infiltre olması ve sonrasında patogeneze ile ilgili olayların ortaya çıkmasıdır (10).

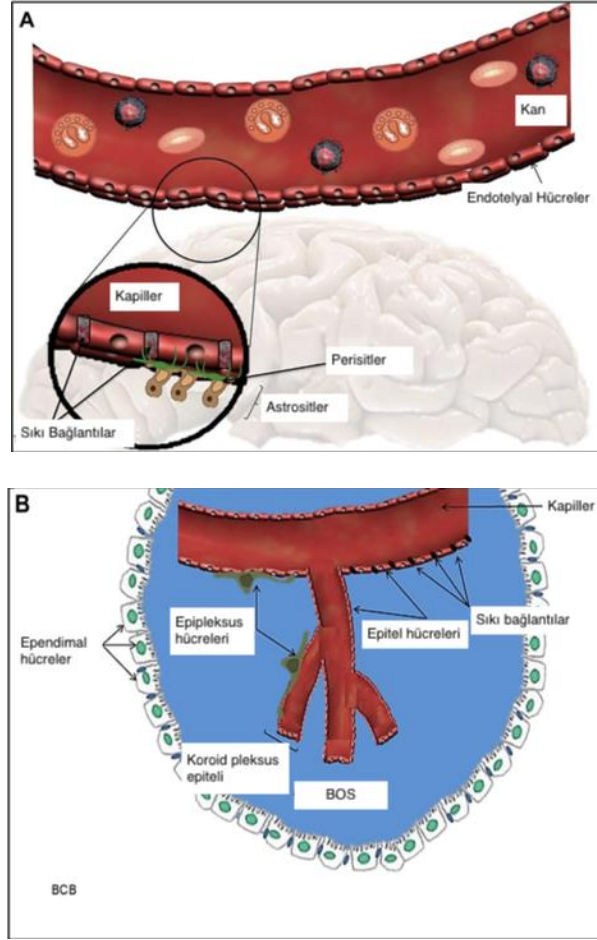
2.2.5.6 İmmün Hücre Aktivasyonu

Bilinen bir predominant ekzojen risk faktörü yokluğunda, MS'in periferde olan immün hücre aktivasyonu sonucu mu, SSS kaynaklı mı olduğu konusu tartışmalıdır. Moleküler mimikri ve primer nörodejenerasyon bu konu hakkında tanımlanan hipotezlerdir. Yabancı bir antijene ait peptidin, self-proteinin bir parçasına benzeme özelliği temelinde T hücresine sunulması ile otoimmün reaksiyonun tetiklenmesi olayı moleküler mimikri ismini almaktadır. SSS kaynaklı

hücreler tarafından tetiklenen, aksonların ve nöronların progresif disfonksiyonu ile sonuçlanan süreçtir. Periferden olan hücre infiltrasyonunun zıttıdır (10).

2.2.6 Kan Beyin Bariyeri ve Kan Bos Bariyeri

KBB ve KBSB, sistemik dolaşım ile SSS arasında, devamlı hücresel bariyerden oluşan kompleks bir ağı temsil eden yapılardır. SSS için kritik olan önemli metabolik değişimlerin çoğu bu sıkı kontrol edilen ağ aracılığı ile olmaktadır. KBB beyin dokusu ve kan damarları arasında bir arayüzdür. Beyin dokusu ile kan dolaşımını ayıran membranöz bir oluşumdur. KBSB meninkslerin araknoid tabakası boyunca koroid pleksus yerleşimlidir (30, 31). Serebral endotel hücreleri, perisitler ve bunların bazal laminaları, bunları çevreleyen ve destekleyen astrositler ve perivasküler makrofajlar KBB'nin kompleks organizasyonunu oluşturmaktadır. SSS'de kapillerler diğer dokulardaki kapillerlerden yapısal olarak farklıdır. Penceresi olmayan özel endotelial hücrelerce çevrilip sıkı bağlantılarla kapatılmıştır (32).



Resim 4: Kan beyin bariyeri(A) ve kan bos bariyeri(B) (33)

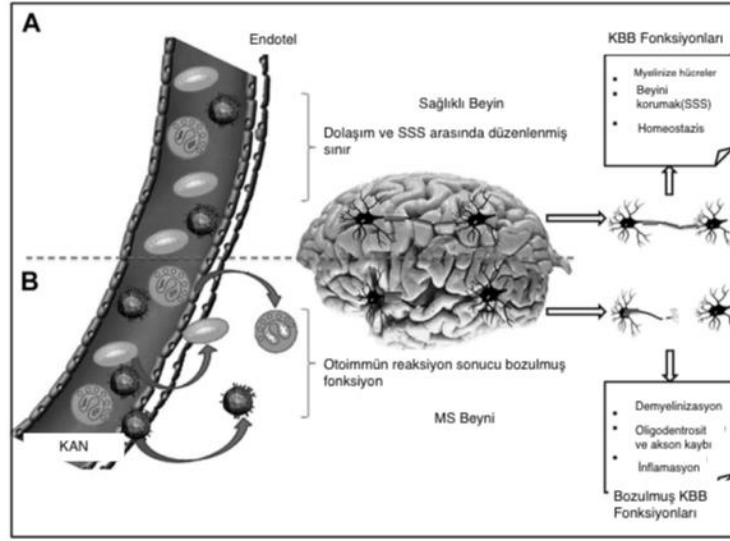
2.2.6.1 Multiple Skleroz’da kan beyin bariyeri destrüksiyonu

Otoimmün aktivasyonun sonucunda, lenfositler periferde aktive olup SSS’ye infiltre olur ve sonunda myelin ve akson kaybına sebep olan lokal immun cevap tetiklenir. Myelin kaybına, proinflamatuvar sitokinleri içeren sitotoksik faktörler, proteazlar, reaktif oksijen ve nitrojen türevleri katkıda bulunurlar. **MS’li hastanın beyin dokusunda en erken görülen serebrovasküler anormallik, KBB’nin disregulasyonu ve aktive olmuş lökositlerin transendotelial**

migrasyonudur(33). MS’de inflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlerin etkileşimleri sonucunda nörolojik kötüleşme ve sonrasında progresif engellilik oranında artma görülmektedir . MS atakları boyunca, inflamasyon beyaz cevherde başlar ve beyin ve spinal kordda myelin yıkımı ile devam eder (33).

MS alt tipleri birbirinden farklı patofizyolojik hastalık mekanizmalarına sahiptir. Bu farklı mekanizmalar henüz moleküler düzeyde gösterilememiştir. Otoreaktif T hücreleri KBB’yi geçer ve sonrasında progresif engelliliğe yol açan demyelinizasyon ve aksonal hasara sebep olur. **Güncel ilaç çalışmaları hastalık patofizyolojisinde lökositleri KBB destrüksiyonunu başlatan önemli bir olay olarak görmektedir** (34) . Poser, 1986 yılında bu hipotezi destekleyen bir teori tanımlamıştır. Bu teoride MS gelişimi için gerekli olan dört parametre şu şekilde sıralanmıştır: Genetik predispozisyon, çevresel ve muhtemel viral immün aracılı olaylar, **KBB fonksiyonlarında ki değişimler**, SSS içerisinde plak oluşturabilme kabiliyeti (35-37).

KBB ksenobiyotiklerin, toksik metabolitlerin ve immün hücrelerin SSS’ye girişini önlemektedir. KBB’nin işlevselliği, KBB endotelial hücreleri, perivasküler astrositler ve perisitlerin etkileşimi ile meydana gelmektedir. Düzenli SSS fonksiyonları için biyokimyasal ve immünolojik mikroçevrenin bir düzen içinde çalışması gereklidir. Bu düzende ki bir bozulma MS gibi SSS patolojileri ile ilişkili olabilecektir (38).



Resim 5: Sağlıklı ve MS beyinde KBB'nin rolü (39)

KBB oldukça spesifik endotel yapısına sahiptir. Bu yapı sayesinde KBB beyini koruyucu fonksiyonlar gösterir. Nöronlardan kan dolaşımını ayırır ve homeostazisi devam ettirir. Patolojik durumlarda, KBB disfonksiyonu immün hücre infiltrasyonuna sebep olur ve beyin parankimi içerisindeki inflamatuvar cevaplar bu durumu izler. MS lezyonlarında beyinde demyelinizasyon, aksonal hasar ve nörodegeneratif süreçler görülmektedir (33).

İmmün hücrelerin SSS parankimine ulaşımı kısıtlıdır. İnflamatuvar cevapta lökosit ekstravazasyonu kritik basamaktır. KBB'ye lenfositlerin transendotelial migrasyon mekanizması belirli bir sırada olmaktadır. Endotel hücreleri ve lökositler üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonu meydana gelir. Kemokinler lökosit infiltrasyonunu kolaylaştırmak için fonksiyon gösterir. Lenfositler endotel hücrelerine yapışır. KBB hem Th17 hücrelerinin infiltrasyonu ile hem de bu hücrelerin sekrete ettikleri İL-17 sebebi ile destrükte olur. Lökositler endotel

hücreleri yüzeyinden endotelial bağlantılar arasından göç eder. Lökositler endotelial bazal membrana penetre olur ve perivasküler alana geçer (33).

İmmün hücreler SSS'ye ulaşınca, tekrar aktive edilir ve lokal olarak inflamatuvar olayları başlatan kaskat tetiklenir. Bu olaylar sonucunda sitokinler, kemokinler, proteazlar ve toksik mediyatörler salınır. MS'deki inflamasyonu başlatan kesin sebep bilinmemektedir fakat genel kabul gören konu, çevresel faktörlerin genetik predizpozisyonu olan kişilerde T hücre aracılı cevabı başlatmada önemli olduğu düşünülmektedir (33).

MS'de KBB yıkımının geçici olduğu düşünülmektedir. Haftalar, aylar hatta yıllar içerisinde, aynı veya farklı lokasyonlarda rekürrens gözlenebilir (33).

SSS'ye lökosit girişi MS'de ve bazı inflamatuvar hastalıklarda hastalık patogeneğinde erken olaylardandır. **KBB disfonksiyonun immün hücre infiltrasyonundan önce mi meydana geldiği, perivasküler lökosit akümülyasyonunun bir sonucu mu olduğu hala belirsizliğini korumaktadır.** Hangi hipotez geçerli olursa olsun, lökosit migrasyonu KBB permeabilitesini modifiye etmektedir (39).

Anti-a4b1 integrin antikoru Natalizumab'ın kullanıma girmesi ile, KBB disfonksiyonun demyelinizasyondan önce gelebileceği hipotezi desteklenmiştir. Natalizumab SSS'ye olan lökosit migrasyonunu kısıtlar ve lezyon oluşumunu, MRG'de kontrast tutan lezyon sayısını düşürür (40). Periferal immün sistemin KBB disfonksiyonuna olan etkisi hipotezi için de rutin kullanıma giren bazı tedavilerle (Mitoksantron, Kladribin, Fingolimod) bu durum desteklenmiştir. Bu tedavilerin

aynı zamanda yeni kontrast tutan lezyonların sayısını azalttığı da gösterilmiştir (40).

Lökositlerin KBB'ye migrasyonu KBB permeabilitesini artırır ve bu durum daha sonra gerçekleşecek olan lökosit infiltrasyonlarını kolaylaştırıcı etki gösterir. Proinflamatuvar lökositlerin SSS'ye girişi, nöroinflamasyon, KBB destrüksiyonu ve MS plak formasyonu oluşumu olaylarını tetikleyici erken olay olarak görülmektedir (41).

MS hastalarında ki aktive lökositler, eksprese ettikleri ve salgıladıkları inflamatuvar sitokinler, çözünebilen faktörler, reaktif oksijen türevleri (ROT) ve matriks metalloproteinaz (MMP)'lar aracılığı ile KBB permeabilitesini artırır . Bu etkiler direkt olarak veya da indirekt nöroglial hücreler aracılığı ile ortaya çıkar (39).

2.2.7 Tanı

MS tanısı konulurken revize McDonald tanı kriterlerinden yararlanılır (42).

Atak	Objektif klinik bulgulu lezyon sayısı	MS tanısı için gerekli ek veri
≥2 atak	≥2	Yok ^a
≥2 atak	1+ öyküde başka bir alanda ki lezyona ait atak ^b	Yok ^a
≥2 atak	1	SSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ^c ile mekanda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥2	Ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB ^e varlığı
1 atak	1 lezyona ait objektif klinik bulgu	SSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG ^c ile mekanda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB ^e varlığı
Sinsi progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2'si • MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥1 lezyon • Spinal kordda ≥2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı

^a: Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

^b: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir. Öyküdeki atağa ait dökümanite edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

^c: MRG'de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥2'sinde ≥1 lezyon olması.

^d: MRG'de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG'sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması.

^e: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

MS: Multipl skleroz, SSS: Santral sinir sistemi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OKB: Oligoklonal band

Resim 6: 2017 Revize McDonald Kriterleri (Thompson ve Arkadaşları) (43)

MS tanısı SSS içindeki lezyonların ve bu lezyonların sebep olduğu klinik tablonun zamanda ve alanda yayılımının gösterilmesi; ayırıcı tanısına giren diğer hastalıkların klinik ve/veya inceleme yöntemleri ile dışlanması ile konulmaktadır. Bazı olgularda tanı klinik ve destekleyici laboratuvar bulguları ile konulabilmektedir. Özellikle KİS döneminde, atipik klinik ve MRG özelliklerine sahip olgularda tanı güçlükleri yaşanmaktadır. Buna benzer olgularda tanı klinik ve

radyolojik takip sonunda kesinleştirilir. Radyolojik izole sendrom(RİS) günümüzde MS olarak kabul edilmemekte, bu hastalara klinik ve radyolojik takip önerilmektedir. İlk defa **1983** yılında geliştirilen Poser tanı kriterlerinde **laboratuvar verileri** de tanı kriterleri içerisine girmiştir. Laboratuvara ait destekleyici bulguların eklenmeye başlaması ile (**oligoklonal bant pozitifliği (OKB)** ve **IgG indeks yüksekliği** gibi) ilk atakta dahi MS tanısı koyma ihtimali artmıştır (42).

BOS’da OKB pozitifliği saptanması ve IgG indeks yükseklikleri MS tanısına gitmede önemli parametrelerdir. OKB pozitifliği ve IgG indeksi intratekal IgG sentezini göstermektedir. **Bu sentez MS için karakteristiktir ama MS’e spesifik değildir.** BOS ve serum IgG düzeylerinin oranının, BOS ve serum albümin düzeyi oranlarına bölünmesi ile IgG indeksi elde edilir. Kabul gören ve önerilen yöntem BOS ve serumda ‘izoelektrik fokuslama’ ile OKB’lerin incelenmesidir. **Patern 2 veya patern 3 SSS’de immünolojik aktivasyonun olduğunu göstermektedir (42).**

Temel testler
Kan tetkikleri
MRG
BOS analizleri
İkincil testler
Uyandırılmış potansiyeller (görsel, somatosensoriyel)
Optik koherens tomografi
Nörokognitif testler
Diğer testler
Ürodinami
Biyopsi (Deri, Lenf nodülü, beyin-leptomening, diğerleri)
Anjiyografi (serebral, fluorescein, MR)
Elektrofizyoloji (Sinir iletimleri, EMG)
Akciğer grafisi (hiler adenopati)
Diğerleri (Schirmer testi, tükürük bezi sintigrafisi, SPECT, Kveim testi, Gallium scan gibi)
MS: Multipl skleroz, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, EMG: Elektromiyografi, SPECT: Tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi

Resim 7: MS tanısı ve ayırıcı tanısında kullanılan tetkikler (43)

2.3 Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları

2.3.1 Tanım

NMO esas olarak spinal kordu ve/veya optik sinirleri, daha nadir vakalarda beyin sapı ve diensefalonu tutan, SSS'nin immun aracılı akut, tekrarlayan inflamatuvar hastalığıdır. Güncel hastalık modellemesine göre, astrositlerin ayaksı çıkıntılarında bulunan aquaporin – 4 (AQP4) isimli su kanallarına özgü NMO-Ig G'nin kompleman kaskadı aktivasyonu ile inflamasyonu başlatıp MSS'de demyelinizasyon ve doku kaybına sebep olduğu gösterilmiştir (43, 44).

2.3.2 Tarihçe

NMO ilk defa Fransız nörolog Eugene Devic tarafından 19.Yüzyıl'da transvers myelit ve ciddi bilateral optik nörit ile karakterize monofazik hastalığı tanımlamak

için kullanılmıştır (45). NMO tanı kriterleri sürekli geliştirilmeye ve yenilenmeye çalışılmaktadır. İlk versiyonu 1999 yılında yayınlanan tanı kriterleri, 2006 yılında revize edilmiş ve son halini 2015 yılında almıştır. Yeni tanı kriterleri ile beraber NMO, NMOSBH olarak genişletilmiştir (46).

2.3.3 Klinik Belirtiler

NMO, ciddi optik nörit ve myelit atakları ile karakterize inflamatuvar demyelinizan bir hastalıktır. MS'in geleneksel formunun aksine, NMO'da lezyonlar serebral beyaz cevheri özellikle de erken evrede daha az tutma eğilimindedir (47). Tek bir atak epizodu bile, total körlük ve parapileji gibi ciddi nörolojik defisitlere yol açabilmektedir (48). NMO'da en fazla etkilenen bölgeler olan optik sinir ve spinal kord biyopsi materyali elde etmek için uygun bölgeler değildir. Bu yüzden hastalığın tanısı da primer olarak klinik bulgulara, görüntülemeye ve serolojiye dayanmaktadır (49).

2.3.4 Etyoloji ve Fizyopatoloji

NMO, spesifik bir dokuda hedef molekül tanımlanan, astrositik su kanalları AQP4, ilk inflamatuvar otoimmün demyelinizan hastalıktır. Klinik olarak valide edilmiş serum biyobelirteci, NMO-IgG relapslarla seyreden SSS inflamatuvar demyelinizan hastalığı olan NMO'yu MS'den ayırır (50). Hedef antijen AQP4 su, potasyum ve glutamat akışı için önemli olan; KBB, ranvier nodları ve transnöronal sinapslarda astrositik ayaksı çıkıntılarda ekprese edilen bir

su kanalıdır (50). SSS AQP4 otoimmunitesi sıklıkla multisistemik otoimmun hastalıklarla beraber görülür (51).

2.3.4.1 Aquaporin 4 keşfi, yapısı ve fonksiyonu

AQP4 memeli hücrelerinde 12'den fazla üyesinin tanımlandığı aquaporin ailesine ait su kanalı proteinidir. İlk defa rat akciğerlerinden 1994 yılında izole edilmiştir. Diğer aquaporin ailesi üyelerine benzer şekilde, AQP4 monomerleri 6 adet helikal, iki tane kısa helikal segment içerirler. AQP4 kan, beyin ve BOS kompartmanları arasında su hareketini sağlar(52). SSS'de ki dokularda AQP4-IgG aracılı hücrel hasardan **M23-AQP4** izoformunun sorumlu olduğu gösterilmiştir (53).

AQP4 SSS'de en çok eksprese edilen su kanalı proteinidir. Kapillerlerin çevresinde, astrositik ayaklı uzantılarda, glia limitansta ve ependimada yüksek oranda eksprese edilmektedir. Ayrıca optik sinirler ve spinal kordda da yüksek oranda bulunmaktadır (54). SSS'nin başka bölgeleri de AQP4'ü eksprese etmektedir. Hipotalamusun supraoptik nükleusu, area postrema ve lamina terminalisin vasküler organı gibi periventrüküler yapılar bu bölgelere örnektir. Bu bölgeler'de KBB yapısı zayıftır ve sıvı homeostazını düzenleyen ve arginin-vazopressin salgılayan osmosensitiv nöronlar içerir. Ayrıca nöronal doku dışında iskelet kas hücresi, akciğer havayolları, gastrik parietal hücreler, renal toplayıcı hücreler, iç kulak, retinal Müller hücreleri, lakrimal gland, tükürük bezi hücreleri ve olfaktör epitel hücrelerinde bulunur (55).

AQP4 ekspresyonu özellikle spinal kord ve optik sinirde belirgindir. Bu iki doku NMOSBH hastalarında majör etkilenen iki dokudur. SSS’de AQP4 esas olarak astrositlerde özellikle de KBB ve KBSB oluşumunda önem arz eden mikropiller endotelyal hücrelerle etkileşimde olan astrositlerin ayaksı uzantılarında eksprese edilmektedir. Astrositlerin ayaksı uzantılarında yüksek oranda eksprese edilen AQP4’ler, su geçirgenliği ve kandan glukoz alımı gibi bazı görevlerde bulunmaktadır (56).

2.3.4.2 Fizyopatoloji

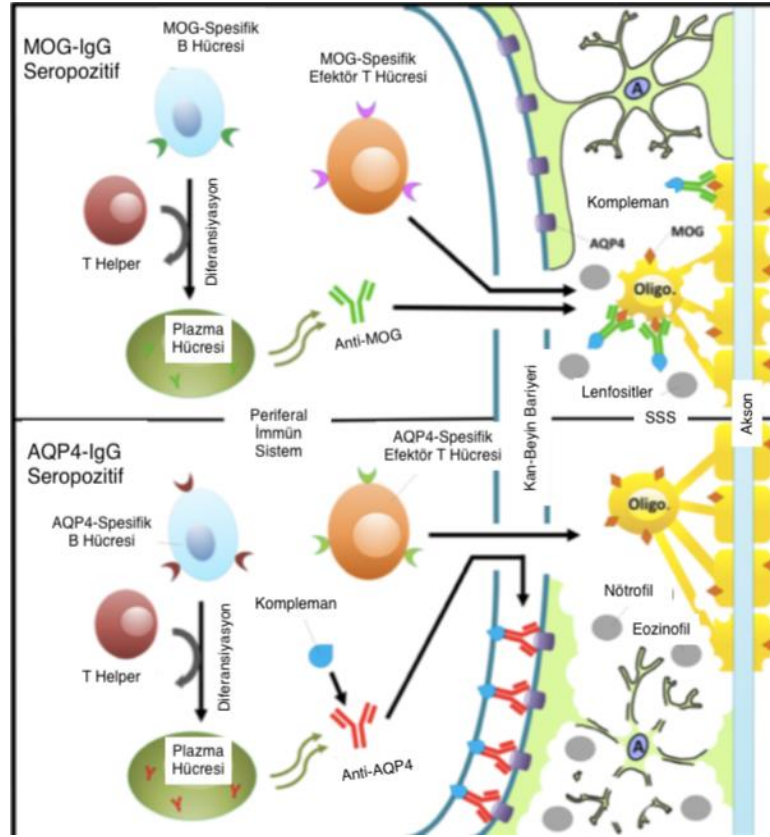
AQP4’e karşı antikor üretmek için özelleşen antikora spesifik plazmablastlar Th hücrelerinin sekrete ettiği İL-6’nın etkisi ile SSS **dışında** plazma hücrelerine dönüşür. Plazma hücrelerinden üretilen AQP4’e spesifik antikorların etki gösterebilmesi için; KBB’nin bütünlüğünün bozulmuş olması gerekmektedir. Tetiklenen inflamasyon ile KBB bütünlüğünün bozulup ve destrükte olduğu varsayılmaktadır. **KBB destrüksiyonu NMO patogenezinde önemlidir ama destrüksiyonun mekanizması hala net değildir.**

AQP4’e özel efektör T hücreleri SSS inflamasyonunu başlatarak SSS’de nötrofillerin ve eozinofillerin birikmesine sebep olur. Komplemanın da aktive edilmesi ile, AQP4-IgG AQP4 su kanallarına bağlanır ve astrosit hasarına sebep olur. Astrositlerin hasarlanması ile beraber ortama GFAP salınır. AQP4 antikorlarının hedef aldığı esas hücre astrositler olduğu için myelin kaybı ve aksonal hasar daha az görülür. Parankimdeki inflamasyon derecesi ile myelin kaybı ve aksonal hasar orantılıdır (43, 46, 57-61).

Astrositlerin AQP4-IgG ile hücresel hasarını takiben, inflamatuvar cevap bir dizi olaydan sonra ortaya çıkar. Astrositlerin yakınındaki oligodentrositlerin hasarı hücreler arası gap junctionlar aracılığı ile indüklenir; sırası ile demyelinizasyon, aksonal hasar ve nöronal ölüm gözlenir (58, 60, 62).

Myelin Oligodentrosit Glikoprotein (MOG) SSS'de myelin kılıfının dış kısmında yerleşimli oligodentrositler tarafından üretilen transmembran proteindir. Ekstrasellüler parçasının hücresel ve humoral immunitiyi tetiklediği düşünülmektedir. MOG'a spesifik efektör T hücreleri lenfositlerin akkümülayasyonu ile SSS'de inflamasyonu başlatır. SSS dışında MOG spesifik B hücreleri Th hücreleri yardımı ile MOG antikorları üreten plazma hücrelerine dönüşür. MOG-IgG'lerin SSS'ye girebilmesi için KBB'nin bütünlüğünün bozulmuş olması gerekmektedir. MOG-IgG'nin SSS'ye girmesi ile antikor myelin ve MOG eksprese eden oligodentrositlere bağlanıp hasara sebep olur. Bu hipotezde MOG-IgG'ler direkt myelin kılıf ve oligodentrositleri hedef aldığı için myelin kaybı ve aksonal hasar daha fazla olur (46).

İnsanda ve deneysel çalışmalarda, AQP4-IgG'nin IgG1 sınıfına ait olduğu ve komplemanın potent aktivatorü olduğu belirtilmiştir. Antikor hedefine bağlandığı zaman kompleman aracılı inflamasyonu indükler, granülosit infiltrasyonu ve astrosit ölümü ile süreç sonuçlanır. NMOSBH patofizyolojisinde kompleman aracılı inflamasyon, sekonder nötrofil ve eozinofil infiltrasyonu anahtar rol oynar (63-66).



Resim 8 : NMOSB’da AQP4 ve MOG IgG antikorları (47)

NMO’daki inflamasyon AQP4 kanallarına karşı oluşan antikorlar ile tetiklenir(60).

AQP4 su kanalı glutamat taşıyıcısı ile birleşmiştir; bu taşıyıcı ‘excitatory amino acid transporter 2’ (EAAT2) ismini alır ve AQP4-IgG kanala ve taşıyıcıya bağlandığı zaman sodyum bağımlı glutamat transportu da etkilenir ve sırası ile ödem, inflamasyon ve IgG, M ve kompleman birikimi gözlenir. **Nöronlar ve oligodentrositler astrosite göre glutamat toksisitesine daha duyarlıdır.** Ekstrasellüler glutamat düzeyleri arttığı zaman kalsiyum geçirgen glutamat reseptörleri aşırı stimüle olur. Glutamatın hücre içine alımının inhibe olması ile

kompleman aracılı SSS yaralanması tetiklenir. NMOSBH'da hasta serumunda bu kanala karşı gelişen antikor hastalığa spesifik iken, MS hastalığa özgü spesifik biyobelirteçlerin azlığı ile karakterizedir (67).

2.3.5 NMOSBH ve anti – MOG

NMOSBH ve anti-MOG sendromları benzer klinik özellikleri ve alışılmış relaps seyirleri sebebi ile MS ile sıklıkla karışırlar. Birbirlerinden farklı bu klinik durumların erken ve doğru tanısı, bu hastalıklara verilecek farklı tedavi rejimlerinin de belirleyicisidir. Aynı hasta serumunda AQP4-IgG ve MOG-IgG'lerin beraber bulunmalarının azlığından dolayı, AQP4-IgG NMOSBH ve anti-MOG sendromlarının farklı hastalıklar olabilecekleri düşünülmüştür. NMOSBH patogenezinde başka otoantikorların da rol alabileceği varsayılmaktadır. Bazı NMOSBH fenotipleri ile N-Metil-D-Aspartat reseptör-IgG ve CV2/CRMP5-IgG'nin ilişkisinin olabileceği tanımlanmıştır (68).

MOG-IgG'nin hedefi myelin olduğundan bu antitede ağır demyelinizasyon görülürken, AQP4-IgG+ NMOSBH hastalarında olduğu gibi astrosit hasarı görülmemektedir. MOG ile ilişkili klinik spektrumlar arasında erişkinlerde AQP4-IgG(-) NMOSB, beyin sapı ensefaliti, idiyopatik monofazik yada rekürren veya bilateral optik nörit, izole myelit veya relapsing myelit gibi hastalıklar vardır (69, 70).

2.3.4 Multiple Skleroz ve Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları

Hastalıklarının bazı klinik ve laboratuvar özellikleri

Klinik, radyolojik ve immünolojik özellikleri anlaşıldıkça NMOSBH, MS spektrumundan ayrılmıştır. Bu hastalık otoimmün astrositopati olarak tanımlanmakta ve klinik, görüntüleme ve antikor varlığına göre NMOSBH tanısı konulmaktadır. NMOSBH'ler AQP4 antikorları pozitifliğine göre iki gruba ayrılmıştır. AQP4 antikoru negatif olan grup içerisinde MOG-IgG+ olan hastalar da bulunmaktadır. NMOSBH kadınlarda dokuz kat sık görülmektedir. Hastalığın ortalama başlangıç yaşı 40'tır. AQP4'ten zengin olan 4.ventrikül çevresi veya periaquaduktal bölgelerde görülen lezyonlar bu hastalık için spesifiktir. **NMOSBH'de BOS OKB pozitifliği %15-30 arasındadır;** bazen belirgin pleositoz ve hafif protein artışı gözlenirken; **MS'de OKB %85 pozitif**tir ve BOS'da hücre genellikle olmaz. MOG-IgG+, AQP4(-) IgG NMOSBH hastaları, pozitif hastalara göre farklı klinik karakteristikler gösterirler. MOG-IgG+ olan grupta kadın baskınlığı yoktur (kadın/erkek oranı:1/1). AQP4-IgG+ gruba göre daha genç yaşta başlar, ataklardan sonra düzelme daha iyidir. MOG-IgG+ hasta grubunda BOS'da OKB genellikle negatiftir.

2.3.4.1 AQP4 ve MOG antikorlarının ölçümü

Nörodejeneratif hastalıklarda araştırılan çoğu biyobelirtecine aksine, AQP4-IgG ve MOG-IgG antikorlarının seviyesi SSS dışında kanda daha fazla artmaktadır. BOS düzeyleri bu antikorların oldukça düşüktür. Her iki antikorun ölçümleri de ‘Cell-Based Assay (CBA)’ metoduna göre yapıp floresan görüntüleme ile görsel değerlendirme yapılmaktadır (71).

2.4 Biyobelirteçler

2.4.1 Tanım

1998 yılında, The National Institutes of Health (NIH) biyobelirteç tanımlamasını yapmıştır. Bu tanımlamada; objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen, normal biyolojik süreçlerin, patolojik süreçlerin veya da tıbbi tedavilere verilen cevapların indikatörü olan karakteristik olarak biyobelirteç tanımı yapılmıştır (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Dünya Sağlık Örgütü biyobelirteci; vücutta kendisinin ve ürünlerinin ölçülebildiği hastalığın gidişatını ve sonuçlarını öngörebilen herhangi bir madde, yapı veya süreç olarak betimlemiştir (72).

2.4.2 Multiple Skleroz’da Biyobelirteçlerin Rolü

MS’de biyobelirteçler; hasta ve hastalık yönetiminin daha iyi yürütülmesine olanak sağlar ve erken tanı imkanı sağlayabilme özelliği ile çok önemlidir. Hastalığın tanısında, hastalığın hangi seviyede olduğuna karar vermede ve hastalık progresyonunu objektif olarak izlemeye ve tedaviye cevapta biyobelirteçlerin önemli rolleri vardır (73).

2.4.3 MS’de Neden Biyobelirteçlere İhtiyaç Vardır ?

Hastalığın etyolojisi hakkında çok fazla tartışma vardır fakat genetik predispozisyon zemininde çevresel tetikleyicilerin hastalık gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. MS tanısı koymak için birçok faktörü göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Ayırıcı tanısına giren enfeksiyöz, neoplastik, konjenital, metabolik ve vasküler hastalıklar, MS dışındaki inflamatuvar hastalıkları da dışlamak gerekmektedir. Tanı sırasında duyulan ihtiyaçtan dolayı, MS’de biyobelirteç araştırmaları oldukça aktif şekilde devam etmektedir. Bunlar arasından sadece birkaç çalışma validasyon aşamasına geçebilmiş ve klinik kullanıma sunulmuştur (74, 75).

2.4.4 MS Biyobelirteçlerinin Validasyonu, Klinik Pratiğe Uygulaması

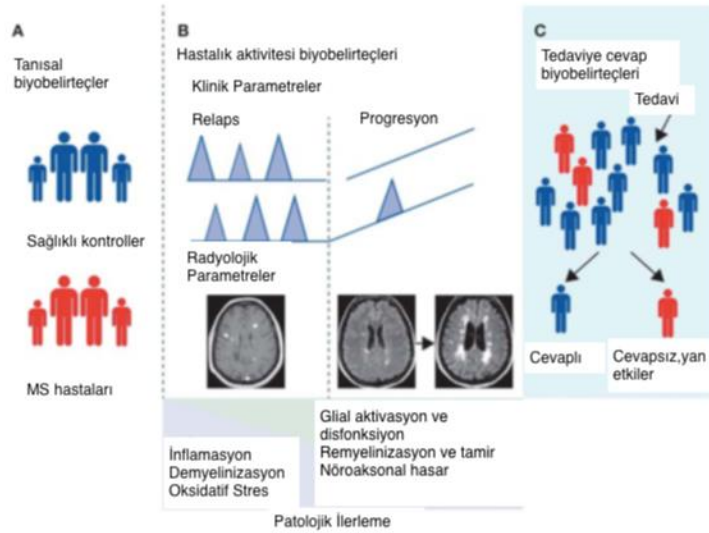
İyi bir hastalık biyobelirteci belli başlı bazı özellikleri içermelidir. Bu özellikler sayesinde efektif olarak kliniğe adapte edilebilme özelliği kazanmaktadır. Bu biyobelirteçler; kolay ve güvenilir olarak ölçülmelidir, birden fazla merkezde doğru ve güvenilir bir şekilde kullanılabilmelidir. Yüksek sensivite ve spesifiteye sahip

olmalıdır. Hastalık biyolojisi ve patogenezi ile uyumlu olmalıdır (örneğin inflamatuvar aktivite, nörodejenerasyonun derecesi, demyelinizasyon veya remyelinizasyonla). Uygun maliyetli olabilmelidir. Biyobelirteçlerin geliştirilmesi çoğunlukla iki majör aşama içerir. Bunlar biyobelirteçlerin keşfi ve validasyonudur. Keşif aşaması genellikle özellikleri iyi tanımlanmış örneklerde, limitli sayıda numune ile omic teknolojisi kullanılarak yapılmaktadır. Bu aşamadan sonra multiple validasyon aşamaları, güçlü istatistiksel metotlar, bağımsız kohort çalışmaları ve tekrar eden çalışmalara ihtiyaç vardır (72).

Biyobelirteçlerin hem teknik hem de klinik validasyonu yapılmalıdır. Klinik validasyon kadar teknik validasyon da önemlidir. Biyobelirteçler klinik pratiğe ve yönergelere eklenmeden önce, büyük kohort çalışmalarında valide edilmelidir. Biyobelirteçlerin tek bir spesifik yolağı göstermesi amaçlı değerlendirilmesi çok kısıtlıdır. Çünkü moleküller birçok farklı yolakta görev alabilirler. Örneğin; NFL aksonal proteindir fakat aksonal hasar da inflamasyonun direkt bir sonucudur. Bu yüzden NFL dolaylı olarak inflamatuvar yolaklarda da görev almaktadır. MS hastalığının patofizyolojisini anladıkça önemli biyobelirteçleri tanıma imkanımız da artmaktadır. Örneğin aksonal hasarı gösteren bir biyobelirteç olan nörofilamanlar hastalığı gösteren prognostik bir belirteç olarak yerini gelecekte alabilecektir (76).

2.4.5 Biyolojik Banka

Biyolojik banka, biyolojik materyallerin toplama, işleme, depolama ve dağıtım aşamalarını içeren aşamaların tümüne verilen isimdir. Örneklerin toplanması, işlenmesi ve depolanması aday biyobelirteçleri tanımlarken önemli rol oynamaktadır. Bu preanalitik faktörler total laboratuvar hatalarının %70'ini oluşturmaktadır (77). Bu yüzden biyolojik materyal toplama, işleme ve depolama ile ilgili standart prosedürlerin ve yönergelerin hazırlanması gerekmektedir.



Resim 9: Multiple skleroz, tanısal, aktivite, tedaviye cevap biyobelirteçleri (78).

2.4.6 Biyobelirteç olarak BOS

2.4.6.1 BOS'un yapısı ve fizyolojik özellikleri

BOS'un büyük kısmı koroid pleksuslarda sentezlenir. Beyin interstisyel sıvısı, ependima ve kapillerler de BOS sekresyonunda görev alabilir. Ortalama BOS hacmi 150 ml'dir. Bunun 25 ml'si ventriküllerde, 125 ml'si subaraknoid boşluklarda yer almaktadır. BOS 24 saatte yaklaşık 4 kere yenilenmektedir. BOS

döngüsü yaşla ve nörodejeneratif hastalıklarda azalır. Bu sirkülasyon azaldıkça beyinde katabolitler birikmeye başlar. BOS bir kılıf gibi SSS'yi sararak onu korur. BOS beyin parankiminin interstisyel sıvısının homeoastazında ve nöronal fonksiyon regülasyonunda önemli rol oynar (79).

Erişkinlerde BOS sekresyonu günde 400-600 ml arasındadır. BOS'un %75'i lateral ventriküllerin koroid pleksusunda ve 3, 4. ventriküllerin tela koroideasında üretilir (79).

BOS'da plazmaya göre; sodyum, klor, magnezyum konsantrasyonları yüksek iken potasyum ve kalsiyum konsantrasyonları düşüktür. BOS'da hücre sayımı genellikle mililitrede 5 hücreyi aşmaz. Sodyum seviyeleri sabah 8'de ve akşam 6'da pik noktalarına ulaşır. Fakat potasyum ve ozmolaritede böyle bir düzenleme yoktur (79).

BOS nörolojik hastalıklarda ve biyobelirteç keşfinde çok değerli bir vücut sıvısıdır. Spesifik lokasyonu ve beyin parankimine olan yakınlığı sebebi ile; içerdiği beyine spesifik proteinler ve metabolitler BOS'un beyine özel spesifik ve patofizyolojik süreçleri yansıttığını düşündürmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar için erken klinik tanıyı desteklemek, prognozu öngörebilmek, hastalık progresyonunu takip edip, nöroprotektif tedavilere olanak verip desteklemek için objektif ve fiyat-etkin önemli biyobelirteçlere ciddi ihtiyaç vardır. Beyin biyopsisi, ventriküler veya interstisyel BOS alımı invaziv işlemler olduğu için lomber ponksiyonla alınan BOS bunlara alternatiftir. Çünkü BOS ile elde edilen moleküller hastalığa spesifik dinamik değişiklikleri, devam eden patolojik süreçleri ve tedaviye cevabı değerlendirebilmede kullanışlıdır (80).

BOS'un belli başlı bazı fizyolojik fonksiyonları vardır. Beyin parankiminin etrafını çevreleyerek beyine yastıklama özelliği verir ve nöronlar üzerindeki baskıyı azaltır. Hormonlar, besleyici moleküller ve sıvı atıkları taşıyıcı ortam olarak işlev görmektedir. BOS'un büyük bir kısmı araknoid boşluklar tarafından emilir. Küçük bir kısmı kanla elimine edilir. BOS, kana göre çok farklı hücresel ve biyokimyasal bileşimlere sahiptir (örneğin BOS'da protein konsantrasyonu 20 kat azdır ve düşük proteaz aktivitesine sahiptir). Bu da kanla karşılaştırıldığında BOS proteinlerinin farklı stabilite özellikleri kazanmasına yol açar. BOS'daki çoğu protein (ör:immünglobülinler) kandan kaynaklanır ve pasif difüzyonla kan-BOS bariyerini geçer (80).

2.4.6.2 BOS'un biyobelirteç olarak kullanımının avantaj ve dezavantajları

BOS alımı kan ve idrar alımına göre daha invaziv bir süreç olmasına rağmen nörolojik hastalıklar ile ilgili çalışmalarda bazı majör avantajlara sahiptir. Çünkü BOS, SSS parankimi ile oldukça yakın ve sıkı ilişkidir. Bu yüzden BOS beyin, spinal kord, meninkslerdeki devam eden patolojileri daha doğru şekilde gösterebilmektedir, önemli ve değerli bilgiler sağlayabilmektedir (81).

Son zamanlarda MS'de en sık kullanılan BOS biyobelirteçleri oligoklonal IgG bantları ve intratekal IgG sentezidir. Geniş araştırmalar yürütülmesine rağmen MS'de klinik pratiğe adopte edilen başka biyobelirteç bulunmamaktadır. Devam eden biyobelirteç çalışmalarının da yeterli güçte olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmaların tek merkezde yapılması elde edilecek olan BOS örnek sayısını kısıtlı

düzeyde tutmaktadır. Bu yüzden araştırma grupları arasında BOS toplama aşamasında işbirliği gerekmektedir (82).

2.5 Tez çalışmasında araştırılan parametreler

2.5.1 İnterlökinler

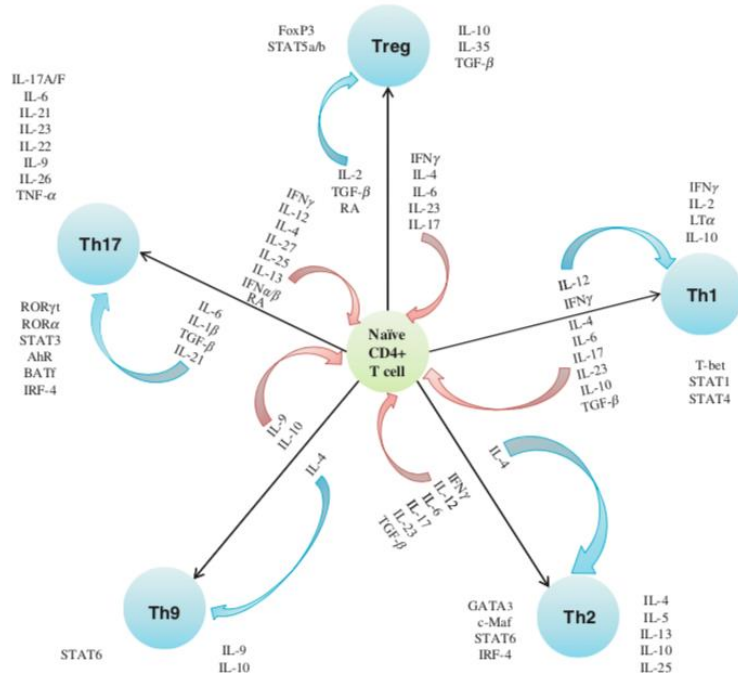
Sitokinler başlangıçta immun sistemde görevli küçük proteinler olarak tanımlansa da insan fizyoloji içerisinde daha geniş rollerinin olduğu görülmüştür (83).

2.5.1.1 Hastalık patofizyolojisinde interlökinlerin yeri

MS’de otoimmün olaylar, CD4⁺ T hücrelerinin proinflamatuvar Th1 ve Th17 fenotipleri aracılığı ile meydana gelmektedir. Th17 hücrelerinin tanımlanması ile beraber MS ve bu hastalığın deneysel modeli otoimmün ensefalomyelit (OEM) modelinde Th1/T helper 2 (Th2) aksı yeniden gözden geçirilmiştir. MS patofizyolojisinde esas patoloji nöroinflamatuvar reaksiyondur. Th17 aracılı üretilen proinflamatuvar sitokinler **IL-6**, **IL-17**, IL-21, IL-22, IL-23 ve tümör nekrozis faktör (TNF)-a’dır. Otoreaktif Th17 hücreleri KBB boyunca dizilip **IL-17** ve IL-22 gibi sitokinleri salgılayarak SSS endotel hücrelerindeki tight junction proteinlerini destrükte ederler. Th17 aracılı inflamasyon SSS’ye nötrofil girişi ve nöron ölümü ile karakterizedir. Bu bilgiler ışığında Th17 hücreleri MS hastalık patogenezinde anahtar rol oynamaktadır (84).

Th17 hücreleri beyin endotel hücrelerine Th1 hücrelerine göre daha iyi penetre olmaktadır. Ayrıca Th17 hücreleri T hücrelerinin SSS girişini pozitif yönde etkileyen CCR6 ve CD6 gibi molekülleri yüksek seviyede eksprese etmektedir (85).

MS plaklarının patolojik özellikleri myelin kılıfı destrüksiyonu, oligodentrosit hasarı ve hücre ölümü, aksonal hasar ve kayıp, glial skar oluşumu, esas olarak lenfosit ve makrofajlardan oluşan inflamatuvar infiltratların varlığıdır (86).



Resim 10: CD4⁺T hücrelerinin farklılaşması ve patogeneizde görevli sitokinler (84).

Th17 diferansiasyonu için en önemli biyobelirteç İL-6'dır. İL-6, Th17 diferansiasyonunun önemli bir stimulatörüdür ve İL-6 eksikliğinde Th17 oluşumu sekteye uğramaktadır. Bu yüzden MS tedavisinde İL-6'nın önemli bir hedef molekül olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, İL-6 varlığı VCAM-1 gibi,

SSS'ye lökosit migrasyonunda önemli rolü olan serebrovasküler adezyon moleküllerini indükler (84).

OEM'de beyindeki inflamatuvar odaklarda, spinal kord ile karşılaştırıldığında Th17, Th1 oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da Th1 hücrelerinin spinal kord immunitesindeki önemli patojenik rolünü gösterir niteliktedir (87) .

2.5.1.2 İnterlökin 6 ve İnterlökin 17

İL-6 ilk defa 1985 yılında B - Hücre Diferansiyasyon Faktörü-2 olarak tanımlanmıştır. Buradaki görevinin B hücrelerinin matürasyonunu indükleyip onları antikor üreten hücreler haline getirmek olduğu saptanmıştır (88).

Diğer bir çok sitokinde farkedildiği gibi İL-6'nın da sadece immün cevapta rol almadığı gösterilmiştir. İL-6'nın ayrıca hepatositler, hematopoetik progenitor hücreler, kardiyovasküler sistem, plasenta sinir ve endokrin sistemin de düzenlenmesinde görev aldığı görülmüştür. İL-6 nöropoietinlerin prototipi 4'lü heliks yapısında bir ailededir. Bu ailenin içerisinde yapısal olarak ilişkili İL-6, 11, 27, 31, lösemi inhibitör faktör, onkostatın M, kardiotropin-1, neuropoietin gibi elemanlar vardır. SSS'de nöronlar, astrositler, mikroglialar ve endotelial hücreler İL-6'nın esas kaynaklarıdır. İn vitro ortamda mikroglia, astrositlerin İL-6R'ü eksprese ettikleri görülmüştür(83).

Th17 hücreleri yüksek miktarlarda IL-8, **IL-17**, IL-21, IL-23, G-CSF üretimi ile karakterize proinflamatuvar efektör T hücreleridir. Th17 hücreleri kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda indüklenir. Th17 kaynaklı sitokinlerden bazıları NMO için aday biyobelirteçlerdendir. Makrofajlardan, dentritik

hücrelerden ve B hücrelerden salınan **İL-6** proinflamatuvar bir sitokindir. Naif T hücrelerini Th17 hücrelerine differansiye eder ve aktive olmuş B hücrelerinden antikor üretimini indükler. IL-6 NMO tanısında önemlidir ve MS'den NMO'yu ayırabilir.

Astrositler NMOSBH gibi sitokinopatilerde İL-6 'nın majör kaynağıdır. Mikroglialar astroglial İL-6'ya cevap verme yeteneğine sahiptir. Bu cevapta iNOS aktivasyonu ile beraber sonrasında NO üretimi ile devam eden, İL-1a, İL-1b ve TNF-a gibi sitokinleri üreten bir süreç başlar. Mikroglialar İL-6'nın inflamatuvar etkilerini potansiyize eder (89).

İL-6 hücrel iletişim potant mediyatördür. Doğal ve kazanılmış inflamatuvar cevapların düzenlenmesinde çok önemli görevleri vardır. İL-6 SSS yerleşimli çoğu hücrede üretilmesine rağmen hücrel cevap için sadece belli başlı hücrelerde olan İL-6 reseptörlerine ihtiyaç vardır. SSS'de mikroglia kendi İL-6 reseptörüne sahipken, astrositler, oligodentrositler, endotelial hücreler ve nöronlar bu reseptörü içermemektedir (89).

NMO patogenizinde AQP4 antikorlarının hedef AQP4 su kanallarına bağlanıp inflamatuvar süreci başlattığı bilinmektedir. Fakat bu süreçte AQP4'lerin KBB'yi geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş için de KBB'nin bütünlüğünün bozulması şarttır. Bu destrüksiyonu inflamatuvar sitokinler ve MMP'ler gerçekleştirmektedir. MMP'lerin aktivasyonu için de TH17 ile ilişkili sitokinler olan Tnf-alfa, İL-1B, **İL-6** ve **İL-17** gibi sitokinlerin de etki etmesi gerekmektedir (60).

İL-6, Th17 diferansiyasyonu için önemli bir stimulatordür. İL-6'nın eksikliği Th17'nin diferansiye olamamasına yol açar. Bu yüzden MS tedavisinde İL-6'nın hedeflenmesi uygun bir yaklaşım olabilmektedir. Ayrıca İL-6'nın varlığı serebrovasküler adezyon moleküllerinin indüksiyonu için çok önemlidir. İL-6 astrogliazis ve mikrogliozis aktivasyonuna da katkıda bulunur (60).

Naif T hücrelerine, antijen sunan hücreler(ASH) tarafından ilgili antijenin sununması ile T hücresi aktiflenir. ASH tarafından salınan İL-23, TGF-B ve İL-6 etkisi ile Th17 hücreleri oluşmaya başlar. İL-23 hem Th17 hücrelerinin oluşumuna pozitif etki sağlar, hem de Th17 hücrelerinin çoğalmasına katkıda bulunur. **Th17 hücrelerinden de MS patogenezinde çok önemli yeri olan İL-17A ve F salınmaya başlar(90).** Sfingozin 1 fosfat reseptör modülatörü Fingolimod Th17 hücrelerinin oluşumunu baskılar ve dolayısı ile İL-17 salınması da azalır (90).

Th17 hücrelerinin demyelinize plakların gelişiminde İL-17 sekrete ederek otoimmün demyelinizasyonu başlatmaları rolü olduğu gösterilmiştir. Th17 hücreleri dışında İL-17 sekrete eden CD8⁺T hücrelerinin de NMOSBH ve MS hastalarında relapsta aktive edildikleri gösterilmiştir. NMOSBH ve MS hastalarında Th17 hücrelerinin aktive olduğu, İL-17 sekrete eden CD8⁺T hücrelerinin arttığı belirtilmiştir (91).

İL-17'nin inflamatuvar hastalıklarda önemi artmaya başlamıştır. Günümüzde İL-17A olarak isimlendirilen İL-17, 6 üyesi olan (İL-17A-F) İL-17 ailesinin bir üyesidir. Bu sitokin CD4⁺T Th17 ve CD8⁺T hücrelerinden sekrete edilmektedir. İL-17/Th17 ve bunların MS ile ilişkisi çok iyi şekilde gösterilmiştir. MS'in deneysel modeli olan OEM'de İL-17'nin önemli rolü gösterilmiştir. MS'li hastalarda

lökositlerde ve BOS’da özellikle de relaps gösteren hastalarda İL-17 yüksek oranda eksprese edilmektedir. Th17 hücreleri SSS’de inflamasyona yol açarak KBB’yi destrükte etmektedir. RRMS’li hastalarda relapslarda BOS ve periferel kanda Th17 hücrelerinin önemli oranda arttığı gösterimiştir (91).

2.5.2 Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)

2.5.2.1 Astrosit ve özellikleri

Astrositler SSS’de en çok bulunan hücrelerdir. SSS hücrelerinin yaklaşık %90’ınını oluşturur. Morfolojik olarak yıldız şekilleri ile karakterize çoklu uzantıları ve dallanmaları olan, beyin hasarı ve dejeneratif hastalıkları takiben aktive olan hücrelerdir. Protoplazmik ve fibröz astrosit olmak üzere iki farklı alt tipi tanımlanmıştır. Protoplazmik astrositler gri cevher içerisinde, bu hücrelerin uzantıları nöronal yüzeye ve serebral damarlara uzanır. Fibröz astrositler beyaz cevherde aksonlara yakın yerleşmiştir (92, 93).

Yıllar boyunca astrositlerin nöronlar için optimal yapısal ve metabolik desteği sağlamada görevli oldukları düşünülmüştür. Şu anda astrositlerin aktif olarak SSS fizyolojisi ve patolojisinde görev aldıkları bilinmektedir. Astrositler GFAP’ın 10 farklı izoformunu ve bunlara ek olarak vimentin, nestin ve synemini eksprese ederler (94).

Astrositler SSS’nin çok yönlü özellikleri olan bekçileridir. Uygun beyin gelişimi için astrositlerin bulunması zorunludur. Astrositler normal fizyolojide ve hastalıkta bir dizi kontrol ve homeostatik fonksiyon özelliklerine sahiptir. Nörovasküler yapının desteklenmesi, kemokin salınımı ile hücrelerin migrasyonu,

potasyum tamponlama, gliotransmitterlerin salınımı, kalsiyum sinyali ile glutamat salınımı, dopamin metabolizasyonu, spesifik transportlarla glutamat ve GABA'nın alımı, glutatyon ve süperoksid dismutaz gibi antioksidanların üretimi gibi birçok fonksiyonu vardır. Ayrıca iyon dengesini sağlama, nörotransmitter, su ve enerji homeostazisi, nöronal sinyali sürdürmek gibi de önemli görevleri de vardır. Tek bir astrosit kendi bölgesinde 2.000.000 sinaps yapabilir. Astrositlerin ayrıca uzun süreli potansiyalizasyonda görev aldıkları gösterilmiştir. Bu sayede sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza gibi olaylarda önem arz etmektedir (94).

2.5.2.2 Reaktif Astrogliazis

Reaktif astrogliazis nörotravma, iskemik stroke ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok nörolojik hastalıkta görülebilen astrositlerin fonksiyonları ve morfolojilerindeki karakteristik değişikliklerdir. Reaktif astrogliazis hastalık progresyonunu ve iyileşme sürecini etkileyebilir. Reaktif astrositozda, astrosit ara filamanlarının esas komponenti olan **GFAP** ekspresyonu artmıştır. TGF-a, CNTF, IL-6, LIF gibi sitokinler astrosit aktivasyonun tetikleyicisidirler (94).

Morfolojik olarak, reaktif astrogliazis hafiften ciddiye kadar değişebilir. Astrogliazis sonrası çoğunlukla bu duruma glial skar oluşumu eşlik eder (95).

2.5.2.3 Glial Fibriler Asidik Protein keşif ve özellikleri

GFAP ilk olarak 1971 yılında Eng. ve arkadaşları tarafından MS hastalarının beyin dokusunda keşfedilmiştir. GFAP ara filamanlar grubu içerisinde bulunur. Ara filamanlar bütün hücrelerde bulunan, hücrede birçok fonksiyonları olan, ana hücre yapısı yapılarından birisini temsil eden gruptur. 6 alt gruba ayrılırlar. Tip 1 ve tip 2 asidik ve nötral keratinler; **tip 3 desmin, GFAP, periferin, vimentin; tip 4 nörofilamanlar**; tip 5 laminler; tip 6 Bfsp1 ve Bfsp2'dir (96).

GFAP gri ve beyaz cevherde olgun astrositlerde, retinada Müller hücresinde, serebellumda Bergmann hücresinde, subventriküler zonda ve subgranüler zonda erişkin nöral kök hücrelerinde, periferel sinir sisteminde Schwann hücrelerinde ekprese edilmektedir (97).

GFAP glial hücrelerin hücre iskeleti yapısını ve onların mekanik dayanıklılığını sürdürmeden sorumlu proteindir. Ayrıca komşu nöronları ve kan beyin bariyerini destekleyici özellikleri vardır. Aktive astrositler kalınlaşmış ve uzamış bir yapı morfolojisine kavuşur ve GFAP bu yapının sürdürülmesinde çok önemlidir (98).

GFAP'ın net fonksiyonu hala net olarak anlaşılabilmiş değildir. GFAP'ın hücre migrasyonunda, motilitede, mitozdaki fonksiyonları; gelişmekte olan SSS'de ve gliomada gösterilmiştir. Aynı zamanda hücrenin mekanik bütünlüğüne katkıda bulunmaktadır (94).

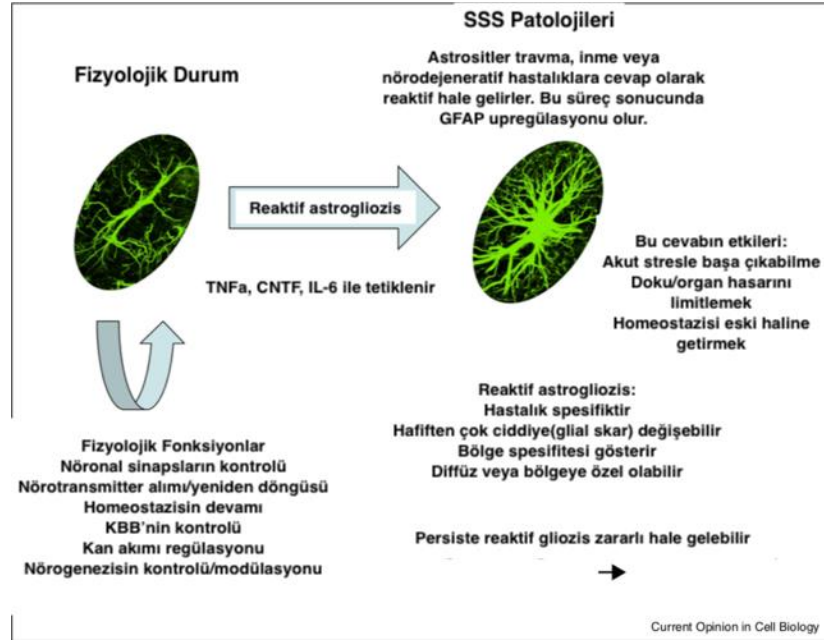
GFAP proteini; hızlı fiber reorganizasyonuna olanak sağlayabilmesi için astrositleri sıvı kristal hidrojel yapısı ile donatan proteindir. Diğer hücresel filamanlar gibi GFAP filamanı da çapına göre yapılan bir sınıflamaya göre ara

filamanlar grubuna katılmıştır. Küçük mikrofilamanlar 7 nm çapında; ara filamanlar 8-12 nm boyutlarında, büyük mikrotübüller yaklaşık 25 nm boyutlarındadır (78).

GFAP, astrositlerin ana ara filaman proteinidir. Fizyolojik ve özellikle de astrositlerin patofizyolojik fonksiyonlarında görev alır. Astrosit aktivasyonun sonucunda ilerleyen süreçte reaktif gliozis meydana gelmektedir. Bu sebeple reaktif gliozisin olduğu tarafta rejenerasyon inhibe olur ve glial skar meydana gelir.

Astrositik arafilaman proteinleri bu cevapta yer alır ve potansiyel farmakolojik hedefler olarak görülmektedir. Reaktif gliozis ile beraber akut hücrel strese cevap artar, nöroprotektif etki artmış olur. Astrositlerin bu akut cevabı nöral doku üzerine daha iyi bir koruma sağlar fakat bunun getirdiği negatif etkiler de bulunmaktadır. Bu negatif etki kısıtlanmış rejenerasyon kapasitesidir (94).

Astrositler MS patogenezinde iki ucu keskin kılıç gibi davranmaktadır. Tedavide bu hücreleri hedeflemek hem pozitif hem negatif etkiler yaratabilecektir. Bu yüzden bu hücrelerin alt tipleri hakkında araştırmalar yapmak, onların moleküler, fonksiyonel ve yapısal özelliklerini tanımlamak bu hücrelerin MS patogenezindeki rollerini iyi anlamamıza yardımcı olabilecektir (99).



Resim 11 : Reaktif astrogliosisin tetiklenmesi ve sonuçları (94)

2.5.3 Nörofilaman Hafif Zincir (NFL)

Aksonal hücre iskeleti, aksonun bütünlüğünü devam ettirebilmesi için oldukça önemlidir ve düzgün şekilde organize edilmiştir. MS lezyonları histopatolojik olarak inflamasyon, demyelinizasyon/remyelinizasyon, aksonal hasar ve gliosis ile karakterizedir. **MS’de uzun dönemde ki nörolojik bozulmanın primer sebebi demyelinizasyon değil aksanol hasardır.** Hasarlanmış aksonlar intersellüler aralığa bazı molekülleri salarlar. Bunlardan en önemlileri nörofilamanlardır. Araştırılan bu moleküller BOS ve kanda ölçülebilmektedir. MS hastalık takibi için valide edilmiş tanısal ve prognostik güvenilirliğe sahip herhangi bir biyolojik belirteç bulunmazken, nörofilamanlar bu konuda umut vaat etmektedir (100).

2.5.3.1 Nörofilamanların yapısal özellikleri ve sınıflandırılmaları

Nörofilamanlar çaplarından dolayı (10 nm) ara filamanlar sınıfı içerisinde gösterilmektedirler. Aktin filamanları 6nm, myozin filamanları 15 nm'dir. Nörofilamanlar aksonal iskeletin majör proteinleridir. Üç farklı moleküler ağırlıkta alt birim içerir. Nörofilaman ağır zincir (NFH)(200-220 kDa), nörofilaman orta zincir (NFM)(145-160kDa), nörofilaman hafif zincir (NFL)(70-86 kDa), a-internexin (58-66 kDa) sınıf 4 ara filamanları iken; periferin (57-59 kDa) sınıf 3 ara filamanlardır. a-internexin SSS'de bulunurken, periferin Periferik Sinir Sistemi (PSS)'de bulunur. Nörofilaman dimerlerinin oluşumu heteropolimer oluşumunda ilk aşamadır. Bu dimerlerin antiparalel agregasyonu ile tetramerler oluşur, 8 tetramer de silindirik 'Unit Length Filament (UFL)' yapısını meydana getirir. UFL'nin sıkışması ile boyuna uzama meydana gelir, bunu da radial sıkışma izler ve sonuç olarak 10 nm çapında nörofilamanlar oluşur (101, 102).

Herbir nörofilaman subuniti çift zincirli ve yüksek oranda korunmuş alfa helikal çekirdek bölgesi içerir. Bu bölge N terminal baş ve C terminal kuyruk kısmı ile sınırlandırılır. Üç subunitin doğru şekilde düzenlenmesi ile tipik 10 nm çapında intermediate filaman oluşur. Nörofilamanlar yüksek oranda fosforile edilmiştir ve fosforilasyon derecesi akson çapını belirler. Aksonal hasar süresince, nörofilamanlar ekstrasellüler sıvıya salınır ve vücut sıvısında nörofilaman seviyelerinin ölçümü SSS'de aksonal hasarın genişliği ile orantılıdır (103).

Bütün subunitler baş kısmından fosforile olur. Sadece NFM ve NFH karboksi terminallerinden yaygın olarak fosforile olur. Bu fosforilasyonla bu subunitlerin

proteazlara karşı rezistansı artar. Normal fizyolojide nörofilamanlar aksonlarda stabildir ve yıkılma hızları düşüktür (104).

Nörofilamanların kesin fonksiyonları halen bilinmemektedir. Aksonların radial büyümesi ve stabilitesi için kritik olduğu düşünülmektedir. Böylece efektif, yüksek hızlı sinir iletimi sağlanmış olur. Nörofilamanlar diğer proteinlerle ve organellerle mitokondri ve mikrotübül de dahil olmak üzere iletişim halindedir. Aksonal stabiliteyi sağlamanın dışında önemli fonksiyonlarının da olduğu belirtilmektedir (105, 106).

2.5.3.2 Nörofilaman hafif zincirin yaş ile değişimi

Normal fizyolojik koşullarda, düşük seviyede NFL aksonlardan sürekli olarak salınmaktadır. Yaş ilerledikçe NFL yaşla orantılı olarak artarak salınmaya devam etmektedir. SSS'de inflamatuvar, nörodejeneratif, travmatik, vasküler yaralanmaya cevap olarak meydana gelen aksonal hasarda NFL'nin salınımı ciddi bir şekilde artmaktadır (107).

Normal yaşlanma süreci ile nörodejeneratif süreçler ilişkilidir. Bu durum, çeşitli biyobelirteçlerle değerlendirilebilir. Bunlar beyin dokusunun hacim kaybını gösteren görüntüleme yöntemleri ve nörofilamanları da içeren bir dizi vücut sıvısı belirteçleridir. Nörofilamanların kanda ölçümü gibi minimal invaziv yöntemlerle, vücut sıvısı belirteçlerine kolay bir şekilde ulaşım sağlanmış olur. Böylece SSS'deki nöroaksonal hasarla ilgili gerçek zamanlı bilgiler, düşük maliyetle(görüntüleme yöntemi olan MRG'ye kıyasla) edinilmiş olur. Minimal invaziv yaklaşımla, kandan tekrarlayan ölçümler alınabilir (108).

Yaşın ilerlemesi ile beraber, NFL için BOS’da normal üst referans sınırı 20 - 50 yaşları arasında 2.5 kat artar. 70 yaşın üzerinde bu artış katlanarak devam eder. Bu artışın sebebi, ilerleyen yaş ile azalan BOS döngüsü gibi fizyolojik sebepler ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda bu durum yavaş fakat sürekli meydana gelen aksonal yaralanma gibi patolojik süreçleri de gösterebilir(109). 18-70 yaş arası sağlıklı kontrollerde kan NFL’si ile yapılan çalışmada bu yaş aralıklarında NFL’nin yaşlanma ile her yıl %2,2 arttığı görülmüştür (110).

2.5.3.3 Neden nörofilaman hafif zincir ?

NFL nörofilamanların omurgasını oluşturur. Nörofilamanlar içerisinde en fazla bulunan alt tip ve en fazla çözünen NFL’dir. Bu da biyolojik sıvılarda NFL’yi en güvenilir olarak ölçülebilen subünit yapmaktadır (107).

NFL’nin klinik kullanımının potansiyel bir dizi olumlu getirisi olduğu halde, klinik uygulamaya sokulmadan önce bu belirteç hakkında göz önünde bulundurulması gereken birkaç basamak vardır. Bunlardan en önemlileri analitik, klinik validasyon ve biyobelirteç olarak beklenen klinik yararadır. Standart referans materyalin olmaması ve kullanılacak metot hakkındaki karışık düşünceler de klinik kullanıma girmesini zorlaştırmaktadır (107).

2.5.3.4 Neden nörofilaman hafif zinciri biyobelirteç olarak araştırıyoruz?

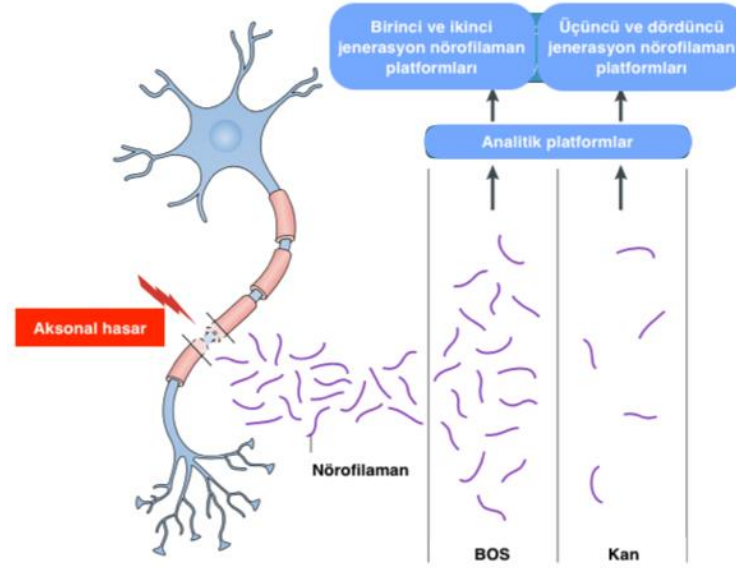
MS’de klinik engelliliğin esas sebebi hastalık progresyonudur. MS’deki hastalık progresyonunu tahmin etmek zordur ve engellenemez. Vücut sıvısı biyobelirteçleri hastalık progresyonunu öngörmede ve tedaviye cevabı monitörize

etmede oldukça değerlidir. MS klinik pratiğinde hastalık progresyonunu öngörmeye veya monitörize etmede az sayıda biyobelirteç vardır. **Hastalık progresyonunun sebebi geri döndürülemez bir süreç olan aksonal kayıptır. Bu yüzden aksonal kaybı gösteren biyobelirteçler hastalık progresyonunu göstermede önemli araçlardır.** Nörodejenerasyon süreci hastalığın erken evrelerinden itibaren başlamaktadır. Nörofilaman proteini alttıpleri özellikle de NFL hastalık progresyonunu göstermede umut vadeden biyobelirteçlerdir (103).

2.5.3.5 Nörofilamanları tespit etme metotları

Nöroaksonal hasar çeşitli nörolojik hastalıklarda kalıcı engelliliğin sebebidir. Bu hasarın güvenilir ölçümü ve uzun süreli takibi hastalık aktivitesini, tedaviye cevabı, tedavi seçeneklerini ve prognozu değerlendirmede önemlidir. NFL seviyeleri nöroaksonal hasar sonrası BOS ve kanda artar. Hassas immunoassay metotlarının gelişimi ile birlikte, nörofilamanların kanda güvenilir şekilde tespit edilebilme ihtimalleri artmıştır. Böylece bu biyobelirteçlerin klinikte kullanılabilme ihtimalleri de artmıştır. Birinci jenerasyon (immünblotlama) ve ikinci jenerasyon (ELIZA) nörofilaman kitleri limitli sensitiviteye sahiptir. Birinci jenerasyon immunoassayler semi kantitatifdir. İkinci jenerasyon yöntemler sandviç ELIZA yöntemleridir. Üçüncü jenerasyon (elektrokemilüminesan) ve özellikle de 4.jenerasyon(single molecule array (SIMOA)) kanda nörofilamanların güvenli ölçümü için geliştirilen metotlardır. Elektrokemiluminesan metodu analitik sensitivitenin geliştirilmesine ışık tutmuştur. Elektrokemiluminesan temelli analizler yüksek derecede sensitiftir, geniş dinamik aralığa sahiptir, küçük örnek volümleri

Çalışma için yeterlidir. SIMOA teknolojisi ELİZA'ya göre 126 kat, elektrokemiluminesan'a göre 25 kat NFL ölçümlerinde daha sensitiftir (100).



Resim 12: NFL'nin aksonal hasar sonrası vücut sıvılarında dağılımı (100)

2.5.3.6 Nörofilaman hafif zincir ve MRG

Yeni oluşan lezyonları MRG ile göstermek, günümüz rutin klinik pratiğinde hastalık aktivitesini gösteren tek biyobelirteçtir. Fakat, MRG primer olarak beyaz cevherdeki lezyonları tespit eder, standart görüntüleme yöntemleri ile gri cevherdeki lezyonlar gözden kaçabilir. MRG ayrıca nöroaksonal dejenerasyonun spesifik olarak seçimine izin vermemektedir. MRG temelli volümetrik ve kortikal kalınlık ölçümleri nöronal dejenerasyonu değerlendirmek için kullanılmaktadır fakat bunların da bireysel anlamda sensivite ve spesifitesi limitlidir (111).

MRG, MS'li hastalarda nöroaksonal hasarın makroskobik göstergesi olan beyin atrofisini miktarlandırmak için kullanılan güncel standart görüntüleme yöntemidir. Fakat MRG ile beyin volümü değerlendirmesi standartizasyonu zor ve doğası gereği retrospektiftir (MRG istedikten sonra raporu ve görüntünün kendisi, uzun süreler sonra çıkabilmektedir). Bu yüzden, kullanılması kolay olan ve nispeten ucuz biyobelirteçler rutin klinik pratikte ve hastalığın uzun süreli takibinde ihtiyaçtır (112).

MS'deki heterojen tedavi yanıtları ve öngörülemeyen hastalık gidişatları sebebi ile; bu hastaların klinik takiplerinde hastalık aktivitesini gösterebilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Hastalık aktivitesini veya engellilik progresyonunu gösteren biyobelirteçler birkaç nörolojik hastalıkta halen karşılanmamış birer ihtiyaçtır. İyi ve güvenilir bir biyobelirteç hastalığın evresi hakkında bilgi verebilmeli, prognoz ve tedaviye cevap hakkında veriler sunabilmelidir. NFL yükselmesi altta yata patolojik duruma bakılmaksızın devam eden nöronal hasarı gösterdiği için bu durum onu potansiyel ilgi çekici biyobelirteç haline getirmiştir (110) .

Nörofilamanların yüksek seviyeleri nedeni ve klinik tanıya bakılmaksızın aksonal hasarın göstergesidir. Şu ana kadar kit sensivitelerinin kan ölçümü için düşüklüğünden ötürü NFL'ler BOS'da bakılmıştır. Nörofilaman proteinlerinin esas olarak BOS'da arttığı gösterilmiştir. Fakat lomber ponksiyon (LP) invaziv bir prosedürdür ve tekrarlayan analizleri yapmak oldukça zordur. Bu yüzden minimal invaziv şekilde NFL'nin kandan ölçülebilmesi için araştırmalar başlamıştır.

SIMOA NFL'nin kan örneklerinde sağlıklı kontrollerde dahil güvenilir bir şekilde ölçülebilmesi yeteneğine sahiptir (100).

2.5.3.7 NFL analizinde neredeyiz? Neler yapılmalı?

Sertifikalı referans materyaller ve metotlar uluslararası ölçüm standartizasyonu ve kitlerin dış kalite kontrolleri için geliştirilmelidir. Bu durum sağlandığı takdirde çalışmalar arasındaki karşılaştırılabilirlik oranı artacaktır. Çok merkezli çalışmalarda (aynı örneği aynı analitik metotla laboratuvarlar arasında test ederek) preanalitik ve analitik prosedürler standartize edilip uygun kitler valide edilebilecektir.

Hem bos hem de kan için sağlıklı kişilerde çok merkezli çalışmalar ile farklı yaş kategorilerinde farklı yaş grupları için normal değer aralıkları tanımlanmalıdır (107).

2.5.3.8 Periferik kan NFL : Nöroloğun C Reaktif Protein'i mi?

Aksonal hasar ile sonuçlanan patolojik süreçler nörofilaman proteinlerinin ekstrasellüler aralığa salınması ile sonuçlanır. Bu belirteçler sonradan BOS'a ve periferik kana geçer. Aksonal hasarı miktarlandırmak için nörofilaman proteinleri iyi birer adaydır. Sadece MS'de değil; aksonal kaybın izlendiği stroke, küçük damar hastalıkları, HIV enfeksiyonu, kafa yaralanması, ALS, Alzheimer, Huntington, akut spinal kord yaralanması gibi durumlarda nörofilaman seviyeleri artar. NFL nonspesifik aksonal hasar belirtecidir santral ve periferik sinir sistemi hasarına bağlı olarak salınır. MS'de serum NFL seviyeleri hastalık aktivitesi ile ilgili olarak

yükselir ve kötü prognozu göstermektedir. İmmunmodölatör tedavilere iyi cevap verenlerde daha iyi uzun dönem sonuçlar beklenmektedir. NFL'nin günlük pratiğe uygulanabilmesi için hassasiyeti yüksek analitik bir teknik olan SIMOA ile çalışılması ve laboratuvarlar arasında da çalışılarak valide edilmesi gerekmektedir (113).

2.5.3.9 NFL referans aralığı belirlenmesi

Standardize ve optimal çalışma koşullarının sağlandığı referans laboratuvarlarda sağlıklı kontroller için evrensel referans aralığı değerleri belirlemek nörofilamanların biyobelirteç olarak günlük pratikte kullanımı için yapılması gereken esas çalışmalardan birisidir. Belirlenecek olan referans değerleri değişik patolojik durumlarda MS tanısı için doğru değerlendirmeyi olanaklı kılacak böylece nöroaksonal hasarın rol aldığı hastalıkların yönetiminde nörofilamanların potansiyelini maksimum düzeye çıkarabilecektir (100).

Ayrıca nörofilaman ölçümlerinin, hastalık takibinde kullanılmasını engelleyen başka bir faktör bütün yaş gruplarına ait referans değerlerinin olmamasıdır. Nörofilamanların farklı merkezlerde güvenli olarak ölçümleri için metot standardizasyonu gereklidir ve bunun için çok merkezin katıldığı analitik validasyon çalışmasının yapılması gerekmektedir (100) .

2.5.4 Osteopontin

Osteopontin, fosforile edilmiş integrine bağlanan protein, atipik immün regülatördür. Osteopontin hakkındaki en erken tanımlama, Cantor ve arkadaşları tarafından, T hücre aktivasyonu sonrasında en fazla upregule olan genlerden birisi olan Eta-1 olarak yapılmıştır. Sonradan, osteopontinin T hücre gelişimini regüle ettiği, Th1 olarak farklılaşmayı indüklediği, Th2 hücrelerinin oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Osteopontinin Th17 farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (114).

Osteopontinin MS'in deneysel şekli olan OEM'da hastalık relapslarına sebep olduğu gösterilmiştir. OEM'li farelerde osteopontin ekspresyonunun periferik ve santral sinir sisteminde artmış olduğu gösterilmiştir (114).

Osteopontin ilk defa MS'li beyin dokusunda tanımlanmıştır. OEM'de osteopontinden fakir olan farelerde hastalık gidişatı daha iyi bulunmuştur. Bu hastalıktaki patojenik rolünün özellikle remisyonu önlemek olduğu belirtilmiştir (115). Aynı zamanda farelere osteopontin uygulanması ile remisyonlularda hastalık rekürrensi geliştiği gösterilmiştir. Bu da osteopontin ile ilgili sinyal yollarının patojenik T hücreleri ile ilişkisini göstermektedir (116). Bu sonuçlar osteopontinin hayvan modellerinde multiple mekanizmalarla T hücre cevabını düzenlediğini ve MS progresyonuna katkıda bulunduğunu belirtmektedir.

Osteopontin makrofajlar, T hücreleri ve epitelyal hücreler tarafından vücut sıvılarına salgılanan fosforile proteindir. Osteopontin fagositozu kemotaktik bir ajan olarak artırır. Monositler ve makrofajlar yüksek seviyede integrin eksprese eder ve bu yolla osteopontine bağlanır. Bu durum makrofaj migrasyonu için

hayatidir. Osteopontin MS’li hastaların SSS’de upregule edilmiştir. Osteopontinin hastalık aktivitesini gösteren bir biyobelirteç olduğu belirtilmektedir .

Osteopontin hem Th1 hem de Th17’den proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır. $\alpha 4\beta 1$ integrin için bağlanma bölgesi içerir ve Th1 hücre cevaplarını artıran inflamatuvar bir sitokin olarak görev alır. Osteopontin OEM’de relapsları indükler ve hastalık progresyonunu kötüleştirir. T hücre aktivasyonunu artırır (117).

Osteopontin immun ve non-immun hücrelerden üretilir. Dentritik hücrelerde, monositlerde, makrofajlarda, aktive T hücrelerinde, kemik hücrelerinde, endotelial hücrelerde, fibroblastlarda, tümör hücrelerinde, astrositlerde ve nöronlarda, metastatik kanserlerde, tüberkülozda, sarkoidoz gibi granulomatoz hastalıklarda eksprese edilir (118).

2.5.5 Growth Associated Protein – 43

Gap-43 ,nöromodülin, ilk olarak 1980 yılında izole edilmiştir. Sinaptik plazma membranlarının majör proteini olarak tanımlanmaktadır. Aksonlarda, sinaptik terminallerde ve büyüme konileri ile ilişkili olarak bulunmaktadır. Bu proteinin kesin fonksiyonu bilinmemesine rağmen, aksonlarda birkaç yolakla ilişkili olarak görev aldığı düşünülmektedir. Büyüyen ve rejenere olan aksonlarda seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (119).

MS’de erken remisyonda gözlenen tam düzelme, esas olarak remyelinizasyona ve inflamasyonun gerilemesine bağlıdır. Aksonal remodeling ve eş zamanlı GAP-43 ekspresyonu MS’in hayvan modelinde gösterilmiştir (120).

GAP-43 büyüme konilerinin, sinaptik plastisitenin, sinaptik ve aksonal rejenerasyonun belirteci olarak bilinmektedir. Sentezi gelişmekte olan nöronlarda artmıştır. Aksonal hasar sonrasında da regülasyonun arttığı gösterilmiştir. Postmortem MS beyin dokusunda, remyelinize beyaz cevherde GAP-43 seviyeleri artmış olarak bulunmuştur. Bu da hasarlı aksonlarda olası rejenerasyon mekanizmalarına işaret etmektedir (120).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Katılacak Bireylerin Seçilmesi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniği ve Polikliniği’ne Ocak 2019 – Ağustos 2019 tarihleri arasında başvuran yaşları 18-65 arasında değişen bireyler arasından hasta ve kontrol grubu için seçimler yapılmıştır. MS tanısı için 2017 revize McDonald (42) kriterlerini karşılayan, NMOSBH tanısı için 2015 uluslararası konsensüs sonucu oluşturulan tanı kriterlerine uyan (121) hastalar, uzman nörolog tarafından değerlendirilip, çalışmaya katılmaya gönüllü olduğunu kabul edip gönüllü olur formunu imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Check Up polikliniğine gelen, çalışmaya dahil edilen hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet eşleştirilmesi

yapılmış, klinik ve laboratuvar bulguları sonucunda sağlıklı olduğuna kanaat getirilmiş bireyler, çalışmaya katılmaya gönüllü olduğunu kabul edilip gönüllü olur formunu imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen kriterleri sağlayan bireylerden MS, NMOSBH, sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. MS grubu da kendi içerisinde KİS, RRMS, PPMS, SPMS, olmak üzere 4 alt gruba ayrılmıştır. NMOSBH grubu kendi içerisinde AQP4, MOG antikorları pozitif olanlar olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır.

Planlanan çalışma 3 ana grup olacak şekilde tasarlanmıştır.

1-)Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları(NMOSBH)

2-)Multiple Skleroz

3-)Sağlıklı kontrol grubu

1. ve 2. Grup çalışmanın ‘hasta’ grubunu; 3.grup çalışmanın ‘sağlıklı kontrol’ gruplarını oluşturacaktır.

1.Grup kendi içerisinde MOG+ , AQP4+ ‘ler olarak iki alt gruba ayrılacaktır.

MOG+ , AQP4+ olanlar da lomber ponksiyon yapılanlar ve yapılmayanlar olarak iki gruba ayrılacaktır.

NMOSB ⇒ MOG+ , AQP4+ ⇒ LP yapılanlar, yapılmayanlar

2. Grup kendi içerisinde KİS, RRMS, PPMS, SPMS olarak dört alt gruba ayrılacaktır.

KİS, RRMS, PPMS, SPMS grupları da lomber ponksiyon yapılanlar ve yapılmayanlar olarak kendi içerisinde iki gruba ayrılacaktır

MS ⇒ KİS ⇒ LP yapılanlar, yapılmayanlar

RRMS ⇒ LP yapılanlar, yapılmayanlar

PPMS ⇒ LP yapılanlar, yapılmayanlar

SPMS ⇒ LP yapılanlar, yapılmayanlar

Yukarıdaki hasta grupları oluşturulurken hastanın o an aldığı immunmodülatör ve/veya steroid tedavisi alıp almaması gözetilmemiştir.

MS grubuna dahil edilmek için dikkate alınan kriterler:

1. 2017 revize Mcdonald (42) tanı kriterlerine göre MS tanısı almış olmak.
2. MS ve NMOSBH dışındaki diğer demyelinizan hastalıklar (ADEM, Balonun Konsantrik Sklerozu vb.), nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Motor nöron hastalığı vb.), serebrovasküler hastalıklar, sistemik otoimmün hastalıklar (SLE, Sjogren vb.), ciddi organik veya mental hastalık gibi hastalıklara sahip olmamak.

NMOSB grubuna dahil edilmek için dikkate alınan kriterler:

1. 2015 NMOSB uluslararası tanı kriterlerine (121) göre NMOSBH tanısı almış olmak.

2. MS ve NMOSB dışındaki diğer demyelinizan hastalıklar (ADEM, Balonun Konsantrik Sklerozu vb.), nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Motor nöron hastalığı vb.), serebrovasküler hastalıklar, sistemik otoimmün hastalıklar (SLE, Sjogren vb.), ciddi organik veya mental hastalık gibi hastalıklara sahip olmamak.

Sağlıklı kontrol grubuna dahil edilmek için dikkate alınan kriterler:

1. Herhangi bir tanı konulmuş nörolojik hastalığı olmamak.
2. Kronik ilaç kullanım öyküsü olmamak.
3. MS ve NMOSBH dışındaki diğer demyelinizan hastalıklar (ADEM, Balonun Konsantrik Sklerozu vb.), nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Motor nöron hastalığı vb.), serebrovasküler hastalıklar, sistemik otoimmün hastalıklar (SLE, Sjogren vb.), ciddi organik veya mental hastalık gibi hastalıklara sahip olmamak.

Çalışmamızda etik prosedürler gereği sağlıklı gönüllülerden BOS alınamamıştır. Sadece ayrı olarak analizi yapılan NFL BOS kiti için; MS öntanısı, MS ve ayırıcı tanı için LP yapılan hastalar olmak üzere 3 ayrı grup oluşturulmuştur. Ayırıcı tanı için LP işlemi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniği'nde uzman nörolog tarafından yapılmıştır. Elde edilen BOS örneklerine ait bilgiler kaydedilmiş, retrospektif olarak bu kişilerin takibi yapıp tanıları kaydedilmiştir.

Araştırma hakkında sözel olarak bilgilendirilen bireylerden çalışmaya katılmaya gönüllü olanlara çalışma hakkında bilgilendirildiklerine dair gönüllü onam formu ile onamları alındı. Araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 14.01.2019 tarihli toplantıda 33 sayılı karar numarası ile onay alınmıştır. Proje bütçesi Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafınan 01/ 2019-38 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.2 Kan ve BOS rneklerinin toplanması

Çalışmaya katılan gönüllü bireylerden 12 saatlik açlık periyodunu takiben sabah alınan venöz kan örnekleri, preanalitik hata ihtimalini en aza indirmek için optimum koşullarda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırılarak 3500 RPM'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Serum eldesi için serum ayırıcı jel ihtiva eden 8.5 ml sarı kapaklı tüpler kullanılmıştır. 5 farklı biyobelirteç için 5 farklı 1.5 ml'lik ependorf tüplere eşit hacimde serum örnekleri alikotlanmıştır. Numune ve ependorf tüplerde aynı kod numarası olacak şekilde gönüllü bilgileri kaydedilmiştir. Ependorf tüpleri analiz zamanına kadar - 80°C derin dondurucuda uygun koşullarda saklanmıştır.

Ayırıcı tanı için LP yapılmaya karar verilen gönüllülerden , rutin prosedürler uygulanarak alanında uzman nörolog tarafından alınan BOS örneklerinden hastanın rutin laboratuvar testleri için gerekli kısım alındıktan sonra arta kalan örnekler preanalitik hata ihtimalini en aza indirmek için optimum koşullarda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırılarak

daha önceden belirlenmiş protokollere (82) uygun şekilde işlemler uygulanmıştır. 5 farklı biyobelirteç için 5 farklı 0,1 ml'lik ependorf tüplere eşit hacimde BOS örnekleri alıktotlanmıştır. Numune ve ependorf tüplerde aynı kod numarası olacak şekilde gönüllü bilgileri kaydedilmiştir. Ependorf tüpleri analiz zamanına kadar - 80°C derin dondurucuda uygun koşullarda saklanmıştır.

3.3 Kan ve BOS Analizleri

Serum ve BOS GFAP, NFL, GAP-43, Osteopontin biyobelirteçleri ELİZA yöntemi ile çalışılıp serum konsantrasyonları standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Analiz sırasında BIO-TEK marka ELIZA plate yıkayıcı (EL x 50 Bioelisa Washer, Bio-Tec. Instruments, Inc.) ve okuyucu (EL x 800 UV Universal Microplate Reader, Bio-Tec. Instruments, Inc.) kullanılmıştır.

Serum ve BOS İL-6 ölçümü Roche Cobas 6000 markalı otoanalizörde yapılmıştır. Hastaların ilk tanı anında ayırıcı tanı için istenen BOS proteini, IgG indeksi, oligoklonal bant, BOS/serum albümin oranı, AQP4 ve MOG testlerinin sonuçları retrospektif olarak hastane bilgi yönetim sisteminden incelenmiştir. Biyobelirteç ve MRG'da görülen kontrast tutan/tutmayan lezyonların korelasyon analizi için görüntüler T1 ve T2 sekansında incelenip retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

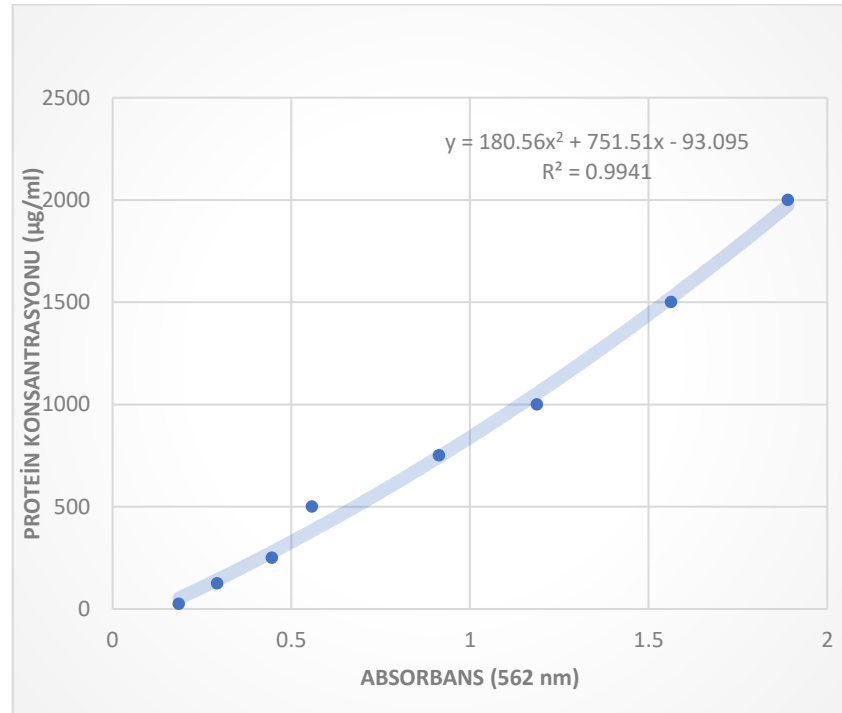
Serum GFAP testi için ayrıca Western Blot analizi yapılmıştır. Analiz için BIO-RAD'a ait jel hazırlama kasetleri, jel yürütme kasetleri, transfer kasetleri ve güç kaynağı kullanılmıştır.

3.3.1 Serum GFAP Western Blot Analizi

Elde edilen serumlardan farklı hastalık alt gruplarına ait numuneler seçildi. Seçilen numuneleri Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektroforezine uygulanmadan önce elektroforez kuyucuklarına yüklenecek numune miktarları için protein analizleri yapıldı.

Total protein tayini analizleri için BOSTER (Boster Biological Technology, CA 94566, Amerika Birleşik Devletleri) bicinchoninic acid (BCA) protein tayin kiti (Katalog numarası: AR0146-500) kullanılmıştır. Bu metot alkali ortamda proteinler tarafından Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+1} iyonlarına dönüşümü esasına dayalı biüre reaksiyonu ile 0,1M NaOH içerisinde BCA, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ içeren Reagent A, 4% CuSO_4 içeren Reagent B'nin Cu^{+1} katyonlarını yüksek sensitive ve spesifitede kalorimetrik tespiti için kombinasyonuna dayalıdır. Bir Cu^{+1} iyonu ile 2 BCA molekülünün şelasyonu sonucu mor-renkli kompleks oluşur. Suda çözünen bu kompleks 562 nanometre (nm)'de kuvvetli absorpsiyon verir. Kit ölçüm aralığı 20 – 2000 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğu için serum numunelerine % 0,9'luk serum fizyolojik (SF) ile 1/10 oranında dilüsyon yapılmıştır. Bütün kit içerikleri analiz öncesinde oda sıcaklığına getirilmiştir. Standart grafiği çizmek için serum bovine albümin (BSA) standartları hazırlanıp kullanılmıştır. Bunun için de 2

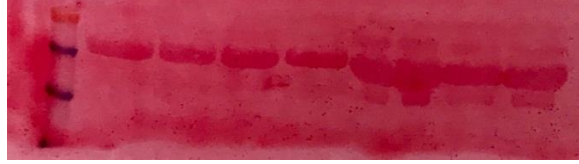
mg/mL’lik stok çözeltisinden sırası ile 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/mL olacak şekilde 8 farklı standart hazırlanmıştır. Sadece SF kullanılan tüp kör olarak (0 µg/mL) kabul edilmiştir. Analiz için 96 kuyucuklu microplate kullanılmıştır. Reagent A ve reagent B 50 : 1 oranında karıştırılıp çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Microplate kuyucuklarına 25 µl standart ve serum örnekleri konulmuştur. 200 µl çalışma solüsyonu bütün kuyucuklara eklenmiştir. Microplate üzeri kapatıldıktan sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Microplate oda sıcaklığına getirildikten sonra 562 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Standartlardan elde edilen absorbans değerleri ile çizilen absorbans konsantrasyon grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak serum numunelerinin total protein konsantrasyonları ‘µg/mL’ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 1: BCA standart absorbans konsantrasyon eğrisi

SDS-PAGE jel hazırlanması için %30'luk Akrilamid/Bisakrilamid, %10'luk Amonyum Persülfat, %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat, ayırıcı jel için 1.5 M Tris-HCL, paketleyici jel için 0.5 M Tris-HCL ve TEMED kullanılmıştır. Aranan protein 48 kDa ağırlığında olduğu için optimum bant ayrılması gözlemek amacı ile %12,5'luk ayırıcı jel, %5'lik paketleyici jel hazırlanmıştır. Kuyucuklara yüklenen bütün numunelerin protein konsantrasyonların eşit olması için daha önceden BCA metodu ile hesaplanan konsantrasyonlar kullanarak volüm hesabı yapılmıştır. Numune ile aynı oranda 2X Laemmli Numune Tamponu eklenip jele yükleme yapmadan önce 95° C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Laemmli numune tamponu hazırlamak için 0.125 M Tris-HCL, ph:6.8, %20'lik Gliserol, %4'lük Sodyum Dodesil Sülfat, %0.1 Bromfenol Mavis ve numunelere eklenmeden hemen önce konulacak şekilde %5'lik β -Merkaptoetanol kullanılmıştır. İlk kuyucuğa Cell Signaling (Beverly, USA) #14208 katolog numaralı marka protein belirteçten 3 μ l diğer kuyucuklara da numuneler hesaplanan oranda pipetlenip, tanka yürütme tamponu ilave edildikten sonra dikey elektroforez işlemi başlatılmıştır. Jel elektroforez yürütme tamponu için 25 mM Trizma bazı, 250 mM Glisin, %0.1'lik SDS olacak şekilde 1000 ml'lik çözelti hazırlanmıştır. Yürütme için başlangıçtan itibaren 120 V kullanılarak 1.5 saat yürütme yapılmıştır. Yürütmeden sonra jelin paketleyici kısmı çıkarılarak ayırıcı kısmını kullanılarak ıslak transfer sistemi ile BIO-RAD marka 0.45 μ m por büyüklüğüne sahip nitrosellüloz membrana transfer işlemi 300 miliamper de 2.5 saat'de gerçekleştirilmiştir. Transfer tamponu için 25 mM Trizma bazı, 192 mM Glisin, %20'lik metil alkol olacak şekilde 1000 ml

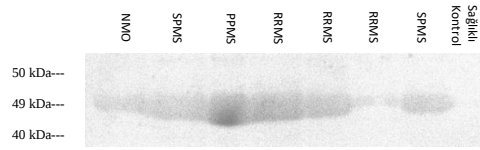
hazırlanmıştır. Transferin gerçekleştiğini göstermek için Ponceau S boyası ile membran boyanmıştır.



Resim 14: Ponceau S boyası ile numunelerimizin membrana transferinin görüntülenmesi

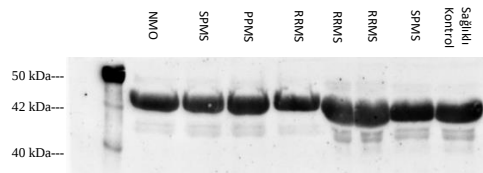
Membrana aktarımdan sonra membran üzerindeki non-spesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi için %5'lik yağsız süt tozu içeren Tris-Tuz-Tween 20 (TBS-T) çözeltisi kullanılmıştır. Oda sıcaklığında bu çözelti ile membran çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra TBS-T çözeltisi ile yıkanan membran primer antikor çözeltisi ile +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Primer antikor olarak Cell-Signalling marka, #12389 katolog numaralı, tavşan antijenlerine karşı geliştirilmiş IgG yapısında GFAP (D1F4Q) kullanılmıştır. 1:500 oranında %5'lik yağsız süt tozu içeren TBS-T çözeltisinde primer antikoru dilüsyonu yapılmıştır. Primer antikor ile inkübasyondan sonra membran 3 kere 15 dakika TBS-T çözeltisi ile yıkanmıştır. Sekonder antikor çözeltisi membran oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak tavşan antijenlerine karşı keçi de oluşturulmuş IgG yapısında Abnova marka PAB9386 katolog numaralı sekonder antikor kullanılmıştır. Sekonder antikor çözeltisi için %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T çözeltisi 1:1000 dilüsyon oranı kullanarak hazırlanmıştır. İnkübasyondan sonra membran TBS-T çözeltisi ile 3 kere 15 dakika yıkanmıştır.

Görüntüleme için Santa Cruz Biotechnology marka sc-2048 katolog numaralı luminol solüsyonları kullanılıp optimum görüntünün elde edilmesi için 3, 5 ve 20 dakikalarda görüntüler alınmıştır. Görüntüleme için G:BOX Chemi XRQ cihazı ve bu cihaza ait yazılım programı kullanılmıştır.



Resim 15: Farklı hastalık altgruplarına ait numunelerin Western Blot görüntüsü

Beta aktin Western Blot analizleri için de yukarıda ki protokollerin aynısı uygulanmıştır. Primer antikor olarak Bioss (Massachusetts, USA) marka BS-0061R katolog numaralı poliklonal fareye karşı geliştirilen antikorlar kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak Bioss (Massachusetts, USA) marka BS-0296G-HRP katolog numaralı poliklonal fareye karşı geliştirilen antikorlar kullanılmıştır.

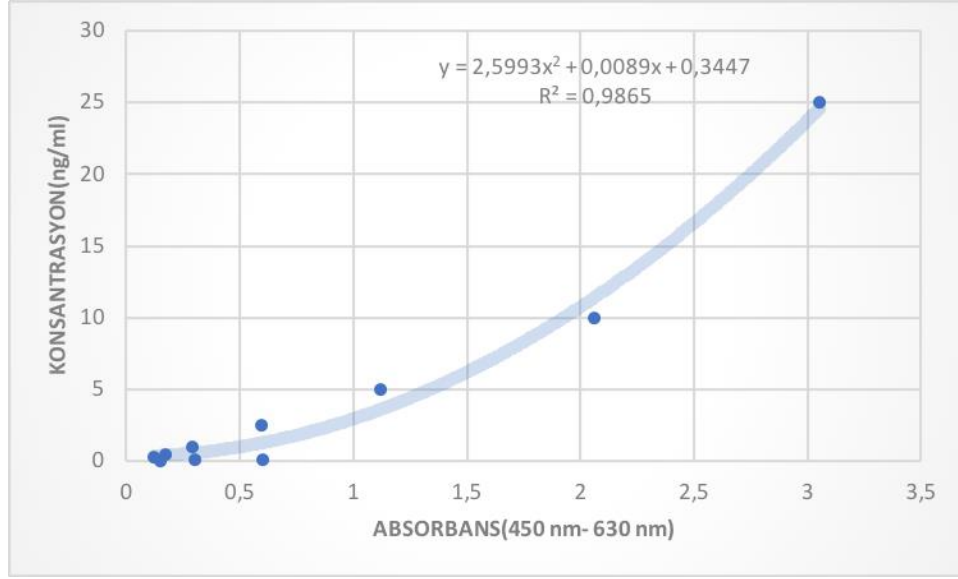


Resim 16 : Beta aktin analizi

3.3.2 Serum ve BOS GFAP Analizi

Serum ve BOS GFAP ölçümü için BioVendor (Brno, Czech Republic) marka RD192072200R katolog numaralı insan GFAP ELİZA kiti kullanılmıştır. İnsan GFAP epitoplarına karşı yüksek özgüllük gösteren poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara standart, kontrol ve serum numuneleri eklendiğinde GFAP'ın antikorları ile bağlanması sonucu antijen-antikor kompleksi oluşur. 120 dakikalık

inkübasyon ve antikora bağılı olmayan kısımların atılması için uygulanan yıkanma sonrasında eklenen biotin işaretli monoklonal GFAP antikorları ile antikor – antijen – antikor kompleksi oluşur. 60 dakikalık inkübasyon ve yıkamadan sonra streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) konjugatı eklenir. 60 dakikalık inkübasyon ve son yıkama işleminin ardından geri kalan konjugat ile substrat solüsyonu (tetrametilbenzidin) reaksiyon vererek mavi renk reaksiyonu oluşturulması sağlanır. Bütün kuyucuklarda renk reaksiyonu için aynı sürenin geçmesi sağlanarak reaksiyon asidik bir reaksiyon durdurma solüsyonu ile sonlandırılır ve sarı renk oluşumu sağlanmış olur. Oluşan sarı rengin absorbansı GFAP konsantrasyonu ile orantılıdır. Microplate okuyucu da referans dalga boyunun 630 nm olması sağlanarak 450 nm’de okuma yapılır. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi elde edilir. GFAP konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiğine göre hesaplanmıştır.

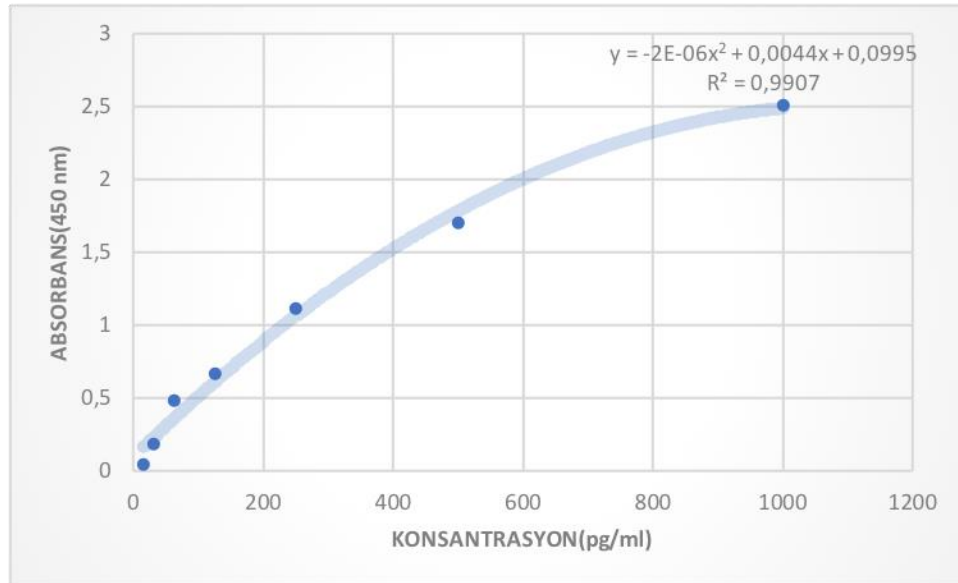


Şekil 2: GFAP standart absorbans konsantrasyon eğrisi

3.3.3 Serum NFL analizi

Serum NFL ölçümü için Abbexa (Cambridge, United Kingdom) marka abx152468 katalog numaralı insan NFL ELİZA kiti kullanılmıştır. Kit sensitivitesi <6.2 pg/mL, ölçüm aralığı 15.6 – 1000 pg/mL olarak belirtilmiştir. Kit sandviç ELİZA metodu ile ölçüm yapmaktadır. İnsan NFL'ye karşı yüksek özgüllük gösteren antikorlarla kaplı kuyucuklara standart, kontrol ve serum numuneleri eklendiğinde NFL'nin antikorları ile bağlanması sonucu antijen-antikor kompleksi oluşur. 1 saatlik inkübasyonun ardından yıkama yapılmadan kuyucuklardaki sıvı boşaltılır. Biotin ile işaretli NFL antikorları deteksiyon antikoru olarak bütün

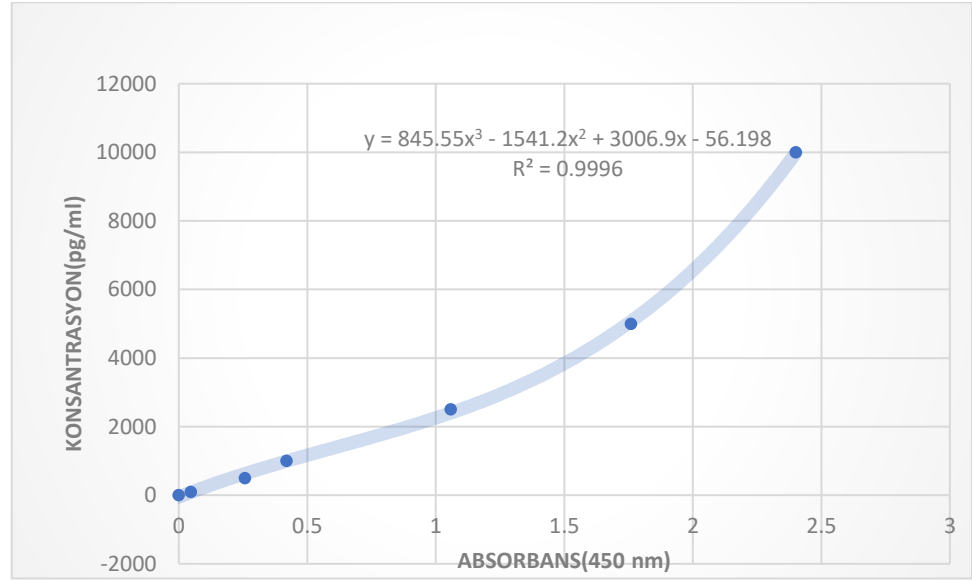
kuyucuklara eklenir. 1 saatlik inkübasyondan sonra yıkama yapılır. Sonrasında bütün kuyucuklara avidin ile konjuge HRP eklenir. Yarım saatlik inkübasyondan sonra yıkama yapılır ve bütün kuyucuklara substrat solüsyonu (tetrametilbenzidin) eklenerek mavi renk reaksiyonu oluşturulması sağlanır. Bütün kuyucuklarda renk reaksiyonu için aynı sürenin geçmesi sağlanarak reaksiyon asidik bir durdurma solüsyonu ile sonlandırılır ve sarı renk oluşumu sağlanmış olur. Oluşan sarı rengin absorbansı NFL konsantrasyonu ile orantılıdır. Microplate okuyucu da 450 nm’de okuma yapılır. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi elde edilir. NFL konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiğine göre hesaplanmıştır.



Şekil 3 : NFL standart absorbans konsantrasyon eğrisi

3.3.4 BOS NFL analizi

BOS NFL ölçümü için Uman Diagnostics (Sweden) marka 10-7002 katalog numaralı sadece insan BOS numuneleri için geliştirilmiş NFL ELİZA kiti kullanılmıştır. Kit sensitivitesi 33 pg/mL, ölçüm aralığı 100 – 10000 pg/mL olarak belirtilmiştir. Analiz öncesinde BOS örneklerine 1/2 oranında kit içerisinde bulunan numune dilüenti ile dilüsyon yapılmıştır. Çalışma prosedürüne göre numune, antikor ve TMB substrat eklenilmesinden sonra inkübasyonlar oda sıcaklığında 800 RPM hızında mikropate orbital karıştırıcı üzerinde yapılmıştır. Bu kit iki adet yüksek spesifikite gösteren monoklonal antikor kullanmaktadır. Kuyucuklardaki solid yüzeyin üzeri spesifik monoklonal antikorlardan birisi ile kaplanmıştır. Bu antikor numunelerdeki NFL ile bağlanmaktadır. Tespit diğer konjuge monoklonal antikor kullanılarak yapılmaktadır. Miktersal tayin renksiz substratın renkli ürüne enzimatik bir reaksiyon sonucunda dönüşmesi ile elde edilmektedir. Oluşan renkli ürün miktarı örnekteki NFL ile orantılıdır. Microplate okuyucu da 450 nm’de okuma yapılır. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi elde edilir. NFL konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiğine göre hesaplanmıştır.

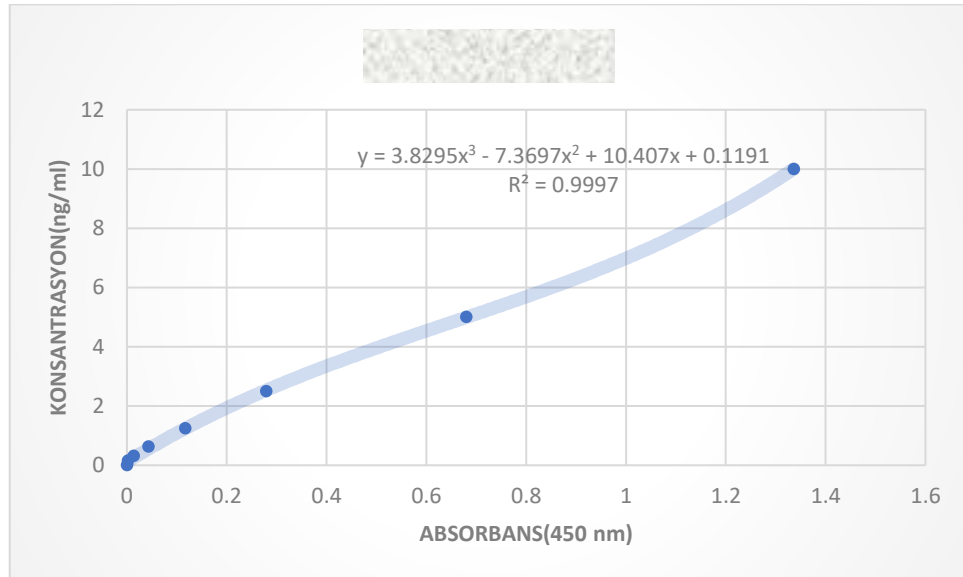


Şekil 4 : NFL standart absorbans konsantrasyon eğrisi

3.3.5 Serum ve BOS Osteopontin Analizi

Serum ve BOS Osteopontin analizi için Fine Test (Wuhan, China) marka EH0248 katalog numaralı insan Osteopontin ELİZA kiti kullanılmıştır. Kit sensitivitesi 0.094 ng/mL, ölçüm aralığı 0.156-10 ng/mL olarak belirtilmiştir. Kit sandviç ELİZA metodu ile ölçüm yapmaktadır. Analiz öncesinde BOS örneklerine 1/20, serum örneklerine 1/2 oranlarında numune dilüsyon solüsyonu ile dilüsyon yapılmıştır. Plate kuyucuklarına numunede aranan antijeni yakalaması için yakalama antikoru emdirilmiştir. Biotin ile konjuge diğer antikor deteksiyon antikoru olarak görev yapmaktadır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara eklendikten sonra 90 dakika 37°C’de inkübe edilmektedir. Yıkama solüsyonu ile iki kere yıkandıktan sonra bütün kuyucuklara biotin ile işaretli antikor

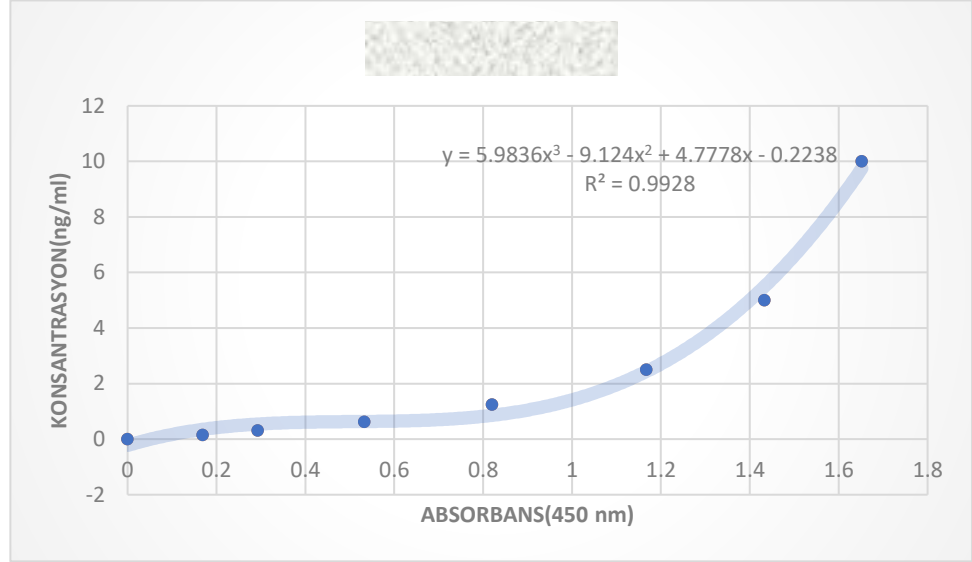
eklenmektedir. 60 dakika 37°C’de inkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile 3 kere plate yıkanmaktadır. HRP-streptavidin bütün kuyucuklara eklendikten sonra 30 dakika 37°C’de inkübe edilmektedir. Yarım saatlik inkübasyondan sonra yıkama yapılır ve bütün kuyucuklara substrat solüsyonu (tetrametilbenzidin) eklenerek mavi renk reaksiyonu oluşturulması sağlanır. Bütün kuyucuklarda renk reaksiyonu için aynı sürenin geçmesi sağlanarak reaksiyon asidik bir reaksiyon durdurma solüsyonu ile sonlandırılır ve sarı renk oluşumu sağlanmış olur. Oluşan sarı rengin absorbansı Osteopontin konsantrasyonu ile orantılıdır. Microplate okuyucu da 450 nm’de okuma yapılır. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi elde edilir. Osteopontin konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiğine göre hesaplanmıştır.



Şekil 5 : Osteopontin standart absorbans konsantrasyon eğrisi

3.3.5 Serum ve BOS GAP-43 Analizi

Serum ve BOS GAP-43 analizi için Fine Test (Wuhan, China) marka EH1497 katalog numaralı insan GAP-43 ELİZA kiti kullanılmıştır. Kit sensitivitesi 0.094 ng/mL, ölçüm aralığı 0.156-10 ng/mL olarak belirtilmiştir. Kit sandviç ELİZA metodu ile ölçüm yapmaktadır. Analiz öncesinde BOS örneklerine 1/2, serum örneklerine 1/2 oranlarında numune dilüsyon solüsyonu ile dilüsyon yapılmıştır. Plate kuyucuklarına numunede aranan antijeni yakalaması için yakalama antikoru emdirilmiştir. Biotin ile konjuge diğer antikor deteksiyon antikoru olarak görev yapmaktadır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara eklendikten sonra 90 dakika 37°C'de inkübe edilir. Yıkama solüsyonu ile iki kere yıkandıktan sonra bütün kuyucuklara biotin ile işaretli antikor eklenir. 60 dakika 37°C'de inkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile 3 kere plate yıkanır. HRP-streptavidin bütün kuyucuklara eklendikten sonra 30 dakika 37°C'de inkübe edilir. Yarım saatlik inkübasyondan sonra yıkama yapılır ve bütün kuyucuklara substrat solüsyonu (tetrametilbenzidin) eklenerek mavi renk reaksiyonu oluşturulması sağlanır. Bütün kuyucuklarda renk reaksiyonu için aynı sürenin geçmesi sağlanarak reaksiyon asidik bir reaksiyon durdurma solüsyonu ile sonlandırılır ve sarı renk oluşumu sağlanmış olur. Oluşan sarı rengin absorbansı Osteopontin konsantrasyonu ile orantılıdır. Microplate okuyucu da 450 nm'de okuma yapılır. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi elde edilir. GAP-43 konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiğine göre hesaplanmıştır.



Şekil 6 : GAP-43 standart absorbans konsantrasyon eğrisi

3.3.5 Serum ve BOS İL-6 Analizi

Serum ve BOS İL-6 analizi için 05109442 Lot numaralı Roche cobas Elecsys İL-6 kiti kullanılmıştır. Kit sensitivitesi 1.5 pg/mL, ölçüm aralığı 1.5 – 5000 pg/mL olarak belirtilmiştir. Kit sandviç elektrokemiluminesan metodu ile ölçüm yapmaktadır. Herbir numuneden alınan 30 mikrolitrelik örnekler biyotinle işaretlenmiş İL-6'ya spesifik monoklonal antikorlar ile inkübe edilir. Rutenyum kompleksi ve streptavidin ile kaplanmış mikropartiküller ile işaretlenmiş İL-6'ya spesifik monoklonal antikorların eklenmesi ile numunedeki İL-6 ile antikorlar sandviç kompleks oluşturur. ProCell isimli yıkama solüsyonu ile elektrotlara

manyetik olarak mikropartiküller aracılığı ile bağlanmamış olan maddeler yıkanır. Elektrota voltaj uygulanması ile kemilüminesan yayılımı indüklenip ölçüm alınır. Sonuçlar iki noktalı kalibratör standart eğrisine göre belirlenir.

Serum İL-6 çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için üç farklı seviye serum havuzu oluşturulmuştur. Çalışma içi %Coefficient of variation (%CV) düzey 1, düzey 2 ve düzey 3 için sırası ile %1.11, %3.23 ve %0,23 bulunmuştur. Gün içi %CV düzey 1, düzey 2 ve düzey 3 için sırası ile %0,96, %2,04 ve %0,22 bulunmuştur.

3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin analizi SPSS 25 programı ile yapılmış ve %95 güven düzeyi ile çalışılmıştır.

Kategorik (nitel) değişkenler için frekans (n) ve yüzde (%), sayısal (nicel) değişkenler için ortalama (X), standart sapma (ss), medyan (M) istatistikleri verilmiştir.

Çalışmada 30'dan az örneklem bulunan değişkenler için parametrik olmayan yöntemler, 30'dan fazla örneklem bulunan değişkenler için parametrik yöntemler kullanılmıştır.

Çalışmada test tekniklerinden Pearson/Spearman korelasyon testi, bağımsız gruplar t/Mann Whitney, Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Ayrıca ROC analizi ile ölçümlerin duyarlılık, özgüllükleri incelenmiştir. Pearson/Spearman korelasyon testi bağımsız iki nicel değişken arasındaki doğrusal ilişkinin yönü ve kuvvetinin

belirlenmesi kullanılan test tekniğidir. bağımsız gruplar t/Mann Whitney testi bağımsız iki grubun nicel bir değişken açısından karşılaştırılmasında kullanılan test tekniğidir. Kruskal Wallis; bağımsız k grubun ($k > 2$) nicel bir değişken açısından karşılaştırılmasında kullanılan test tekniğidir.

4.BULGULAR

4.1 MS, NMOSBH, MS Öntanısı ve Sağlıklı Kontrol gruplarına ait tanımlayıcı istatistikler

Tablo 3: Nicel değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler

	Multiple Skleroz (n=127)	NMOSBH (n=20)	MS Öntanısı (n=30)	Sağlıklı Kontrol (n=20)
Cinsiyet (n)	95 K 32 E	13 K 7 E	18 K 12 E	13 K 7 E
Yaş (ort ± SS)	38,0 ± 11,0	41,8 ± 11,5	42,0 ± 10,6	35,6 ± 7,7
Kadın	37,4 ± 10,8	44,2 ± 12,7	44,0 ± 10,6	32,0 ± 4,4
Erkek	41,8 ± 10,7	37,4 ± 7,1	39,5 ± 9,3	37,5 ± 8,5
Tanı Yaşı (ort ± SS)	32,0 ± 11,0	36,6 ± 12,2		
Kadın	31,2 ± 11,4	37,8 ± 14,3	-	-
Erkek	34,7 ± 9,7	34,7 ± 7,9		
Hast Süre(ort ± SS)	7,5 ± 6,2	9,2 ± 6,8		
Kadın	5,9 ± 5,1	11,4 ± 10,2	-	-
Erkek	7,6 ± 6,3	5,5 ± 4,3		
EDSS (ort ± SS)	2,7 ± 2,0	2,6 ± 2,1		
Kadın	2,5 ± 1,9	2,7 ± 1,8	-	-
Erkek	3,5 ± 2,0	2,6 ± 1,3		

ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, E: Erkek, K: Kadın, MS: Multiple Skleroz, NMOSBH: Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları, Hast. Süre: Hastalık Süresi, EDSS: Expanded Disability Status Scale

Tablo 3’de 2 hastalık grubu (MS, NMOSBH), bir sağlıklı kontrol grubu ve MS öntanısı gruplarına ait bazı nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistiki bilgiler

verilmiştir. MS hasta grubunu 4 adet alt grup hastalık oluşturmaktadır. Bu grupta RRMS (n=90), SPMS (n=19), PPMS (n=13), KİS (n=5) alt grupları bulunmaktadır. NMOSBH hasta grubunu 2 adet alt grup oluşturmaktadır. Bu grupta AQP4+ (n=8), MOG+ (n=11) alt grupları bulunmaktadır. Ayrıca çifte seronegatif olan bir hastanın takibi yapıp antikorlarından birisi pozitifleştiği takdirde altgruplardan birisine dahil edilecektir. MS öntanısı grubunu MS ayırıcı tanısı ile kliniğe başvuran bireyler oluşturmaktadır. Bu bireyler takip edilecek, MS tanısı kesinleşince çalışmaya dahil edilecek, MS tanısı konulmadığı takdirde çalışmadan çıkarılacaktır.

MS grubundaki erkeklerin yaş ortalaması ($41,8 \pm 10,7$), kadınların yaş ortalaması ($37,4 \pm 0,8$); erkeklerin ortalama tanı yaşı ($37,4 \pm 10,8$), kadınların ortalama tanı yaşı ($31,2 \pm 11,4$); erkeklerin ortalama hastalık süresi ($7,6 \pm 6,3$), kadınların ortalama hastalık süresi ($5,9 \pm 5,1$); erkeklerin ortalama EDSS skoru ($3,5 \pm 2,0$), kadınların ortalama EDSS skoru ($2,5 \pm 1,9$) olarak hesaplanmıştır.

NMOSBH grubundaki erkeklerin yaş ortalaması ($37,4 \pm 7,1$), kadınların yaş ortalaması ($44,2 \pm 12,7$); erkeklerin ortalama tanı yaşı ($34,7 \pm 7,9$), kadınların ortalama tanı yaşı ($37,8 \pm 14,3$); erkeklerin ortalama hastalık süresi ($5,5 \pm 4,3$), kadınların ortalama hastalık süresi ($11,4 \pm 10,2$); erkeklerin ortalama EDSS skoru ($2,6 \pm 1,3$), kadınların ortalama EDSS skoru ($2,7 \pm 1,8$) olarak hesaplanmıştır.

MS öntanısı grubundaki erkeklerin yaş ortalaması ($39,5 \pm 9,3$), kadınların yaş ortalaması ($44,0 \pm 10,6$); sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin yaş ortalaması ($37,5 \pm 8,5$), kadınların yaş ortalaması ($32,0 \pm 4,4$) olarak hesaplanmıştır. Bu bireylere ait ortalama tanı yaşı, hastalık süresi ve EDSS skoru hesaplanmamıştır.

4.2 Grup Karşılaştırma Analizleri

Tablo 4'deki analizler yapılırken hastalık alttipleri gruplandırılmış ve istatistiksel analizler 3 farklı grup için yapılmıştır. MS grubunda PPMS, SPMS, RRMS, KİS alttipleri bulunurken; NMOSBH grubunda AQP4+ ve MOG+ alttipleri bulunmaktadır.

Tablo 4: Serum biyobelirteç düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

Değişken	Grup	n	Ort.±SS	Medyan(IQR) ^a	p	Grup fark
İnterlökin-6 (pg/mL)	MS (1)	127	252,87±2623,83	4,38(1,95-10,02)	0,000*	1-2,3
	NMOSBH (2)	20	13,72±35,90	3,15(1,14-8,71)		
	Sağlıklı (3)	20	1,23±1,03	0,75(0,75-1,35)		
GFAP (ng/mL)	MS (1)	127	0,12±0,16	0,08(0,04-0,12)	0,002*	1-2,3
	NMOSBH (2)	20	0,05±0,03	0,04(0,04-0,06)		
	Sağlıklı (3)	20	0,04±0,03	0,04(0,04-0,05)		
NFL (pg/mL)	MS (1)	127	105,08±108,41	87,09(52,72-117,02)	0,634	
	NMOSBH (2)	20	88,84±61,02	63,20(50,78-106,72)		
	Sağlıklı (3)	20	74,20±24,29	74,98(49,59-91,04)		
Osteopontin (ng/mL)	MS (1)	127	5,63±4,81	5,01(2,37-5,98)	0,000*	1-2,3
	NMOSBH (2)	20	2,19±0,60	2,02(1,93-2,18)		
	Sağlıklı (3)	20	2,53±0,94	2,00(1,84-3,01)		
GAP-43 (ng/mL)	MS (1)	127	3,97±3,70	3,78(3,24-4,87)	0,000*	1-2,3
	NMOSBH (2)	2	2,65±0,73	2,41(2,09-3,3)		
	Sağlıklı (3)	20	2,58±0,81	2,27(2,05-3,1)		

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; Mann Whitney

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, IQR: Interquartile Range (%25-75), MS: Multiple Skleroz, NMOSBH: Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları, Sağlıklı: Sağlıklı Kontrol, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında İnterlökin-6 değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Ortalama İnterlökin-6 değerleri MS hastalarında en yüksek iken (252,87 pg/mL) sağlıklı kontrol grubunda en düşüktür (1,23 pg/mL). İstatistiksel olarak anlamlı fark MS hastaları ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında GFAP değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Ortalama GFAP değerleri MS hastalarında en yüksek iken (0,12 ng/mL) sağlıklı kontrol grubunda en düşüktür (0,04 ng/mL). İstatistiksel anlamlı fark MS hastaları ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında Osteopontin değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Ortalama Osteopontin değerleri MS hastalarında en yüksek iken (5,63 ng/mL) NMOSBH grubunda en düşüktür (2,19 ng/mL). İstatistiksel anlamlı fark MS hastaları ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında GAP-43 ölçümü bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Ortalama GAP-43 değerleri MS hastalarında en yüksek iken (3,97 ng/mL) sağlıklı kontrol grubunda en düşüktür (2,58 ng/mL). İstatistiksel anlamlı fark MS hastaları ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında NFL ölçümü bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). İstatistiksel

olarak bir fark bulunmamasına karşın ortalama NFL değerleri en yüksek MS grubunda iken, en düşük sağlıklı kontrol grubunda olanlardadır.

Tablo 5'deki analizler yapılırken hastalık alttipleri gruplandırılmış ve istatistiksel analizler 3 farklı grup için yapılmıştır. MS grubunda PPMS, SPMS, RRMS alttipleri bulunurken; NMOSBH grubunda AQP4+ ve MOG+ alttipleri bulunmaktadır. MS grubundan diğer alt gruplar ile benzer sayıya ulaşmadığı için KİS grubu çıkarılmıştır.

Tablo 5: Serum biyobelirteç düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

Değişken	Tanı	n	Ort.±SS	Medyan(IQR) ^a	p	Grup fark
İnterlökin-6 (pg/mL)	NMOSBH (1)	20	14,53±35,75	3,15(1,14-8,71)	0,000*	2-1,3
	RRMS/PPMS/SPMS (2)	122	43,78±197,82	4,43(1.98-11.34)		
	Sağlıklı (3)	20	1,23±1,03	0,75 (0.75-1.35)		
GFAP (ng/mL)	NMOSBH (1)	20	0,05±0,03	0,04(0,04-0,06)	0,001*	2-1,3
	RRMS/PPMS/SPMS (2)	122	0,13±0,17	0,07(0.04-0.12)		
	Sağlıklı (3)	20	0,05±0,03	0,04 (0,04-0,05)		
NFL (pg/mL)	NMOSBH (1)	20	90,48±60,25	63,20(50,78-106,72)	0,702	
	RRMS/PPMS/SPMS (2)	122	106,34±114,1	82,12(52.85-118.47)		
	Sağlıklı (3)	20	74,2±24,29	74,98(49,59-91,04)		
Osteopontin (ng/mL)	NMOSBH (1)	20	2,17±0,61	2,02(1,93-2,18)	0,000*	2-1,3
	RRMS/PPMS/SPMS (2)	122	5,94±5,01	4,85(2.44-6.16)		
	Sağlıklı (3)	20	2,53±0,94	2,00(1,84-3,01)		
GAP-43 (ng/mL)	NMOSBH (1)	20	2,89±0,99	2,51(2,09-3,3)	0,000*	2-1,3
	RRMS/PPMS/SPMS (2)	122	4,50±3,95	3,96(3.22-4.93)		
	Sağlıklı (3)	20	2,58±0,81	2,27 (2,05-3,1)		

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; Mann Whitney Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, IQR: Interquartile Range (%25-75), MS: Multiple Skleroz, NMOSBH: Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları, Sağlıklı: Sağlıklı Kontrol, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein - 43

RRMS/PPMS/SPMS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında İnterlökin-6 değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalarının ortalama İnterlökin-6 değerleri en yüksek iken (43,78 pg/mL) sağlıklı kontrol grubunda olanların en düşüktür (1,23 pg/mL). İstatistiksel olarak anlamlı fark RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalar ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

RRMS/PPMS/SPMS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında GFAP değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalarının ortalama GFAP ölçümü en yüksek iken (0,13 ng/mL) sağlıklı kontrol grubunda olanların en düşüktür (0,05 ng/mL). İstatistiksel olarak anlamlı fark RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalar ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

RRMS/PPMS/SPMS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında Osteopontin ölçümü bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalarının Osteopontin ölçümü en yüksek iken (5,94 ng/mL) NMOSBH tanısı olanların en düşüktür (2,17 ng/mL). İstatistiksel olarak anlamlı fark RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalar ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

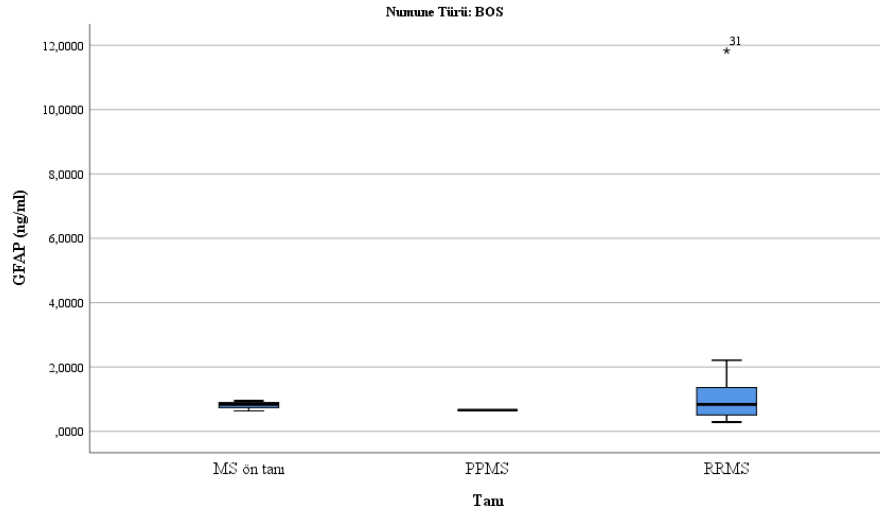
RRMS/PPMS/SPMS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında GAP-43 ölçümü bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalarının ortalama GAP-43 değerleri en yüksek iken (4,50 ng/mL) sağlıklı kontrol grubunda olanların

en dūřüktür (2,58 ng/mL). İstatistiksel anlamlı fark RRMS/PPMS/SPMS tanısı olan hastalar ile NMOSBH, sağlıklı kontrol grubunda olanlar arasındadır.

MS, NMOSBH ve sağlıklı kontrol grubundaki bireyler arasında NFL ölçümü bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). İstatistiksel olarak bir fark bulunmamasına karşı ortalama NFL değerleri en yüksek MS grubunda iken, en düşük sağlıklı kontrol grubunda olanlardadır.

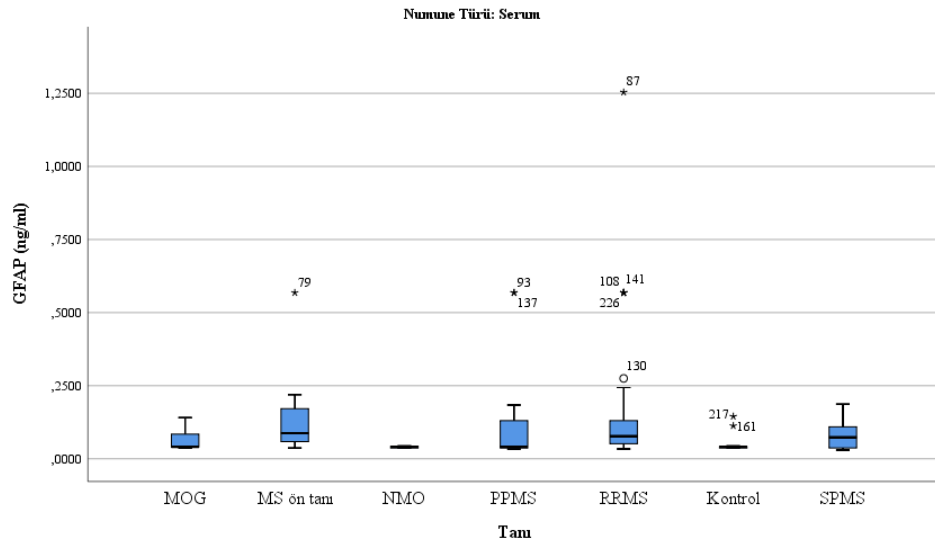
4.2 Numune türlerine göre biyobelirteçler için Box-Plot Grafikleri

Box – Plot grafikleri serum ve BOS numuneleri için ayrı yapılmıştır. BOS’a ait grafiklerde 3 alt grubun olması sadece bu alttıplere ait BOS numunelerinin olmasından kaynaklanmaktadır. Numune türü BOS olanlar için n değerleri: MS öntanısı(n=5), PPMS(n=1), RRMS(n=13)



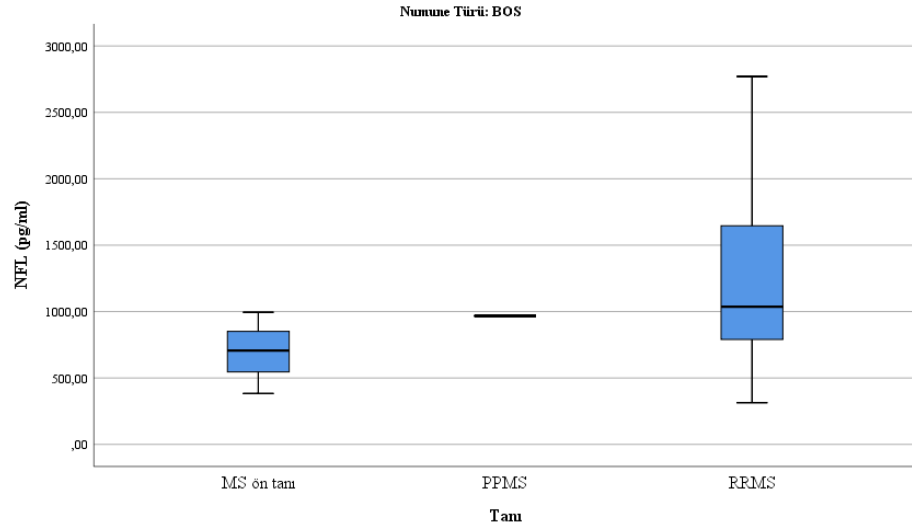
GFAP: Glial Fibriller Asidik Protein, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Skleroz, (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 1: Numune türü BOS olan gruplarda GFAP değerlerinin dağılımı



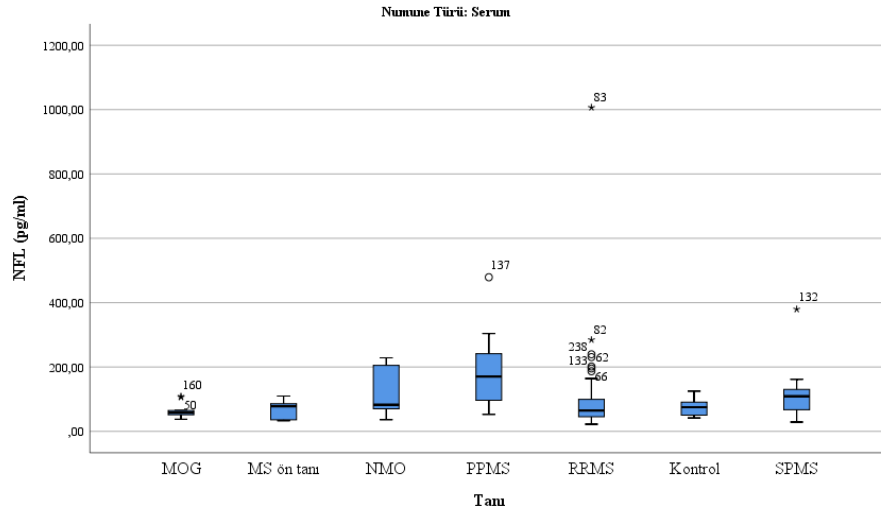
GFAP: Glial Fibriller Asidik Protein, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Skleroz, MOG: Myelin Oligodentrosit Glikoprotein, NMO: Nöromyelitis Optika(AQP4), SPMS: Sekonder Progresif Multiple Skleroz, Kontrol: Sağlıklı Kontrol (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 2: Numune türü serum olan gruplarda GFAP değerlerinin dağılımı



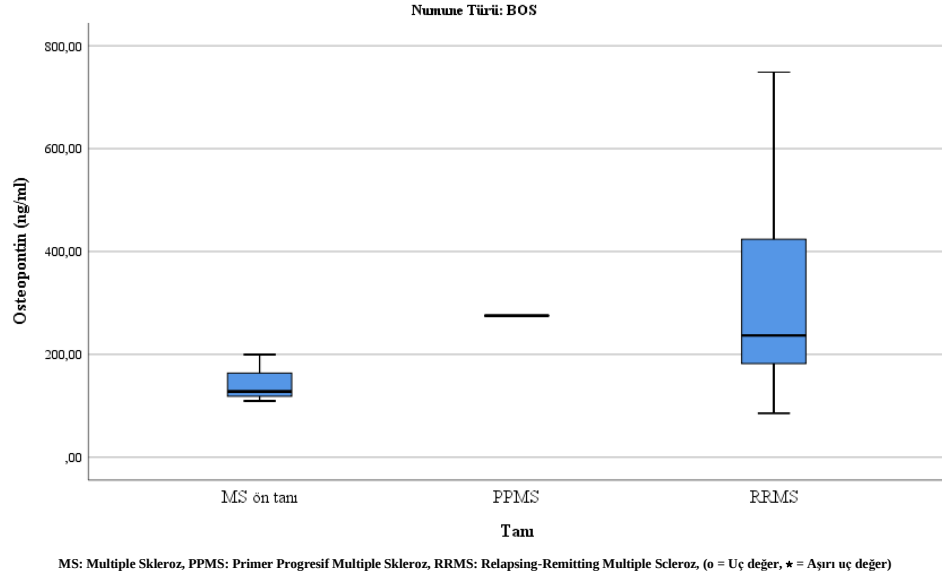
NFL: Nöroflaman Hafif Zincir, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Skleroz, (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 3: Numune türü BOS olan gruplarda NFL değerlerinin dağılımı

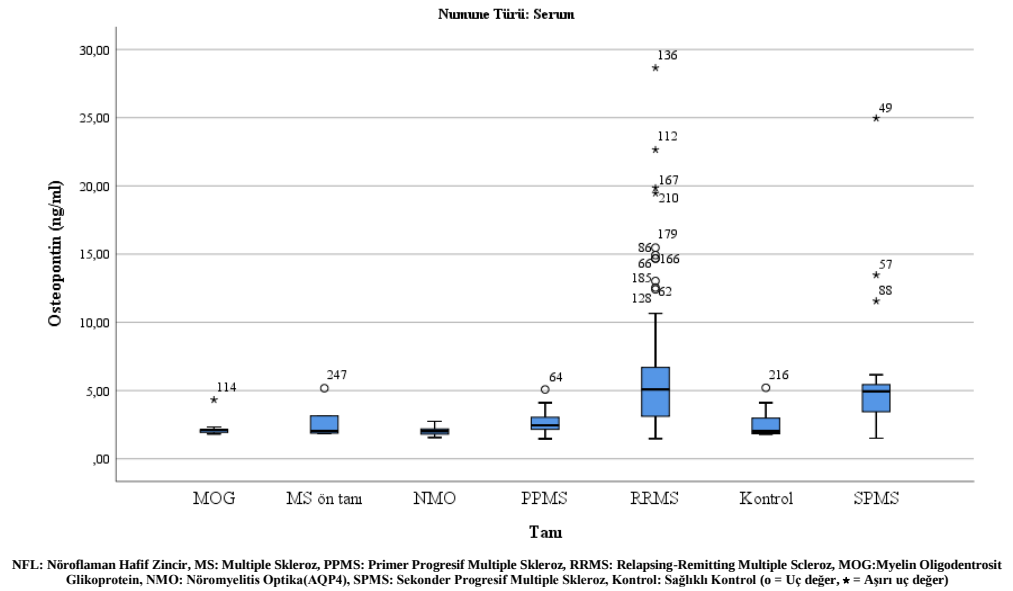


NFL: Nöroflaman Hafif Zincir, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Skleroz, MOG: Myelin Oligodentrosit Glikoprotein, NMO: Nöromyelitis Optika(AQP4), SPMS: Sekonder Progresif Multiple Skleroz, Kontrol: Sağlıklı Kontrol (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

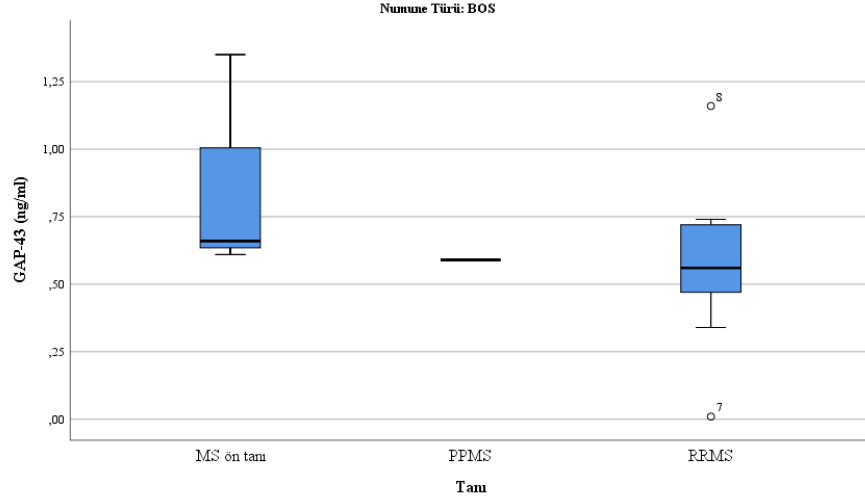
Grafik 4: Numune türü serum olan gruplarda NFL değerlerinin dağılımı



Grafik 5: Numune türü BOS olan gruplarda Osteopontin değerlerinin dağılımı

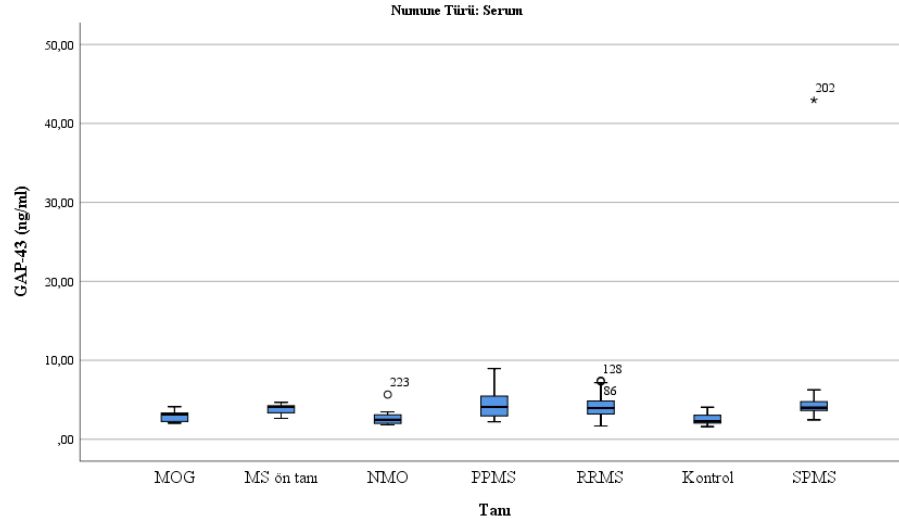


Grafik 6: Numune türü serum olan gruplarda Osteopontin değerlerinin dağılımı



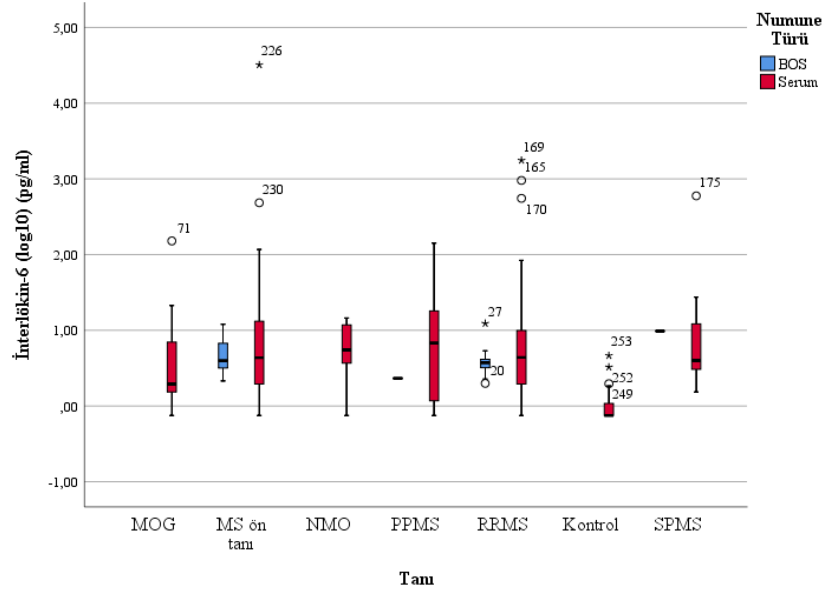
GAP-43: Growth Associated Protein – 43, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Scleröz, (o = Uç değeri, * = Aşırı uç değeri)

Grafik 7: Numune türü BOS olan gruplarda GAP-43 değerlerinin dağılımı



GAP-43: Growth Associated Protein – 43, MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Scleröz, MOG: Myelin Oligodendrocyte Glykoprotein, NMO: Nöromyelitis Optika (AQP4), SPMS: Sekonder Progresif Multiple Skleroz, Kontrol: Sağlıklı Kontrol (o = Uç değeri, * = Aşırı uç değeri)

Grafik 8: Numune türü serum olan gruplarda GAP-43 değerlerinin dağılımı



MS: Multiple Skleroz, PPMS: Primer Progresif Multiple Skleroz, RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Skleroz, MOG: Myelin Oligodentrosit Glikoprotein, NMO: Nöromyelitis Optika(AQP4), SPMS: Sekonder Progresif Multiple Skleroz, Kontrol: Sağlıklı Kontrol (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 9: Numune türü BOS ve serum olan gruplarda İL-6 değerlerinin dağılımı

Grafik 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 için numune türüne göre çizilen box-plot grafikleri incelendiğinde, GFAP, NFL, Osteopontin, GAP-43 biyobelirteçleri için numune türüne göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). İL-6 için numune türüne göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına rağmen ($p > 0,05$), serum İL-6 ortalama değeri ($204,21 \pm 2350,48$) BOS İL-6 ortalama değerinden ($4,67 \pm 2,61$) daha yüksek tespit edilmiştir.

Grafik-1 BOS box-plot incelendiğinde, RRMS altgrubuna ait değerlerin dağılımının, MS öntanısı ve PPMS gruplarına göre daha geniş olduğu görülmektedir. PPMS grubuna ait BOS örneği 1 adet olduğu için tek çizgi şeklinde

ifade edilmiştir. RRMS altgrubunda bir numunenin aşırı uç değere sahip olduğu izlenmektedir.

Grafik-2 serum box-plot incelendiğinde, NMO (AQP4+) ve sağlıklı kontrol grubuna ait değerlerin birbirine benzer şekilde dar bir dağılım gösterdiği, MS öntanısı, PPMS, RRMS,SPMS'e ait değerlerin birbirine benzer şekilde diğer gruplara göre daha geniş bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. RRMS, PPMS, MS öntanısına ait alt gruplarda aşırı uç değerlerin olduğu izlenmektedir.

Grafik-3 BOS box-plot grafiği incelendiğinde, RRMS grubuna ait değerlerin MS öntanısına ait değerlerden daha geniş dağılıma sahip olduğu görülmektedir.RRMS grubunda 50. ve 75. yüzdeler arasındaki değerlerin MS öntanısı grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmektedir.

Grafik-4 serum box-plot grafiği incelendiğinde, PPMS ve NMO (AQP4+) gruplarına ait değerlerin birbirine benzer şekilde diğer gruplara göre daha geniş bir dağılım gösterdiği MS öntanı, RRMS, sağlıklı kontrol, SPMS'e ait değerlerin birbirine benzer şekilde daha dar bir dağılıma sahip olduğu görülmektedir.

Grafik-5 BOS box-plot grafiği incelendiğinde RRMS grubuna ait değerlerin diğer gruplara göre daha geniş bir dağılım gösterdiği görülmektedir. RRMS grubuna ait 50. ve 75. yüzdeler arasındaki değerlerin MS öntanı grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmektedir.

Grafik-6 serum box-plot grafiği incelendiğinde RRMS alt grubundaki değerlerin dağılımının diğer gruplara göre daha geniş olduğu tespit edilmiştir. RRMS alt grubuna ait uç değerler ve aşırı uç değerlerin diğer alt gruplara göre daha

fazla olduğu izlenmektedir. MOG ve NMO(AQP4+) alt grubuna ait değerler diğer gruplara göre daha dar dağılım göstermektedir.

Grafik-7 BOS box–plot grafiği incelendiğinde MS öntanısı grubuna ait değerlerin RRMS grubundaki değerlere göre daha geniş dağılım gösterdiği izlenmektedir. MS öntanısı grubunda 50. ve 75. yüzdelik arasındaki değerlerin RRMS grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmektedir.

Grafik-8 serum box–plot grafiği incelendiğinde PPMS grubuna ait değerlerin diğer gruplara göre daha geniş, diğer gruplara ait değerler PPMS grubuna göre daha dar dağılım göstermektedir.

Grafik serum ve BOS, serum İL-6 değerleri incelendiğinde PPMS ve MS öntanısı gruplarına ait değerler diğer gruplara göre daha geniş dağılım grafiği göstermektedir. Serum sağlıklı kontrol İL-6 25. ve 75. yüzdelikler arasındaki değerlerin diğer gruplara göre daha düşük değerler olduğu izlenmektedir.

Tablo 6: Biyobelirteç değerlerinin numune türlerine göre karşılaştırılması

Değişken	Numune Türü	n	Ort.±SS.	Medyan(IQR)	p
İnterlökin-6 (pg/mL)	BOS	41	4,67±2,61	-	0,588^a
	Serum	187	204,21±2350,48	-	
GFAP (ng/mL)	BOS	19	1,44±2,56	0,82 (0.51-1.17)	0,000^{c*}
	Serum	165	0,11±0,15	0,06 (0.04-0.11)	
NFL (pg/mL)	BOS	19	1179,18±744,2	995,31 (706.81-1644.35)	0,000^{c*}
	Serum	165	99,56±97,97	77,39 (51.97-109.94)	
Osteopontin (ng/mL)	BOS	19	258,51±175,51	199,78 (127.76-326.89)	0,000^{c*}
	Serum	164	4,90±4,46	3,53 (2.05-5.42)	
GAP-43 (ng/mL)	BOS	19	0,60±0,29	0,57 (0.47-0.72)	0,000^{c*}
	Serum	164	4,06±3,37	3,69 (2.81-4.62)	

***p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; a:bağımsız gruplar t testi**

, c:Mann Whitney

Ort: Ortalama, **SS:** Standart Sapma, **IQR:** Interquartile Range (%25-75) **GFAP:** Glial Fibriler Asidik Protein, **NFL:**

Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43, **BOS:** Beyin Omurilik Sıvısı

IQR: Interquartile Range(%25-75)

Numune türü farklı hastalar arasında GFAP değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Numunesi BOS olan grupta GFAP değerleri daha yüksektir (1,44 ng/mL).

Numune türü farklı hastalar arasında NFL değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Numunesi BOS olan hastalarda NFL değerleri daha yüksektir (1179,18 pg/mL).

Numune türü farklı hastalar arasında Osteopontin değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Numunesi BOS olan hastalarda Osteopontin değerleri daha yüksektir (258,51 ng/mL).

Numune türü farklı hastalar arasında GAP-43 değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Numunesi serum olan hastalarda GAP-43 değerleri daha yüksektir (4,06 ng/mL).

Numune türü farklı hastalar arasında İL-6 değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına karşın serum İL-6 ortalama değeri ($204,21\pm2350,48$) BOS İL-6 ortalama değerinden ($4,67\pm2,61$) daha yüksektir.

Tablo 7: Biyobelirteç serum düzeylerinin NMOSBH altgrupları AQP4+,MOG+ gruplarına göre karşılaştırılması

Değişken	AQP4+/MOG+	n	Ort.±SS.	Medyan(IQR) ^a	p
İnterlökin-6 (pg/mL)	AQP4+	8	6,18±4,37	4,43 (3.12-10.43)	0,490
	MOG+	11	21,03±49,32	1,95 (1.14-14.12)	
GFAP (ng/mL)	AQP4+	8	0,04±0,00	0,04 (0.04-0.04)	0,379
	MOG+	11	0,06±0,04	0,04 (0.04-0.09)	
NFL (pg/mL)	AQP4+	8	128,92±81,16	87,41 (63.29-223.94)	0,079
	MOG+	11	64,87±23,86	58,08 (49.83-75.11)	
Osteopontin (ng/mL)	AQP4+	8	2,11±0,33	2,02 (1.95-2.21)	0,874
	MOG+	11	2,29±0,78	2,12 (1.9-2.23)	
GAP-43 (ng/mL)	AQP4+	8	2,42±0,57	2,41 (1.87-2.71)	0,266
	MOG+	11	2,94±0,76	3,16 (2.2-3.53)	

***p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; Mann Whitney**

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, IQR: Interquartile Range(%25-75), GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43, AQP4: Aquaporin-4, MOG: Myelin Oligodentrosit Glikoprotein

IQR: Interquartile Range Interquartile Range(%25-75)

AQP4+, MOG+ grubu hastaları arasında İnterlökin-6, GFAP, NFL, Osteopontin, GAP-43 değerleri bakımından istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır (p>0,05). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına karşın,

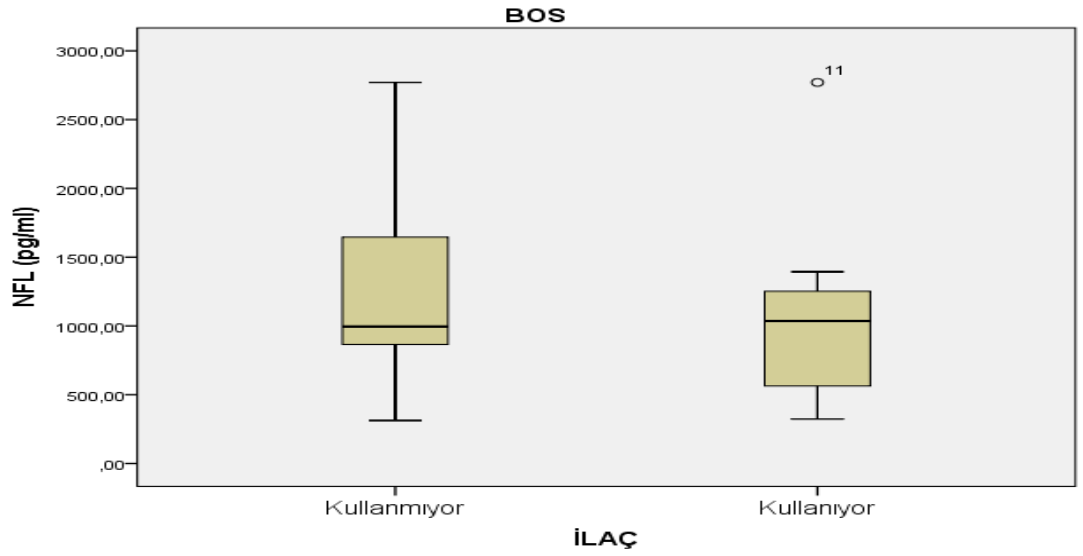
MOG+ grupta ortalama İL-6 değeri (21,03±49,32), AQP4+ grup ortalama İL-6 değerinden (6,18±4,37) daha yüksektir. MOG+ grupta ortalama GFAP değeri (0,06±0,04), AQP4+ grup ortalama GFAP değerinden (0,04±0,00) daha yüksektir. AQP4+ grupta ortalama NFL değeri (128,92±81,16), MOG+ grup ortalama NFL değerinden (64,87±23,86) daha yüksektir. MOG+ grupta ortalama osteopontin değeri (2,29±0,78), AQP4+ grup ortalama osteopontin değerinden (2,11±0,33) daha yüksektir. MOG+ grupta ortalama GAP-43 değeri (2,94±0,76), AQP4+ grup ortalama osteopontin değerinden (2,42±0,57) daha yüksektir.

Tablo 8: Serum biyobelirteç düzeylerinin bütün hasta gruplarında ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Değişken	İlaç kullanımı	n	Ort.±SS.	Medyan	p
İnterlökin-6 (pg/mL)	Kullanmıyor	44	91,24±316,03	3,03	0,109
	Kullanıyor	103	13,1±25,88	4,41	
NFL (pg/mL)	Kullanmıyor	39	87,81±71,46	83,79	0,287
	Kullanıyor	100	109,14±116,25	86,55	

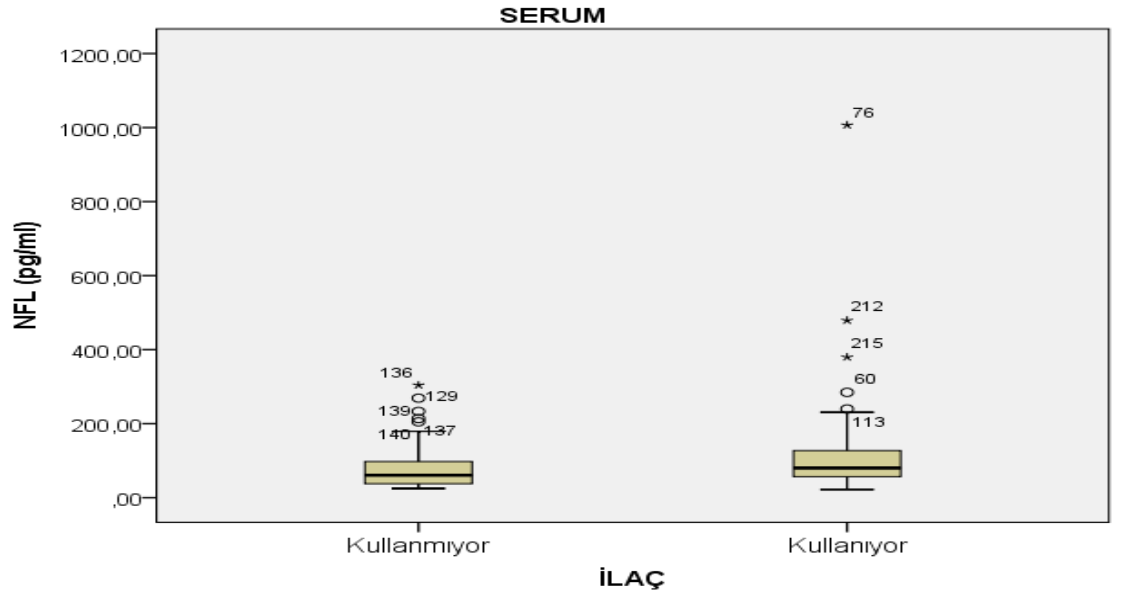
***p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; bağımsız gruplar t testi**
Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir

İlaç kullananlar ile kullanmayan hastalar arasında İnterlökin-6, NFL ölçümleri bakımından istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır (p>0,05). İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına karşın, ilaç kullanmayanlarda ortalama İL-6 değeri (91,24±316,03) ilaç kullananlara göre (13,1±25,88) daha yüksektir. İlaç kullananlarda ortalama NFL değeri (109,14±116,25) ilaç kullanmayanlara göre (87,81±71,46) daha yüksektir.



NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı, (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 10: RRMS, PPMS alt gruplarında immünmodülatör tedavi alanlar ile almayanlar arasında BOS NFL düzeyleri box-plot grafiği

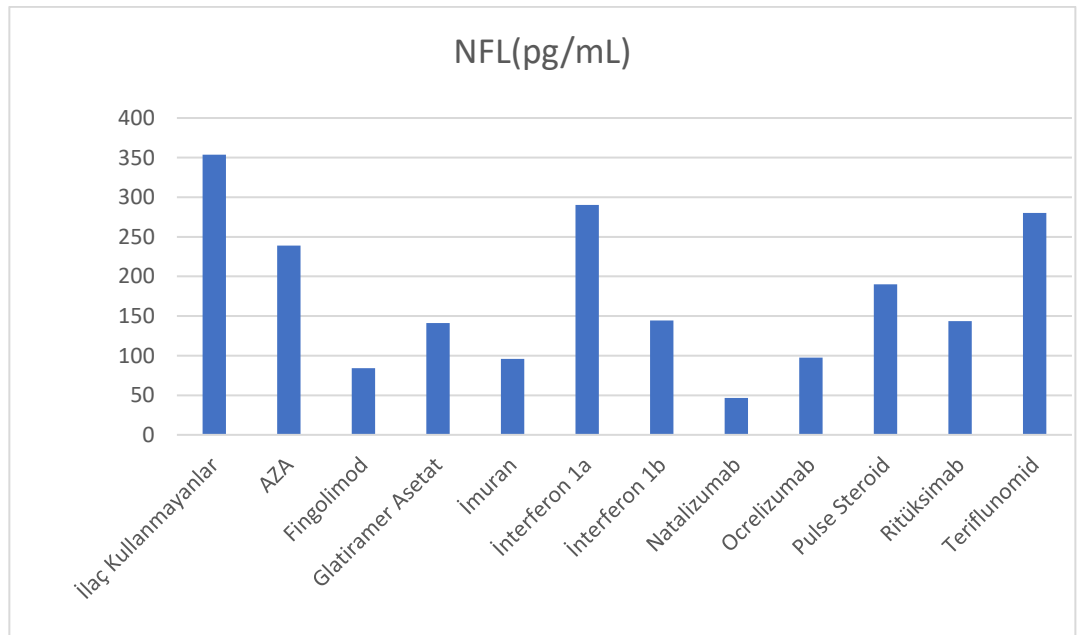


NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, (o = Uç değer, * = Aşırı uç değer)

Grafik 11: Bütün hastalık alt gruplarında immünmodülatör tedavi alanlar ile almayanlar arasında serum NFL düzeyleri box-plot grafiği

Grafik-10'a ait box-plot grafiği incelendiğinde ilaç kullanmayanlar kullananlara göre BOS NFL değerleri için daha geniş dağılım göstermektedir. 75.ve 100.yüzdelik arasındaki dağılım ilaç kullanmayanlarda kullananlara göre daha geniştir.

Grafik-11'e ait box-plot grafiği incelendiğinde ilaç kullananlar ve kullanmayanlar arasında benzer dağılımların olduğu görülmektedir. İlaç kullanan ve kullanmayanlar uç değerler ve aşırı uç değerler içermektedir.



NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, AZA: Azatiopürin

Grafik 12: İmmmodlatr tedavi rejimlerine göre NFL ortalama değerlerinin grafiksel gösterimi

Grafik-12'de kullanılan tedavi rejimlerine göre MS ve NMOSBH'da ortalama serum NFL düzeyleri gösterilmiştir. Serum ortalama NFL değerleri en yüksek ilaç

kullanmayanlarda ($353,6 \pm 453,09$), en düşük NFL değeri Natalizumab ($46,5 \pm 22,3$), Fingolimod ($84,23 \pm 36,28$), Ocrelizumab ($97,5 \pm 38,39$) kullananlardadır

Tablo 9: NFL düzeylerinin hasta ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması

Değişken	n	Ort.±SS.	Medyan(IQR)	p
Grup	Hasta BOS	42	1146,85±1053,64	796,4
	Kontrol BOS	42	3597,22±4449,79	1169,6
Tanı	MS ön tanısı	19	1200,99±1304,07	706,81 (360.41-1483.49)
	MS ^d	23	1102,13±820,32	848,15 (534.82-1394.38)
	Kontrol BOS	42	3597,22±4449,79	1169,65 (535.92-5120.11)
Cinsiyet	Erkek	29	2870,06±4073,42	967,15
	Kadın	42	2362,52±3387,9	921,73

***p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok ; a:bağımsız gruplar t testi**

, b:Kruskal Wallis, c:Mann Whitney

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, IQR: Interquartile Range (%25-75) (1) MS: Multiple Skleroz, MS^d: RRMS (n=19), KİS (n=1), Radyolojik İzole Sendrom (n=1), PPMS (n=1), SPMS (n=1)

Hasta BOS grubunu MS öntanısı ve MS alt grupları oluşturmaktadır. MS^d grubunu RRMS (n=19), KİS (n=1), Radyolojik İzole Sendrom (n=1), PPMS (n=1), SPMS (n=1) alt grupları oluşturmaktadır. Kontrol BOS grubunu ayırıcı tanı veya takip için LP yapılan değişik tanılarda hastalıklar oluşturmaktadır. Bu grubu Spinal

Musküler Atrofi, beyinde benign kitle, beyinde malign kitle, normal basınçlı hidrosefali, kafa içi hipertansiyonu, Guillian Barre hastalıkları oluşturmaktadır.

Hasta BOS ve kontrol BOS grupları arasında NFL değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Kontrol BOS grubundaki hastaların ortalama NFL değerleri daha yüksektir ($3597,22 \text{ pg/mL}$).

Tanısı ve cinsiyeti farklı hastalar arasında NFL ölçümü bakımından istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına karşın; tanı değişkeni için ortalama NFL değeri Kontrol BOS grubunda diğerlerinden yüksek ($3597,22 \pm 4449,79$), cinsiyet değişkeni için erkekte kadından fazla bulunmuştur ($2870,06 \pm 4073,42$).

4.3 Korelasyon Analizleri

Tablo 10: Biyobelirteç düzeylerinin birbirleri ve GD+T1 lezyon ile ilişkisi

r katsayısı	GD+ LEZYON T1	İL-6 (pg/mL)	GFAP (ng/mL)	NFL (pg/mL)	Osteopontin (ng/mL)	GAP-43 (ng/mL)
GD+ LEZYON T1	1	-,006	-0,01	-,086	,191	,290*
İL-6 (pg/mL)		1	,019	,038	,064	-,052
GFAP (ng/mL)			1	,035	,075	-,047
NFL (pg/mL)				1	-,062	,024
Osteopontin (ng/mL)					1	,033
GAP-43 (ng/mL)						1

**** $p<0,01$, * $p<0,05$ anlamlı ilişki var , $p>0,05$ anlamlı ilişki yok , Korelasyon katsayısı güç düzeyleri; $0<r<0,299$ zayıf, $0,300<r<0,599$ orta, $0,600<r<0,799$ güçlü, $0,800<r<0,999$ çok güçlü. ; Pearson Korelasyon**

GD+T1 LEZYON: Kontrast tutan lezyon, İL-6: İnterlökin-6, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, Gap-43: Growth Associated Protein-43

GAP-43 ölçümü ile GD+ LEZYON T1 ($r=0,290$) ölçümü arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönlü zayıf ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Diğer ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tablo 11: Biyobelirteç düzeylerinin EDSS, relaps sayısı ile ilişkisi

r katsayısı	EDSS	Relaps Sayısı
GD+ LEZYON T1	,018	,019
İnterlökin-6 (pg/mL)	,227**	,028
GFAP (ng/mL)	,038	-,093
NFL (pg/mL)	,199*	-,111
Osteopontin (ng/mL)	,000	-,077
GAP-43 (ng/mL)	,183*	,505**

**** $p<0,01$, * $p<0,05$ anlamlı ilişki var , $p>0,05$ anlamlı ilişki yok , Korelasyon**

katsayısı güç düzeyleri; $0<r<0,299$ zayıf, $0,300<r<0,599$ orta, $0,600<r<0,799$

güçlü, $0,800<r<0,999$ çok güçlü. ; Pearson Korelasyon

GD+T1 LEZYON: Kontrast tutan lezyon, İL-6: İnterlökin-6, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, Gap-43: Growth Associated Protein-43, EDSS: Expanded Disability Status Scale

EDDS skoru ile İL-6 ($r=0,227$), NFL ($r=0,199$), GAP-43 ($r=0,183$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönlü zayıf ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$).

Relaps sayısı ile GAP-43 ($r=0,505$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönlü orta kuvvetli ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$).

Tablo 12: Yaş ve hastalık süresinin biyobelirteç düzeyleri ile ilişkisi

	Hastalık Süresi	Yaş
NFL (pg/mL)	,170*	,061
EDSS	,443**	,080
Relaps Sayısı	,510**	,003

****p<0,01 , *p<0,05 anlamlı ilişki var , p>0,05 anlamlı ilişki yok , Korelasyon katsayısı güç düzeyleri; 0<r<0,299 zayıf, 0,300<r<0,599 orta, 0,600<r<0,799 güçlü, 0,800<r<0,999 çok güçlü. ; Pearson Korelasyon**

NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, EDSS: Expanded Disability Status Scale

Hastalık süresi ile NFL değerleri (0,170) arasında istatistiksel anlamlı, pozitif yönlü zayıf; hastalık süresi ile EDSS skoru (r=0,443), relaps sayısı (r=0,510) arasında istatistiksel anlamlı, pozitif yönlü orta kuvvetli ilişki bulunmaktadır (p<0,05).

Yaş ile NFL, EDSS, relaps sayısı arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamaktadır (p>0,05).

Tablo 13: BOS ve serum örneklerinde biyobelirteçlerin korelasyonu

	sİL6	sGFAP	sNFL	sOsteo	sGAP-43
bİL-6 (pg/mL)	0,022	x	x	x	x
bGFAP (ng/mL)	x	0,094	x	x	x
bNFL (pg/mL)	x	x	-0,135	x	x
bOsteopontin (ng/mL)	x	x	x	-0,042	x
bGAP-43 (ng/mL)	x	x	x	x	-0,091

****p<0,01 , *p<0,05 anlamlı ilişki var , p>0,05 anlamlı ilişki yok , Korelasyon**

katsayısı güç düzeyleri; 0<r<0,299 zayıf, 0,300<r<0,599 orta, 0,600<r<0,799

güçlü, 0,800<r<0,999 çok güçlü. ; Pearson Korelasyon

bİL-6: Bos İnterlökin-6, **bGFAP:** Bos Glial Fibriler Asidik Protein, **bNFL:** Bos Nörofilaman Hafif Zincir,

bOsteopontin: Bos Osteopontin, **bGAP-43:** Bos Growth Associated Protein-43, **sİL-6:** Serum İnterlökin-6, **sGFAP:**

Serum Glial Fibriler Asidik Protein, sNFL: Serum Nörofilaman Hafif Zincir, **sOsteo:** Serum Osteopontin, **sGAP-**

43: Serum GAP-43

BOS ve serumda biyobelirteçler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır (p>0,05).

4.4 Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) Analizleri

Tablo 14: MS Grubu ROC Analizi Sonuçları

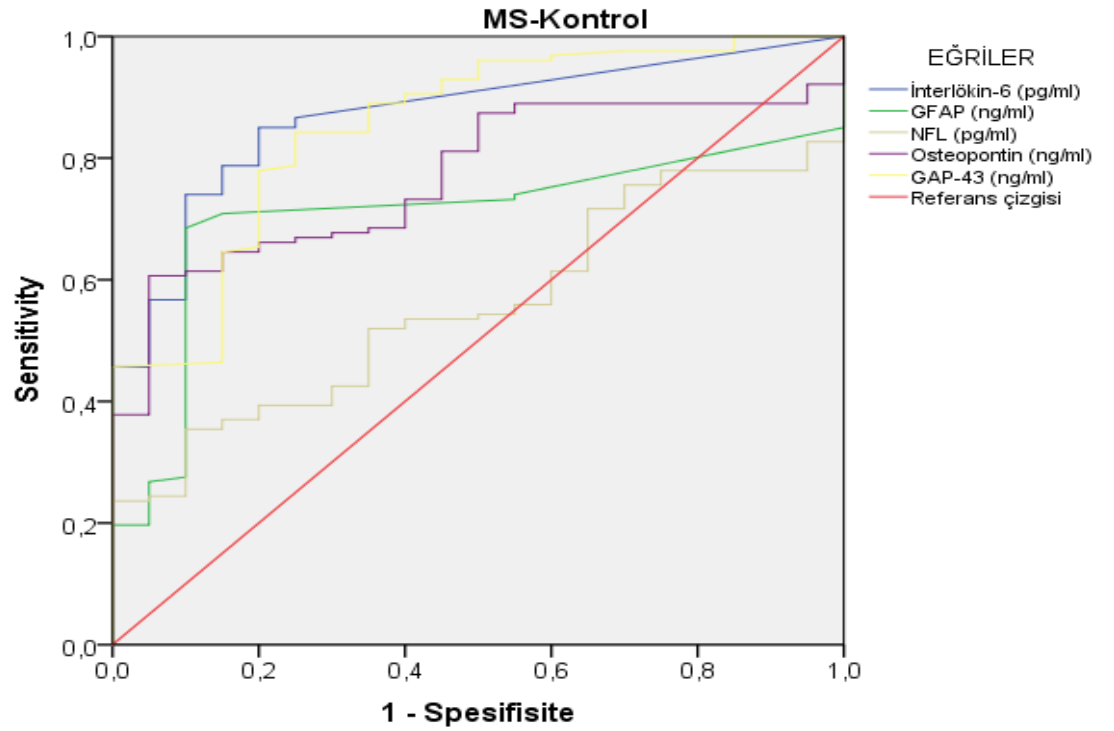
	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	p
İnterlökin-6 (pg/mL)	0,591	0,529	0,734	0,671	0,870	0,036	0,000*
GFAP (ng/mL)	0,709	0,647	0,815	0,503	0,704	0,049	0,003*
NFL (pg/mL)	0,614	0,529	0,741	0,385	0,557	0,054	0,413
Osteopontin (ng/mL)	0,835	0,588	0,817	0,619	0,770	0,043	0,000*
GAP-43 (ng/mL)	0,921	0,529	0,811	0,753	0,851	0,045	0,000*

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan,

Std.Hata: Standart Hata

*p<0,05



Grafik 13: Multiple Skleroz Grubu ROC eğrisi grafiği

Grafik-13’de MS hastalık grubu ve sağlıklı kontrol grubundaki veriler kullanılarak biyobelirteçler için ROC eğrileri çizilmiştir. Eğri altında kalan alan en fazla %95 güven aralığında (0,799-0,941) İL-6’da bulunmuştur (AUC:0,870).

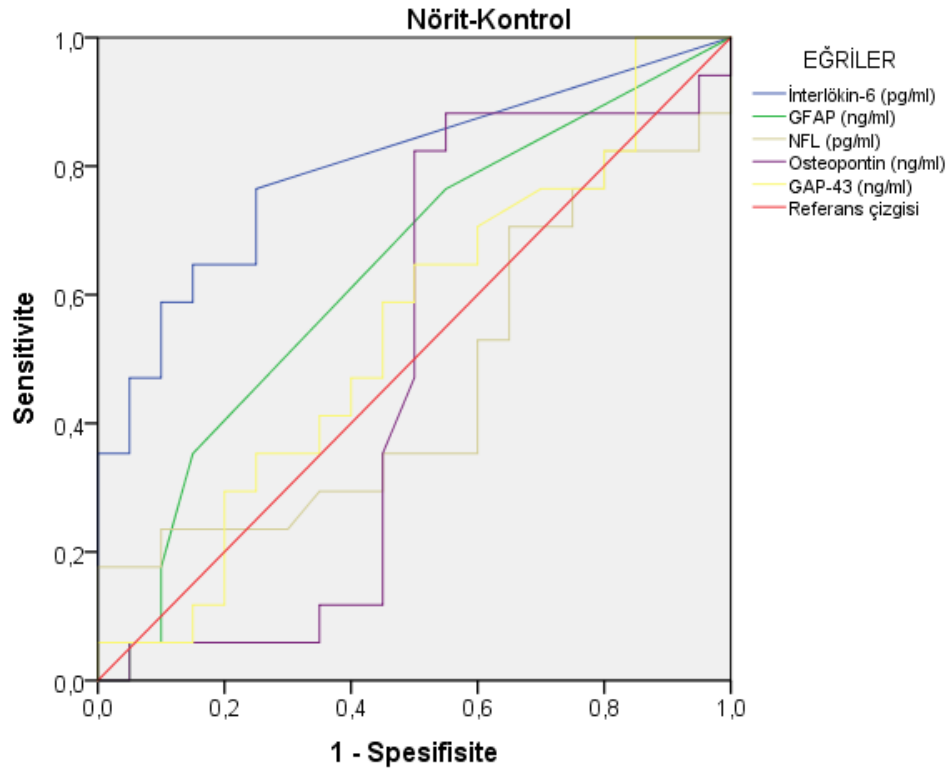
Tablo 15: NMOSBH Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	<i>p</i>
İnterlökin-6 (pg/mL)	0,765	0,750	0,782	0,731	0,797	0,076	0,002*
GFAP (ng/mL)	0,765	0,450	0,620	0,619	0,637	0,093	0,156
NFL (pg/mL)	0,529	0,400	0,508	0,419	0,463	0,100	0,703
Osteopontin (ng/mL)	0,882	0,450	0,653	0,464	0,491	0,102	0,927
GAP-43 (ng/mL)	0,647	0,500	0,603	0,447	0,544	0,096	0,648

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata

* $p < 0,05$

**Grafik 14:** NMOSBH grubu ROC eğrisi grafiği

Grafik-14’de NMOSBH hastalık grubu ve sağlıklı kontrol grubundaki veriler kullanılarak biyobelirteçler için ROC eğrileri çizilmiştir. Eğri altında kalan alan en fazla %95 güven aralığında (0,647-0,947) İL-6’de bulunmuştur (AUC:0,797).

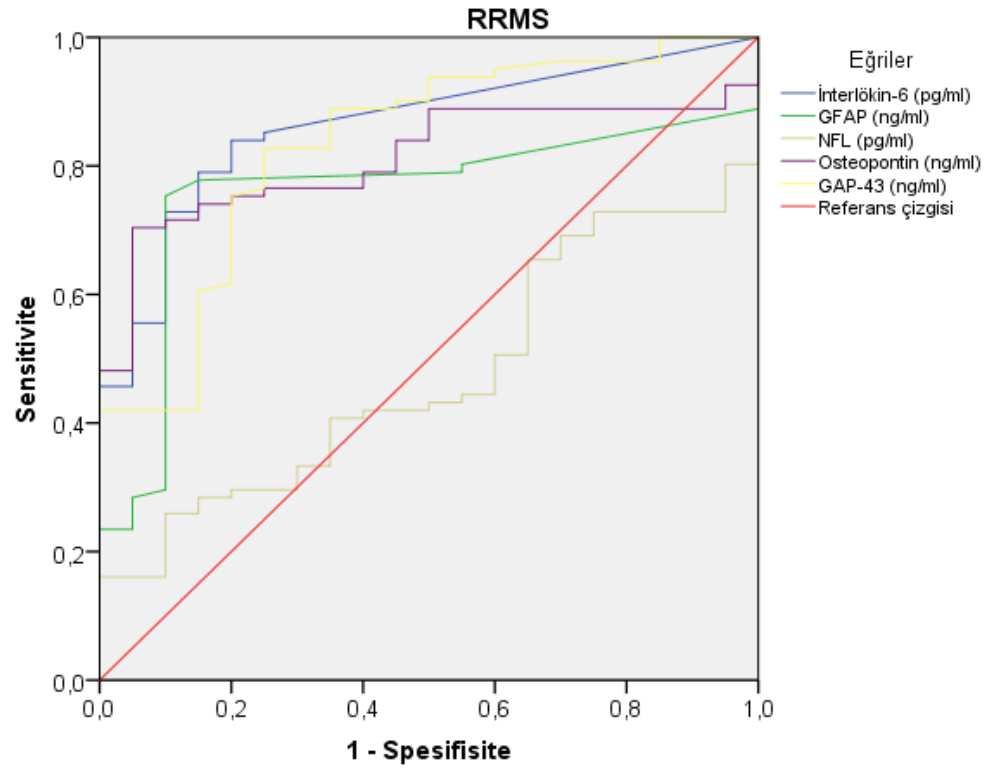
Tablo 16: RRMS Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	<i>p</i>
İnterlökin-6 (pg/mL)	0,852	0,750	0,932	0,559	0,863	0,040	0,000*
GFAP (ng/mL)	0,802	0,450	0,854	0,362	0,759	0,054	0,000*
NFL (pg/mL)	0,506	0,400	0,771	0,168	0,474	0,061	0,720
Osteopontin (ng/mL)	0,765	0,700	0,910	0,427	0,812	0,042	0,000*
GAP-43 (ng/mL)	0,827	0,750	0,929	0,520	0,832	0,050	0,000*

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata

* $p < 0,05$

**Grafik 15:** RRMS grubu ROC eğrisi grafiği

Grafik-15’de RRMS MS hastalık alttıpi ve sağlıklı kontrol grubundaki veriler kullanılarak biyobelirteçler için ROC eğrileri çizilmiştir. Eğri altında kalan alan en fazla %95 güven aralığında (0,785-0,941) İL-6’de bulunmuştur (AUC:0,863).

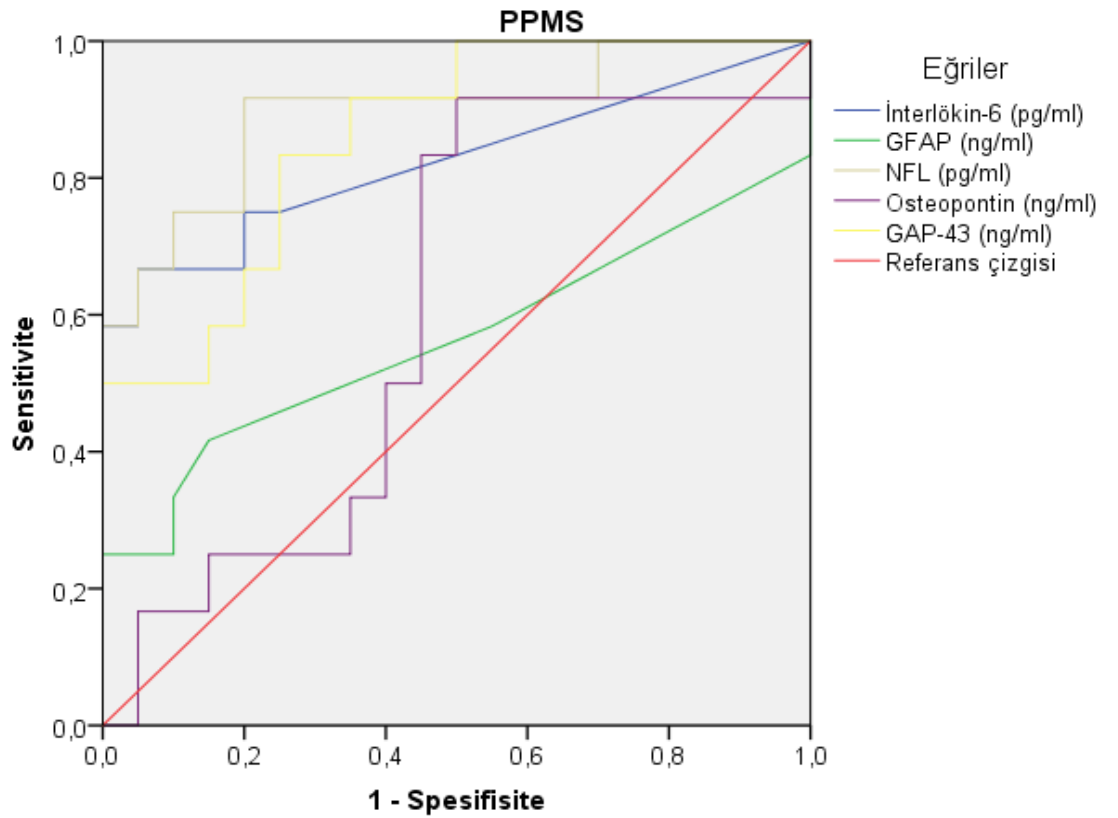
Tablo 17: PPMS Sağlıklı Kontrol Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	<i>p</i>
İnterlökin-6 (pg/mL)	0,750	0,750	0,643	0,833	0,823	0,087	0,003*
GFAP (ng/mL)	0,583	0,450	0,388	0,642	0,563	0,120	0,559
NFL (pg/mL)	0,917	0,800	0,733	0,941	0,896	0,063	0,000*
Osteopontin (ng/mL)	0,833	0,550	0,526	0,845	0,608	0,105	0,312
GAP-43 (ng/mL)	0,833	0,750	0,666	0,882	0,858	0,065	0,001*

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata

* $p < 0,05$

**Grafik 16:** PPMS grubu ROC eğrisi grafiği

Grafik-16'da PPMS MS hastalık alttipi ve sağlıklı kontrol grubundaki veriler kullanılarak biyobelirteçler için ROC eğrileri çizilmiştir. Eğri altında kalan alan en fazla %95 güven aralığında (0,772-1,000) NFL'de bulunmuştur (AUC:0,896).

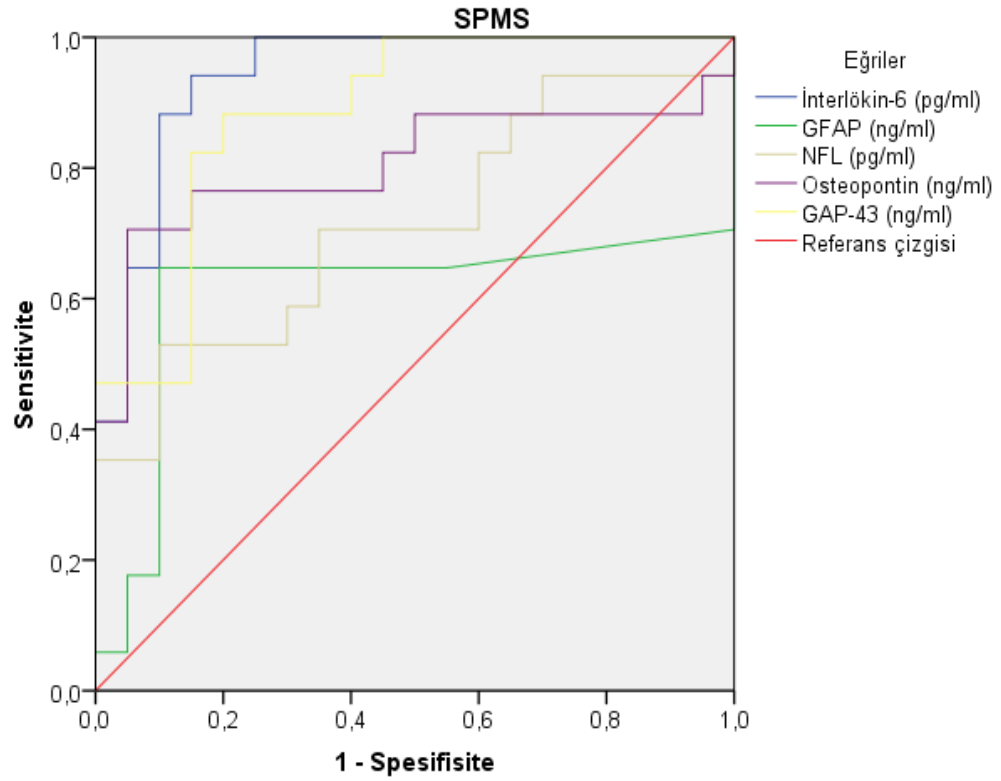
Tablo 18: SPMS Sağlıklı Kontrol Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	p
İnterlökin-6 (pg/mL)	0,941	0,750	0,762	0,937	0,941	0,038	0,000*
GFAP (ng/mL)	0,647	0,850	0,786	0,738	0,607	0,110	0,266
NFL (pg/mL)	0,706	0,550	0,572	0,687	0,715	0,088	0,026*
Osteopontin (ng/mL)	0,765	0,850	0,812	0,809	0,806	0,083	0,002*
GAP-43 (ng/mL)	0,882	0,800	0,789	0,888	0,885	0,054	0,000*

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, NFL: Nörofilaman Hafif Zincir, GAP-43: Growth Associated Protein-43

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata

* $p < 0,05$

**Grafik 17:** SPMS grubu ROC eğrisi grafiği

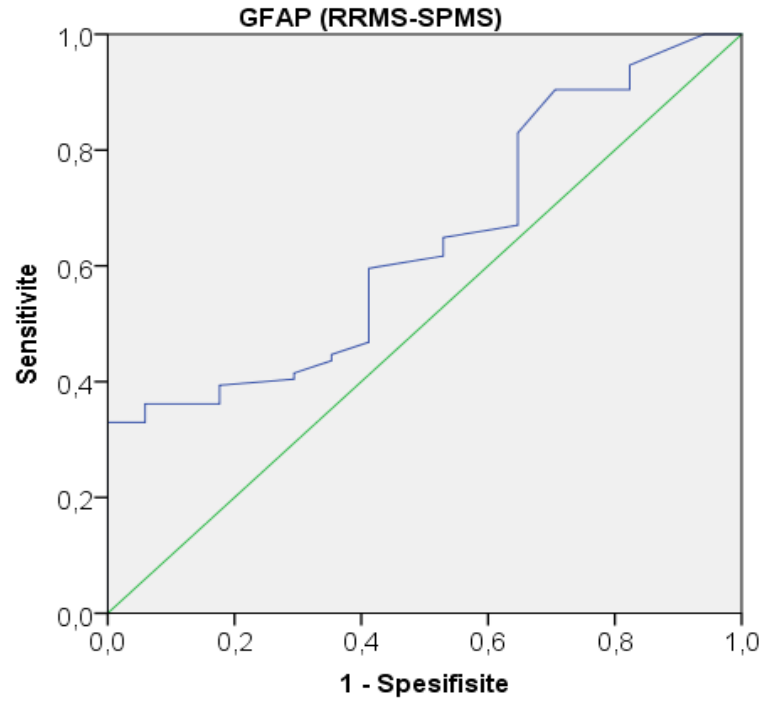
Grafik-17’de SPMS MS hastalık alttipi ve sağlıklı kontrol grubundaki veriler kullanılarak biyobelirteçler için ROC eğrileri çizilmiştir. Eğri altında kalan alan en fazla %95 güven aralığında (0,868-1,000) İL-6’de bulunmuştur (AUC:0,941).

Tablo 19: RRMS-SPMS Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivite	Spesifite	PP	NP	AUC	Std. Hata	<i>p</i>
GFAP (ng/ml)	0,596	0,588	0,890	0,202	0,640	0,067	0,066

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata



Grafik 18: RRMS-SPMS grubu ROC Eğrisi

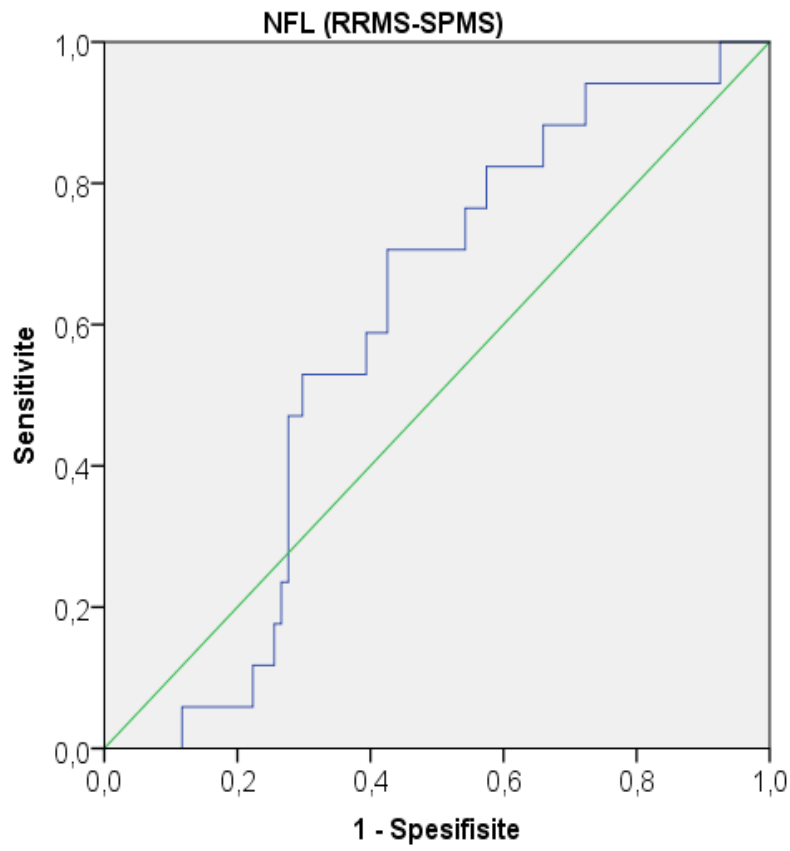
Grafik-18’de RRMS- SPMS MS hastalık alttipleri arasında GFAP için ROC eğrileri çizilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 20: RRMS-SPMS Grubu ROC Analizi Sonuçları

	Sensivity	Specificity	PP	NP	Alan	Std. Hata	p
NFL (pg/ml)	0,706	0,511	0,891	0,234	0,592	0,063	0,229

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

PP: Pozitif Prediktif Değer, NP: Negatif Prediktif Değer, AUC: Area Under the Curve, Eğri Altında Kalan Alan, Std.Hata: Standart Hata



Grafik 19: RRMS-SPMS grubu ROC Eğrisi

Grafik-19’da RRMS- SPMS MS hastalık alttipleri arasında NFL için ROC eğrileri çizilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamız kesitsel nitelikli ve numunelerin toplandığı merkez tek olduğu için tanısal işlemler için LP yapılan hasta sayısı azdı. Tanısal ve tedavi edici işlemler için yapılan boşaltıcı BOS gibi işlemler ile elde edilen kontrol BOS sayımız yeterli düzeye ulaşamadı. MS grubunda, ayırıcı tanı için ve tanısal işlemler için yapılan LP'ler dışında; SPMS, PPMS, NMOSBH gibi gruplara LP yapılamamıştır. Çünkü MS ve NMOSBH tanılı takipli hastalara çok nadir sebepler dışında LP yapılmamaktadır. NMOSBH hasta grubu sayı olarak oldukça kısıtlı, daha önce tanı konulmuş ve takipli hastalar olduğu için bu gruptaki hastaların BOS örnekleri çalışılamamıştır. Bu durumun araştırma süresinin uzatılması ve biyobankacılık işlemlerinin başlatılması ile üstesinden gelinebilir. Bu yüzden ileride çalışma süresinin uzatılarak elde edilecek olan BOS numune sayısının artırılması amaçlanmaktadır.

Tez çalışmamız kesitsel araştırma niteliğinde olduğu için hastalardan poliklinik veya klinik vizitlerinde bir kere numune alınmıştır. Oysa ki aynı hastayı 6 – 12 aylık süreçlerde takip etme şansımız olsaydı, hastaların atak ve remisyonda ki biyobelirteç seviyelerinin karşılaştırmalarını yapabilir durumda olacaktık. Atak ve remisyonda bu hastalık alttiplerine ait biyobelirteç düzeylerinin farklı olabileceğine dair örnekler bulunmaktadır (122).

Piehl ve arkadaşları tedavi değişikliğinin NFL üzerine olan etkisini göstermek için yapmış oldukları çalışmada, daha efektif tedavilere geçmenin NFL seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (123). Çalışmamızda sadece farklı tedavi rejimleri alan hastalardaki NFL karşılaştırmaları yapılabilmektedir. NFL ortalama düzeyleri

karşılaştırıldığında Natalizumab, Ocrelizumab ve Fingolimod alan hastalarda NFL ortalama düzeylerinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Hiçbir immünmodülatör tedavi almayan hastalarda ise NFL ortalama düzeyleri en yüksek oranda bulunmuştur. Oysa ki çalışma prospektif nitelikte olsaydı, yeni tanı almış bir hastanın tekrarlayan NFL ölçümlerinde verilen tedavinin ne derecede etkili olabildiği tespit edilebilir durumda olacaktı.

Çalışmamızda valide edilmiş BOS NFL kiti (124) olan Uman Diagnostic'e ait kit ile hasta grubumuzda BOS'u olanları, MS öntanısı ile BOS'u alınmış olanları ve kontrol grubunda çeşitli hastalıkların ayırıcı tanısı veya hastalık takibi için alınmış BOS örneklerini kullandık. Ortalama NFL değerleri açısından karşılaştırıldığında en yüksek NFL değerleri beyinde kitle tanısı olan hastalarda iken, en düşük değerler MS öntanısı ve RRMS tanısı konulmuş hastalardı. Beyinde kitle sebebi ile opere edilmiş kişilerde, NFL kitlerinin standartizasyonunun yapılması ile beraber bu hastalıkların henüz radyolojide tespit edilemeyen nükslerinin BOS'da NFL analizi ile takip edilebileceğini düşünmekteyiz.

Hastalık engellilik durumunu öngörmeye yapılacak olan prospektif çalışmalarla ayrı vizitlerde alınan kan örneklerinde biyobelirteç değerlendirmeleri yapılması gerekmektedir. Her vizitte bakılacak olan Expanded Disability Status Score (EDSS) skoru ile aynı vizitte bakılacak olan biyobelirteç düzeyleri karşılaştırılıp, engellilik durumu hakkında bir öngörüye sahip olunabilecektir. Bizim araştırmamızda EDSS skoru ile biyobelirteçler arasında ki korelasyona bakılmış ve İL-6 EDSS arasında pozitif yönde anlamlı şekilde zayıf korelasyon, NFL, GAP-43 EDSS arasında pozitif yönde anlamlı şekilde çok zayıf ilişki

bulunmuştur. Disanto ve arkadaşları NFL ile EDSS arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulmuşlardır (110).

Nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer'da da nörodejenerasyonun ne derece olduğunu göstermek için Mattsson ve arkadaşları prospektif bir çalışma yapmış ve çalışma sonucunda plazma NFL'nin Alzheimer hastalarında ki nörodejenerasyonu gösterebilecek ve tedaviye cevabı monitörize edebilecek invaziv olmayan bir biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir (125).

İmmünmodülatör tedavi rejimlerine göre glial progresyon belirteci olan GFAP ve nörodejenerasyon ve aksonal hasarın belirteci olan NFL düzeyleri değişebilmektedir. Bizim çalışmamızda da GFAP, NFL değerleri ve alınan tedavi rejimleri açısından anlamlı olarak farklılık saptanmıştır. Hangi tedavinin diğerine daha üstün olduğunu biyobelirteçler ile saptamak için aynı hastanın takip edilip klinik bulgularına göre tedavi rejimi değişikliği yapıldığı zaman alınan kan örneklerinde biyobelirteç düzeylerinin belirlenmesi ile olmaktadır (123).

Polman ve arkadaşları yapmış oldukları çalışma ile Natalizumab'ın immünmodülatör tedavi olarak MS'de kullanılabileceğini göstermelerinden sonra birçok hasta bu tedaviden yarar görmüştür. Natalizumab a4b1 integrin blokajı yaparak periferden SSS'ye olan immün hücre akışını yavaşlatır ve durdurur (40). Çalışmamızda, aksonal hasarın göstergesi olan ortalama NFL değerleri en düşük Natalizumab kullanan hastalarda bulunmuştur. İlaç kullanmayan hastalarda ortalama NFL seviyeleri en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Bu durum Natalizumab tedavisi alanlarda aksonal hasarın daha az olduğunu gösterir niteliktedir.

MS ve NMOSB hastalıklarının tanısı ve hastalık takibinde biyobelirteçlerin kullanıma girebilmesi için bazı şartlar aranmaktadır. Biyobelirteçler kolay ve güvenilir bir şekilde ölçülebilmeli, farklı merkezlerde aynı güvenilirlikle çalışılabilmelidir. Bunun için de geleneksel ELIZA metotları terkedilmeye başlanıp SIMOA metodu kullanılmaya başlanmıştır (126). Ülkemizde SIMOA metodu olmadığı için biyobelirteç analizleri ELIZA yöntemi ile çalışılmıştır. İlerleyen süreçlerde SIMOA metodu kullanan bir merkezde numunelerin tekrar analizinin yapılması planmaktadır.

Çalışmamızda aynı hastalara ait serum ve BOS numunelerinde biyobelirteçler değerleri incelenmiştir. De FLON ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada BOS ve plazma NFL aralarında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (127). Bizim çalışmamızda serum ve BOS’da anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Bu durum aynı hastalara ait serum ve BOS değerleri eşleştirilmeden korelasyon analizi yapılmasına bağlı olabilir. Serum ve BOS değerleri karşılaştırıldığında iki numune türü arasında NFL açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Leppert ve arkadaşları nöronal hasarın direkt göstergesi olan NFL ile akut hastalık aktivitesinin, tedaviye cevabın ve engellilik progresyonunu öngörülebileceğini belirtirken (128), Myhr ve arkadaşları NFL’nin aksonal hasar süresince arttığını fakat hastalığa spesifik bir biyobelirteç olmadığı fikrini savunmuşlardır. Alzheimer hastalığı, küçük damar hastalığı, amiotrofik lateral skleroz, travmatik beyin hasarı gibi durumlarda da artabileceğini belirtmişlerdir (129). Biz de literatürde görülen bu karışıklığı, daha önce BOS için valide edilmiş

ELIZA kiti kullanarak farklı hasta grupları için test etmeye çalıştık (124). Kontrol grubu olarak kullanılan hasta gruplarında neredeyse yeni tanı MS hastalarına ait BOS NFL değerlerine yakın veya yüksek NFL değerleri tespit ettik. Bening ve malign beyin ve beyin sapında kitle, Amyotofik Lateral Skleroz , benign bir sebep olarak gösterilen normal basınçlı hidrosefali de bile artmış NFL düzeylerini tespit ettik. Etik değerlerden dolayı sağlıklı kişilerden BOS numunesi elde edilememiştir. Sağlıklı gönüllülerden BOS elde edildiği takdirde elde edilecek veri daha anlamlı çıkacaktır. Myhr ve arkadaşlarının da belirttiği gibi aksonal hasar ile seyreden hastalıklar da BOS NFL düzeyleri artmaktadır. Bu yüzden hastalığı gösterebilecek kesim değerini belirlemek oldukça zordur (129).

Chen ve arkadaşları, MS hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı olarak İL-6 seviyeleri bakımından fark olduğunu tespit etmişlerdir (130). Bizim çalışmamızda da sağlıklı kontrol grubu ile MS alt tipleri arasında anlamlı olarak farklılık bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubunda İL-6 ortalama değerleri MS grubuna göre oldukça düşük tespit edilmiştir. Aynı zamanda MS ayırıcı tanısı için serum ve BOS'un eş zamanlı alındığı hastalarda yapılan incelemelerde serum ve BOS arasında İL-6 açısından zayıf korelasyon tespit edilmiştir. Sağlıklı gönüllülerden etik kurallar gereği BOS elde edilememiştir. İleri ki çalışmalarda etik açıdan uygunluk olduğu takdirde sağlıklı gönüllülerden elde edilen BOS ve serum örneği ile de çalışmalar yapılabilir.

Rincon ve arkadaşları İL-6'nın sadece inflamatuvar belirteç olmadığını aynı zamanda inflamatuvar hastalıklar için tedavide hedef molekül olarak

kullanılabilecek bir molekül olduğunu belirtmişlerdir (131). MS hastalık patolojisinde İL-6'nın yerinin net olarak anlaşılması ile hedef moleküle spesifik monoklonal antikorlar geliştirilerek yapılabilecek yeni tedavi rejimlerinin önü açılabilir. Araki ve arkadaşları monoklonal İL-6 reseptör antikoru Tocilizumab'ı MS hastalarında kullandıkları bir bilimsel araştırma yayınlamışlardır (132). Ama halen MS patolojisinde İL-6'nın yeri net olarak aydınlatılmadığı için sağlıklı gönüllülerden alınacak olan BOS ve serum örnekleri ile MS hastalarında yapılacak olan çok merkezli prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

NMO hastalık fizyopatolojisinde de İL-6'nın önemli rol aldığı Chihara ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir. Özellikle NMO atağı sırasında periferden üretilen AQP4 otoantikorlarının majör tetikleyicisinin İL-6 olduğu bulunmuştur (48). Bizim çalışmamızda ki AQP4+ NMO hastalarının hem sayılarının az olması hem de hepsinin immünmodülatör tedavi kullanıyor olması NMO atak patogenezinde İL-6'nın NMO atak patogenezindeki yerini değerlendirmemizi zorlaştırdı. MS grubu ve sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında NMO grubunda immünmodülatör tedavi alsalar bile İL-6 seviyeleri açısından sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda MS grubundaki serum ve BOS osteopontin seviyeleri arasında numune türü bakımından anlamlı olarak fark bulunmuştur. MS öntanısı ile BOS alınan hastaların büyük kısmı hastalık atak semptomları ile gelmiştir. BOS'da

osteopontin seviyelerinin anlamlı olarak seruma göre yüksek çıkması beyin parankiminde gelişen inflamatuvar olaylar zincirinden osteopontinin de sorumlu olabileceğini göstermektedir. Wen ve arkadaşlarının bulduğu bulgulara benzer şekilde BOS değerleri yüksek çıkmışken, serum osteopontin seviyeleri bu bulgular ile uyumlu bulunmamıştır (133). Hastaların birçoğunun immünmodülatör tedavi kullanıyor olması serumdaki bu düşüklüğü açıklayıcı nitelikte olabilir.

NMO grubu için sadece serum osteopontin analizi yapılmıştır. Analiz edilen numunelerin ait olduğu hastaların hiçbirisi relaps da olmayıp hepsi immünmodülatör tedavi kullanmaktaydı. Shimizu ve arkadaşlarının NMO ve MS gruplarında yaptıkları bir çalışmada NMO grubunda ki osteopontin seviyeleri ortalamaları MS grubundan fazla bulunmuştur. Ayrıca atak kliniği ile gelen hastalarda da osteopontin seviyeleri remisyonda olan hastalara göre yüksek tespit edilmiştir. Çalışmamızda NMO grubuna ait osteopontin değerleri Shimizu ve arkadaşlarının bulduğu değerlere göre daha düşük bulunmuştur (118).

Literatürde GAP-43 ile ilgili MS ve NMOSB hastalarında yapılmış çalışmalar oldukça azdır. Yapılan çalışmaların da büyük kısmı BOS örneklerinde yapılmıştır. Çalışmamızda ROT ve arkadaşlarının MS hastalarına ait BOS örneklerindeki GAP-43 sonuçlarına benzer değerler elde ettik(120). Serum GAP-43 değerlerimizin BOS GAP-43 değerlerimizden anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit ettik. Bu da aksonal rejenerasyon belirteci olan GAP-43'ün SSS dışında, PSS kaynaklı olarak yükselme gösterebileceği hipotezimizi doğrular nitelikteydi.

Çalışmamızın en büyük eksikliklerinden birisi serum GFAP ve NFL analizlerinin SIMOA metodu ile de yapılmamış olmasıdır. İleri dönem

Çalışmalarımız için aynı hastalara ait derin dondurucuda depolanmış örneklerden SIMOA ile bu belirteçlerin analizlerinin yapılması planlanmıştır.

Aksonal hasar ve nöron lm MS'in erken dönemlerinden itibaren görülen bulgudur. Henüz subklinik evre olan, demyelinize plakların oluşumunun MRG'de gözlenmediği hastalarda, klinik bulgu vermese dahi ilerleyen progresyonun gösterilebilmesi için biyobelirteçlerin kullanılması hastalara erken müdahale etme şansını doğuracaktır. **Erken dönemde**, aksonal hasarın derecesi en net şekilde **biyobelirteçlerle** saptanabilecektir. **Bu yüzden erken aşamalarda aksonal hasarın kolay ve güvenilir şekilde kanda tespiti ile koruyucu tedavi rejimlerine geçilerek hastalığın ilerleme hızı azaltılabilecektir** (90). Bu tespit için de SIMOA yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

NMOSB hastalıklarının fizyopatolojisi oldukça komplekstir. Bu hastalıklar grubunun fizyopatolojisinin karışık olması hedefe yönelik tedavilerin de geliştirilememesine yol açmaktadır. Hem hastalığın fizyopatolojisini net olarak tanımlayabilmek için hem de hedefe yönelik tedavi rejimlerinin geliştirilip hastalık hasarını minimuma indirmek için biyobelirteç araştırmalarının devam etmesi bu hastalık grupları için büyük gerekliliktir (134).

BOS/serum albümin oranının gösterilmesi KBB'nin geçirgenliğinin bozulduğunu göstermek için oldukça sensitif bir testtir. Tomizawa ve arkadaşları tanı aşamasında MS, NMO ayırımını yapabilecek en iyi belirteçlerden birisinin BOS/serum albümin oranı olduğunu göstermişlerdir (135). Bizim alışmamızda ise numunelerin alındığı anda sadece bazı MS hastalarının BOS'u olduğu için bu

hastalarda ki BOS/serum albümin oranı yeterli sayıya ulaşamadığı için değerlendirilememiştir.

MS tanısı, ayırıcı tanıya giren diğer hastalıkların dışlanması ile konulmaktadır. Klinik değerlendirme ve MRG tanı koyma sürecinde anahtar rol oynar. Fakat hastalığın erken dönemlerinde MRG düşük spesifiteye sahiptir BOS ve kan , MRG'a ek olarak devam eden patolojik süreçleri aydınlatmada kolay ulaşılabilen, dinamik ve fiyat biyobelirteçler için araştırılmaktadır. Birkaç dekat önce BOS-spesifik IgG oligoklonal bantların MS için sensitif biyobelirteç olarak keşfi ile beraber kliniğe uyarlanmış ve başka biyobelirteç araştırılmaları için teşvik edici bir gelişme olmuştur(136)

6. SONUÇ

2004 yılındaki keşfinden beri, Serum AQP4-IgG NMO için yüksek spesifite gösteren bir biyobelirteç olarak ortaya çıkmış; MS'den patofizyolojik olarak farklı olan bu hastalığı ayırabilmek için kullanılmaya başlanmıştır. MS'in klinik heterojenitesi ve ilişkili demyelinizan hastalıklar hakkında bilgilerimiz artarken, hastalığı **alttiplerine ayırabilecek** ve **prognozu** gösterebilecek objektif belirteçlere ihtiyaç artmaktadır. Klinik talepler doğrultusunda, MS biyobelirteç araştırmaları artmakta ve bununla ilgili literatür bilgileri gittikçe büyümektedir. Bu biyobelirteçlerin klinik pratiğe uyarlanması zaman alan bir süreçtir (76).

MS hastalık patogenezi sonucunda geri döndürülebilir fokal nörolojik semptomlar veya progresif kötüleşme görülebilmektedir. Risk faktörlerini ve patojenik mekanizmaları anlayabilmemiz tedavi stratejilerini geliştirmeden, yeni biyobelirteçlere kadar bir dizi gelişmeyi beraberinde getirebilir (15).

Hastalık fizyopatolojisinde rolleri henüz net olmayan biyobelirteçlerin araştırılması ile beraber hastalığı anlamamız ve yönetmemiz kolaylaşacaktır. Aynı zamanda bu biyobelirteçlerin hedef molekül olarak tedavi stratejilerinde kullanılması progresif olan hastalıkların ilerleme hızlarını yavaşlatabilecektir.

MS progresif seyreden kronik bir hastalıktır. Hastalıktaki ilerlemeyi durduracak tedavi rejimi henüz keşfedilmemiştir. Hastalardaki progresyonu önceden gösterebilecek, prognozu öngörebilecek biyobelirteçler hastalık

yönetimini kolaylaştıracaktır. Sadece biyobelirteçlerin tek başlarına bu progresyonu göstermeleri mümkün değildir. MRG gibi görüntüleme yöntemleri ile biyobelirteçler kombine kullanılmalıdır.

NMOSBH ciddi komplikasyonları olabilen, başlangıç semptomları ile MS ile sıklıkla karışabilen nöroinflamatuvar hastalıktır. Yanlışlıkla bu hastalıklara MS tanısı konulup MS'e özgü tedavilerin verilmeye başlanması ile hastalıkta ciddi kötüleşmeler yaşanabilmektedir. Başlangıçtan itibaren bu iki hastalık arasında ayırım yapabilen güçlü biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. **Her ne kadar anti-AQP4 ve anti-MOG gibi spesifik biyobelirteçler olmasına rağmen çifte seronegatif hastaları MS'den ayırabilecek bir biyobelirteç halen bulunamamıştır.**

Beyin parankiminde gerçekleşen patolojik olayların en iyi göstergesi BOS olmasına rağmen, tekrarlayan LP işlemleri invaziv süreçler olduğu için bu durum hasta için zor ve zahmetli işlemler haline gelmektedir. Bu yüzden minimal invaziv metotla hastalardan tekrarlayan kan örnekleri ile bakılabilecek biyobelirteçler hastalığın takibini kolaylaştırabilecek, LP'nin verdiği rahatsızlığı ortadan kaldıracaktır. Bu yüzden kan biyobelirteçleri ile ilgili araştırmalar takibi ve prognozu göstermenin değerli olduğu bu hastalıklarda çok önemlidir.

NFL etyolojiden bağımsız olarak aksonal hasarı gösteren hücre iskeleti elemanlarıdır. NFL aksonal hasarla önce BOS'a ardından kana geçer. Bu proteinlerin her hasta vizitinde düzeylerinin ölçülmesi hastaların anlık durumunu

değerlendirebilmemizi sağlayacaktır. Özellikle tedavi rejimlerine göre farklı düzeylerde bulduğumuz NFL'ler tedavi etkinliğini takip etmede önemli bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir.

Nörodejeneratif hastalıklarda aksonal hasar belirteçleri araştırmaları büyük bir hızda devam ederken, glial belirteçler gözardı edilmektedir. Oysa ki aksonal hasar sonucunda aktiflenen astrositler reaktif astrogliazis denilen bir sürece girmektedir. Bu süreç sonunda astrosit ara filamanı olan GFAP özellikle BOS'a daha az oranda da kana salınmaktadır. GFAP normal şartlarda SSS dışında bulunmayan beyine yüksek özgüllük gösteren bir proteindir. SSS'de GFAP artışına yol açacak bir uyarı sonucunda önce BOS'da daha düşük oranlarda kanda tespit edilmiştir. AQP4+ NMOSB'da astrosit hasarı ön plandadır ve bu yüzden bu hastalık astrositopati olarak değerlendirilmektedir. Astrosit hasarı sonucu salınan GFAP hem bu hastalıkların ciddiyetini hem de çifte seronegatif hastalıkları birbirinden ayırt etmek için kullanılabilir.

Kan hacim olarak BOS'un yaklaşık 30-35 katıdır. Bu sebepten ötürü kana geçen BOS biyobelirteçleri hacimsel olarak dilusyona uğrarlar. Kanda bu biyobelirteçlerin hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti için 4. nesil immünassay (SIMOA) geliştirilmiştir. İmmün blotlama ve ELİZA gibi sensitivitesi düşük analiz metotları ile tespit edilemeyen biyobelirteçler hassasiyeti yüksek bu metot ile tespit edilmektedir. BOS ve serumda ciddi oranda düzeylerini farklı bulduğumuz GFAP'ın SIMOA metodu ile daha hassas bir şekilde miktar tayini yapılabilir.

Nöroinflamasyonu gösteren interlökinler gibi biyobelirteçlerin hastalık patogenezinde rolleri gösterilmiştir. Biyobelirteç araştırmalarında patogeneizde rolleri gösterilmiş olan veya patogeneizde aday belirteçler araştırma yaptığımız biyobelirteçler için destek görevi görecektir. İL-6'nın özellikle sağlıklı kontroller ile hasta gruplarını ayırmada hassasiyet gösterdiğini çalışmamızda göstermiş durumdayız. İlerleyen çalışmalarda İL-6'nın bu hastalıklarda ki rolü daha detaylı araştırılmalıdır.

Aksonal rejenerasyonu gösteren GAP-43 oluşan hasarın ne derecede gerilediğini gösterebilecek, verilen tedavilerin etkinliğini takip etmemize yardımcı olabilecektir. Özellikle relaps sayısı fazla olan hastalarda relaps sayısı ile GAP-43 seviyelerinin korele olması artan relapslar ile birlikte rejenerasyonun da arttığını bu durumun da dolaylı olarak GAP-43 ile gösterilebileceğini ortaya koymuştur. GAP-43'ün bu rolü daha başka çalışmalarla da desteklenmelidir.

NFL hakkında yapılan prospektif çalışmalar aynı hastanın uzun süreler takibine ait bilgiler içerdiği için çok daha değerlidir. Bu yüzden bu çalışma sonrası önceliğimiz; biyobelirteç analizlerini yapmış olduğumuz hastaların uzun süreli takibini yaparak bu hastalardaki progresyonu öngörebilmek, MRG ile hastalık progresyonunu karşılaştırmak, verilen immünmodülatör tedaviler ile biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi aynı hasta numunesinde değerlendirmek olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Chastain EM, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunological reviews*. 2012;245(1):227-38.
2. Wandinger K-P, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H-J, et al. Association between clinical disease activity and Epstein–Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000;55(2):178-84.
3. Ransohoff RM, Schafer D, Vincent A, Blachère NE, Bar-Or A. Neuroinflammation: ways in which the immune system affects the brain. *Neurotherapeutics*. 2015;12(4):896-909.
4. Golumbek P, editor *Pharmacologic agents for pediatric neuroimmune disorders*. *Seminars in pediatric neurology*; 2010: Elsevier.
5. Lehmann-Horn K, Kronsbein HC, Weber MS. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2013;6(3):161-73.
6. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet*. 2016;388(10053):1459-544.

7. von Büdingen HC, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M, Goebels N. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *European journal of immunology*. 2008;38(7):2014-23.
8. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis [seminar]. *Lancet*. 2008;9648:1502-17.
9. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
10. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545.
11. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(4):246.
12. Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature medicine*. 1997;3(10):1133.
13. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews neuroscience*. 2008;9(1):46.
14. Hedström AK, Åkerstedt T, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2011;70(5):733-41.

15. Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2019;25(3):596-610.
16. Dobson R, Giovannoni G. Autoimmune disease in people with multiple sclerosis and their relatives: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology*. 2013;260(5):1272-85.
17. Wootla B, Eriguchi M, Rodriguez M. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune diseases*. 2012;2012.
18. Rodriguez M. Have we finally identified an autoimmune demyelinating disease? *Annals of neurology*. 2009;66(5):572-3.
19. Cortese M, Riise T, Bjørnevik K, Bhan A, Farbu E, Grytten N, et al. Preclinical disease activity in multiple sclerosis: a prospective study of cognitive performance prior to first symptom. *Annals of neurology*. 2016;80(4):616-24.
20. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(2):183-93.
21. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2012;7:185-217.
22. Chard D, Griffin C, Parker G, Kapoor R, Thompson A, Miller D. Brain atrophy in clinically early relapsing–remitting multiple sclerosis. *Brain*. 2002;125(2):327-37.

23. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(5):1175-89.
24. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(9):2755-71.
25. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):206.
26. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337.
27. Abdelhak A, Weber MS, Tumani H. Primary progressive multiple sclerosis: putting together the puzzle. *Frontiers in neurology*. 2017;8:234.
28. Abdelhak A, Hottenrott T, Morenas E, Suárez-Calvet M, Zettl UK, Haass C, et al. Glial activation markers in CSF and serum from patients with primary progressive multiple sclerosis: potential of serum GFAP as disease severity marker? *Frontiers in Neurology*. 2019;10:280.
29. Sormani MP, Bruzzi P. MRI lesions as a surrogate for relapses in multiple sclerosis: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet Neurology*. 2013;12(7):669-76.

30. Upadhyay RK. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *BioMed research international*. 2014;2014.
31. Spuch C, Navarro C. Transport mechanisms at the blood-cerebrospinal-fluid barrier: role of megalin (LRP2). *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 2010;4(3):190-205.
32. Loch-Neckel G, Koepp J. The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system. *Rev Neurol*. 2010;51(3):165-74.
33. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramirez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *Archives of medical research*. 2014;45(8):687-97.
34. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(9):623.
35. Dodelet-Devillers A, Cayrol R, van Horssen J, Haqqani AS, de Vries HE, Engelhardt B, et al. Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood–brain barrier. *Journal of molecular medicine*. 2009;87(8):765-74.
36. Münzel EJ, Williams A. Promoting remyelination in multiple sclerosis—recent advances. *Drugs*. 2013;73(18):2017-29.
37. Cramer SP, Simonsen H, Frederiksen J, Rostrup E, Larsson HBW. Abnormal blood–brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *NeuroImage: Clinical*. 2014;4:182-9.

38. Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science*. 1995;269(5223):549-52.
39. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood–brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS letters*. 2011;585(23):3770-80.
40. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):899-910.
41. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. *Journal of neural transmission*. 2006;113(4):477-85.
42. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
43. Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, Kuenz B, Hauser A, Berger T, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain*. 2008;131(11):3072-80.
44. Graber DJ, Levy M, Kerr D, Wade WF. Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5(1):22.
45. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *Journal of neuroinflammation*. 2013;10(1):797.
46. Chang VT, Chang HM. Recent Advances in the Understanding of the Pathophysiology of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2019.

47. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *The Lancet Neurology*. 2007;6(9):805-15.
48. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(9):3701-6.
49. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet*. 2004;364(9451):2106-12.
50. Hinson S, McKeon A, Lennon VA. Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4. *Neuroscience*. 2010;168(4):1009-18.
51. Pittock SJ, Lennon VA, De Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, et al. Neuromyelitis optica and non-organ-specific autoimmunity. *Archives of neurology*. 2008;65(1):78-83.
52. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman A. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;286(2):C426-C32.
53. Matiello M, Schaefer-Klein J, Sun D, Weinshenker BG. Aquaporin 4 expression and tissue susceptibility to neuromyelitis optica. *JAMA neurology*. 2013;70(9):1118-25.

54. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: role of aquaporins. *TRENDS in Neurosciences*. 2008;31(1):37-43.
55. Lana-Peixoto MA, Callegaro D. The expanded spectrum of neuromyelitis optica: evidences for a new definition. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2012;70(10):807-13.
56. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010;58(9):1094-103.
57. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman A, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(4):473-7.
58. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Ruprecht K, Ringelstein M, Bergamaschi R, et al. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. *Journal of the neurological sciences*. 2011;306(1-2):82-90.
59. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nature Reviews Neurology*. 2008;4(4):202.
60. Uchida T, Mori M, Uzawa A, Masuda H, Muto M, Ohtani R, et al. Increased cerebrospinal fluid metalloproteinase-2 and interleukin-6 are associated with albumin quotient in neuromyelitis optica: their possible role on blood–brain barrier disruption. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;23(8):1072-84.

61. Vincent T, Saikali P, Cayrol R, Roth AD, Bar-Or A, Prat A, et al. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *The Journal of Immunology*. 2008;181(8):5730-7.
62. Wasseff SK, Scherer SS. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte: astrocyte and oligodendrocyte: oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiology of disease*. 2011;42(3):506-13.
63. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain*. 2002;125(7):1450-61.
64. Ratelade J, Verkman A. Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(9):1519-30.
65. Takeshita Y, Obermeier B, Cotleur AC, Spampinato SF, Shimizu F, Yamamoto E, et al. Effects of neuromyelitis optica-IgG at the blood-brain barrier in vitro. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2017;4(1):e311.
66. Yang X, Ransom BR, Ma J-F. The role of AQP4 in neuromyelitis optica: more answers, more questions. *Journal of neuroimmunology*. 2016;298:63-70.
67. Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(11):2473-81.

68. Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, Borisow N, Asgari N, Pitarokoili K, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13(1):279.
69. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF. Comparative immunopathogenesis of acute disseminated encephalomyelitis, neuromyelitis optica, and multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*. 2007;20(3):343-50.
70. Ramanathan S, Dale RC, Brilot F. Anti-MOG antibody: the history, clinical phenotype, and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(4):307-24.
71. Waters P, McKeon A, Leite M, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. 2012;78(9):665-71.
72. Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018:a029058.
73. Shi M, Caudle WM, Zhang J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiology of disease*. 2009;35(2):157-64.
74. Teunissen C, Koel-Simmelink M, Pham T, Knol J, Khalil M, Trentini A, et al. Identification of biomarkers for diagnosis and progression of MS by MALDI-TOF mass spectrometry. *Multiple Sclerosis Journal*. 2011;17(7):838-50.

75. Tumani H, Hartung H-P, Hemmer B, Teunissen C, Deisenhammer F, Giovannoni G, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*. 2009;35(2):117-27.
76. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis—the long road to clinical application. *Nature Reviews Neurology*. 2015;11(10):585.
77. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2006;44(6):750-9.
78. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain research*. 2015;1600:17-31.
79. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*. 2011;128(6):309-16.
80. Teunissen CE, Tumani H, Engelborghs S, Mollenhauer B. Biobanking of CSF: international standardization to optimize biomarker development. *Clinical biochemistry*. 2014;47(4-5):288-92.
81. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus N, Giovannoni G, Rauer S, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *European journal of neurology*. 2006;13(9):913-22.
82. Teunissen C, Petzold A, Bennett J, Berven F, Brundin L, Comabella M, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*. 2009;73(22):1914-22.

83. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1254.
84. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;74(1):1-13.
85. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. CC chemokine receptor 6-regulated entry of T H-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology*. 2009;10(5):514.
86. Bar-Or A, editor *The immunology of multiple sclerosis. Seminars in neurology*; 2008: © Thieme Medical Publishers.
87. Vojdani A, Lambert J. The role of Th17 in neuroimmune disorders: target for CAM therapy. Part I. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011.
88. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(16):5490-4.
89. West PK, Viengkhoul B, Campbell IL, Hofer MJ. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. *Glia*. 2019.

90. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical immunology*. 2012;142(1):2-8.
91. Wang H, Dai Y, Qiu W, Lu Z, Peng F, Wang Y, et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2011;18(10):1313-7.
92. Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia*. 2009;57(12):1251-64.
93. Cabezas R, Ávila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM, et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:211.
94. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*. 2015;32:121-30.
95. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist*. 2005;11(5):400-7.
96. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari H-M, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):1763-71.
97. Middeldorp J, Boer K, Sluijs JA, De Filippis L, Encha-Razavi F, Vescovi AL, et al. GFAP δ in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex. *Development*. 2010;137(2):313-21.

98. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences*. 2015;38(6):364-74.
99. Bir SC, Chernyshev OY, Minagar A. Roles of Macrophages and Astrocytes in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Neuroinflammation*: Elsevier; 2018. p. 517-28.
100. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14(10):577-89.
101. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: structure and assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016;8(11):a018242.
102. Madeddu R, Farace C, Tolu P, Solinas G, Asara Y, Sotgiu MA, et al. Cytoskeletal proteins in the cerebrospinal fluid as biomarker of multiple sclerosis. *Neurological sciences*. 2013;34(2):181-6.
103. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012;18(5):552-6.
104. Beck R, Deek J, Safinya CR. Structures and interactions in ‘bottlebrush’ neurofilaments: the role of charged disordered proteins in forming hydrogel networks. Portland Press Limited; 2012.
105. Yuan A, Rao MV, Nixon RA. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(4):a018309.

106. Abdelhak A, Junker A, Brettschneider J, Kassubek J, Ludolph A, Otto M, et al. Brain-specific cytoskeletal damage markers in cerebrospinal fluid: is there a common pattern between amyotrophic lateral sclerosis and primary progressive multiple sclerosis? *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8):17565-88.
107. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2019;90(8):870-81.
108. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 2018;141(8):2382-91.
109. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *Journal of the neurological sciences*. 1994;122(2):189-203.
110. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2017;81(6):857-70.
111. Rocca MA, Battaglini M, Benedict RH, De Stefano N, Geurts JJ, Henry RG, et al. Brain MRI atrophy quantification in MS: from methods to clinical application. *Neurology*. 2017;88(4):403-13.

112. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology*. 2019;92(10):e1007-e15.
113. Giovannoni G. Peripheral blood neurofilament light chain levels: the neurologist's C-reactive protein? *Brain*. 2018;141(8):2235-7.
114. Rittling S, Singh R. Osteopontin in immune-mediated diseases. *Journal of dental research*. 2015;94(12):1638-45.
115. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*. 2001;294(5547):1731-5.
116. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature immunology*. 2007;8(1):74.
117. Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2008;181(11):7480-8.
118. Shimizu Y, Ota K, Ikeguchi R, Kubo S, Kabasawa C, Uchiyama S. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Journal of neuroimmunology*. 2013;263(1-2):148-51.

119. Gnanapavan S, Yousaf N, Heywood W, Grant D, Mills K, Chernajovsky Y, et al. Growth associated protein (GAP-43): Cloning and the development of a sensitive ELISA for neurological disorders. *Journal of neuroimmunology*. 2014;276(1-2):18-23.
120. Rot U, Sandelius Å, Emeršič A, Zetterberg H, Blennow K. Cerebrospinal fluid GAP-43 in early multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal—Experimental, Translational and Clinical*. 2018;4(3):2055217318792931.
121. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177-89.
122. Hyun J-W, Kim Y, Kim G, Kim S-H, Kim HJ. Longitudinal analysis of serum neurofilament light chain: A potential therapeutic monitoring biomarker for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019:1352458519840757.
123. Piehl F, Kockum I, Khademi M, Blennow K, Lycke J, Zetterberg H, et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018;24(8):1046-54.
124. Petzold A, Altintas A, Andreoni L, Bartos A, Berthele A, Blankenstein MA, et al. Neurofilament ELISA validation. *Journal of immunological methods*. 2010;352(1-2):23-31.

125. Mattsson N, Cullen NC, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K. Association between longitudinal plasma neurofilament light and neurodegeneration in patients with Alzheimer disease. *JAMA neurology*. 2019.
126. Drmanac R, Callow MJ, Drmanac S, Hauser BK, Yeung G. Single molecule arrays for genetic and chemical analysis. Google Patents; 2013.
127. de Flon P, Laurell K, Sundström P, Blennow K, Söderström L, Zetterberg H, et al. Comparison of plasma and cerebrospinal fluid neurofilament light in a multiple sclerosis trial. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2019;139(5):462-8.
128. Leppert D, Kuhle J. Serum NfL levels should be used to monitor multiple sclerosis evolution–Yes. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;1352458519872921.
129. Myhr K-M, Torkildsen Ø. Serum NFL levels should be used to monitor multiple sclerosis evolution–No. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;1352458519872891.
130. Chen Y-C, Yang X, Miao L, Liu Z-G, Li W, Zhao Z-X, et al. Serum level of interleukin-6 in Chinese patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2012;249(1-2):109-11.
131. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in immunology*. 2012;33(11):571-7.
132. Araki M, Aranami T, Matsuoka T, Nakamura M, Miyake S, Yamamura T. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Modern rheumatology*. 2013;23(4):827-31.

133. Wen S-R, Liu G-J, Feng R-N, Gong F-C, Zhong H, Duan S-R, et al. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*. 2012;244(1-2):94-6.
134. Fujihara K. Neuromyelitis optica spectrum disorders: still evolving and broadening. *Current opinion in neurology*. 2019;32(3):385-94.
135. Tomizawa Y, Yokoyama K, Saiki S, Takahashi T, Matsuoka J, Hattori N. Blood—brain barrier disruption is more severe in neuromyelitis optica than in multiple sclerosis and correlates with clinical disability. *Journal of International Medical Research*. 2012;40(4):1483-91.
136. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stüve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9(5):267.

8. ÖZET

MULTİPLE SKLEROZ ve NÖROMYELITİS OPTİKA SPEKTRUM BOZUKLUKLARI HASTALARINDA NÖRODEJENERASYON, AKSONAL HASAR, ASTROSİT AKTİVASYONU ve İNFLAMASYONLA İLGİLİ BELİRTEÇLERİN VÜCUT SIVILARINDA İNCELENMESİ

Santral Sinir Sistemi(SSS)’nin nöroinflamatuvar hastalıkları başlangıçta hastalığa özgü olmayan klinik bulguları ile birbirleri ile sıklıkla karışan hastalıklardır. Bu hastalıklara tanı koymak için öncelikle klinik bulguların eşliğinde bu hastalıkların ayırıcı tanısını yapmak, tanıya yardımcı olması için görüntüleme yöntemleri ve bazı kan testlerine başvurmak gerekmektedir.

Multiple Skleroz(MS) kronik, nörodegeneratif, nöroinflamatuvar Santral Sinir Sistemi hastalığıdır. İlerleyici olan bu hastalığın tanısını koymada, verilen immünmodülatör tedavinin etkinliğini izlemede, engellilik oranının ne derecede ve ne sürede artabileceğini öngörmeye klinik ve teknik validasyonu yapılmış biyobelirteç bulunmamaktadır.

Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalıkları(NMOSB), MS’in ayırıcı tanısına giren ve klinik özellikleri ile bu hastalık ile karışabilen hastalıklar grubudur. Bu iki hastalığın tanı anında özellikle de aquaporin-4 ve myelin oligodendrosit glikoprotein antikorları negatif olanlar da ayırımını yapabilecek bir biyobelirteç bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile aday biyobelirteçler olan Nörofilaman Hafif Zincirleri(NFL), Glial Fibriler Asidik Protein(GFAP) ve hastalık fizyopatolojinde önemli yerleri

olduğu iddia edilen İnterlökın-6(İL-6), Osteopontin, Growth-Associated Protein 43(GAP-43) düzeyleri MS,NMOSB ve sağlıklı kontrol gruplarında analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Biyobelirteç analizlerine ilaveten bazı klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları retrospektif olarak incelenip biyobelirteçler ile birlikte değerlendirilmiştir. Biyobelirteç analizleri için Western Blot, ELİZA ve elektrokemilüminesan yöntemler kullanılmıştır. Serum ve Beyin Omurilik Sıvısı(BOS) örneklerinde analizler ayrı ayrı gerçekteştirilip bunlara ait bulgular değerlendirilmiştir.

Serum ve BOS İL-6, NFL, GFAP değerleri sağlıklı kontrollere göre hasta gruplarında anlamlı olarak artmıştır. Serum ve BOS biyobelirteçleri arasında anlamlı olarak farklılıklar bulunmuştur. İmmünmodölatör tedavi alanlarda NFL seviyeleri almayanlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Hastalık ciddiyeti göstergesi olan Expanded Disability Status Scale(EDSS) skoru ile biyobelirteçler arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur.

İL-6 ve NFL'nin MS ve NFL'yi başlangıç aşamasında birbirinden ayırabildiği, özellikle bu biyobelirteçlerin immünmodölatör tedavi alan hastalarda tedavi takibinde kullanılabileceği gösterilmiştir. NFL'nin daha güvenilir ölçümleri için sensitif bir metot olan Single Molecule Array(SIMOA)'de yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

9. ABSTRACT

INVESTIGATION of MARKERS RELATED to NEURODEGENERATION, AXONAL DAMAGE, ASTROCYTE ACTIVATION and INFLAMMATION in PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS and NEUROMYELITIS OPTICA SPECTRUM DISORDERS

Neuroinflammatory diseases of the central nervous system (CNS) are often confused with the clinical findings that are not specific to the disease. In order to diagnose these diseases, first of all, it is necessary to make the differential diagnoses of these diseases with the help of clinical findings, and imaging methods and some blood tests should be applied to help diagnosis.

Multiple Sclerosis(MS) is a chronic, neurodegenerative, neuroinflammatory Central Nervous System disease. There are no clinical and technical validated biomarkers in diagnosing this progressive disease, monitoring the effectiveness of immunomodulatory therapy, and predicting the extent and duration of the disability.

Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders (NMOSD) is a group of diseases that can be confused with MS due to its clinical features. There is no biomarker that can distinguish these two diseases at the time of diagnosis, especially those with negative aquaporin-4 and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies.

The aim of this study was to analyze the candidate biomarkers Neurofilament Light Chain(NFL), Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP) and Interleukin-6(IL-6), Osteopontin, Growth-Associated Protein 43(GAP-43) which are claimed to have

an important place in disease pathophysiology, in MS NMOSB and healthy control groups.

In addition to biomarker analysis, some clinical, radiological and laboratory findings were reviewed retrospectively and evaluated with biomarkers. Western blot, ELISA and electrochemiluminescent methods were used for biomarker analysis. Serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples were analyzed separately and their findings were evaluated.

Serum and CSF IL-6, NFL, GFAP values were significantly increased in patient groups compared to healthy controls. Significant differences were found between serum and CSF biomarkers. NFL levels were significantly lower in patients receiving immunomodulatory therapy compared to those who did not. A significant correlation was found between the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and the biomarkers.

It has been shown that IL-6 and NFL can differentiate MS and NMOSD from each other in the initial stage, especially those biomarkers can be used in the treatment follow-up in patients receiving immunomodulatory therapy. Studies on the Single Molecule Array (SIMOA), a sensitive method for more reliable measurements of NFL, are needed.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Burak

Soyadı: Arslan

Doğum Yeri ve Tarihi:

Eğitimi: 2007-2014: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

2015-2019: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Biyokimya Derneği

Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Ödüller:

1. Güven Hastanesi XI. Dr. Aysun – Ahmet Küçükkel Tıp Ödülleri, Genç Araştırmacı Proje Destek Ödülü, 14 Mart 2019
2. En İyi Bildiri 3.lük Ödülü; Klinik Biyokimya Laboratuvarında Çalışılan Parametrelerin Referans Değişim Değerleri; Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Uluslararası Katılımlı Kongre & Lab Expo 2018; P-21; Yılmaz NS, Şen B, Arslan B, Narlı B, Afandiyeva N, Gülbahar Ö, Yılmaz Demirtaş C, Elbeg Ş

Katıldığı Bilimsel Toplantılar:

1. Türk Biyokimya Derneği, 27.Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Kasım 2015, ANTALYA

2. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Preanalitik Evre Sempozyumu, 25-26 Mart 2016, BOLU
3. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslararası Katılımlı Kongre LAB EXPO 2017, 1-5 Ekim 2017, ANTALYA
4. III. Türkiye in vitro Diyagnostik (IVD) Sempozyumu Endokrin ve Metabolik Hastalıklar Tanıdan Tedaviye Biyobelirteçler 28 Şubat - 2 Mart 2018 İzmir
5. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Preanalitik Evre Sempozyumu, 23-24 Mart 2018, Eskişehir
6. Türk Biyokimya Derneği, Preanalitik Sempozyumu ,28 Nisan 2018, Kayseri
7. XXXVI Nordic Congress in Clinical Chemistry “Information beyond numbers” 12-15 June 2018, Helsinki, Finland
8. 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, July 7-12, 2018, Prague, Czech Republic
9. Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu, 10-14 Eylül 2018, Ankara
10. 5th EFLM-UEMS European Joint Congress in Laboratory Medicine October 10-13, 2018, Antalya, Turkey.
11. Tbd Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 29. Ulusal Biyokimya Kongresi 26-30 Ekim 2018, Muğla
12. Laboratuvarcılar İçin Araştırma Teknikleri ve Uygulamalı İstatistik Kursu, 1-2 Şubat 2019, Ankara

13. 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 19-23 May, Barcelona, Spain

Eserler:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Kahraman Seda, Eroğlu Altınova Alev, Yalçın Mehmet Muhittin, Gülbahar Özlem, Arslan Burak, Aktürk Müjde Yaşım, Çakır Nuri, Törüner Füsün Saadet (2018). Association of serum betatrophin with fibroblast growth factor-21 in women with polycystic ovary syndrome. Journal of Endocrinological Investigation, 41(9), 1069-1074., Doi: 10.1007/s40618-018-0831-2 (Yayın No: 4785132)
2. Guney, E., Buyuktaskin, D., Torun, Y. T., Arslan, B., Gulbahar, O., Ozaslan, A., et al. (2019). Increased serum thioredoxin levels are not correlated with executive functions in children with attention deficit hyperactivity disorder. Neuroscience letters, 705, 118-123.
3. Eryilmaz, S., Turkyilmaz, Z., Karabulut, R., Gulburun, M. A., Poyraz, A., Gulbahar, O., et al. (2019). The effects of hydrogen-rich saline solution on intestinal anastomosis performed after intestinal ischemia reperfusion injury. Journal of pediatric surgery.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel (2019). Serbest Deoksiribonükleik Asit Analizinde Preanalitik Aşamanın Önemi. Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi(Kabul edidi).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1. B. Arslan, N.Afandiyeva, C.Yılmaz, A.İnci, Congenital Analbuminemia Caused By A Substantial Aberrant Splicing İn The Albumin Gene, Clinica Chimica Acta 493 (2019) S199–S259
2. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Elbeg Şehri,Yılmaz-Demirtaş Canan,Gülbahar Özlem (2018). Asemptomatik Kişilerde Hb Varyant Analizinin Önemi: Hb D-Punjab. Türk Biyokimya Derneği Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4734271)
3. Yılmaz Niyazi Samet,Şen Bayram,Arslan Burak,Gülbahar Özlem (2018). Seri Reflektif Testler İle Bilirubin İnterferansından Waldenström Makroglobulinemisi Tanısına. Türk Biyokimya Derneği Uluslararası Biyokimya Kongresi - 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4662018)
4. Arslan Burak,Gülbahar Özlem,Yılmaz Niyazi Samet,Bolayır Başak (2018). A Different Approach To The Differential Diagnosis Of Hyperinsulinemic Hypoglycemia: Endogenous Hyperinsulinemiaor Interference?. 5th Eflm-

- Uems European Joint Congressin Laboratory Medicine (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4662005)
5. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Afandiyeva Nigar,Narlı Belkıs,Elbeg Şehri,Yılmaz-Demirtaş Canan,Gülbahar Özlem (2018). How Should We Assess The Glycemic Status In People With Hemolytic Anemia?. 5th Eflm-Uems European Joint Congressin Laboratory Medicine (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4662001)
 6. Yılmaz Niyazi Samet,Gülbahar Özlem,Arslan Burak,Şen Bayram,Eroğlu Altınova Alev,Törüner Füsun Saadet (2018). A Ft3 Interference Detected By Means Of Active Laboratory-Physician Communication. 5th Eflm-Uems European Joint Congressin Laboratory Medicine (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4661977)
 7. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Şen Bayram,Yılmaz-Demirtaş Canan,Kayhan Gülsüm,Pınar Aslı,Bal Topçu Dilara (2018). A Heterozygous Mutation Nm_000518_C.7c T (P.His3tyr) In Exon 1 In The Hbb Gene Causing Hba1c İnterference: Hb Fukuoka. Febs Open Bio, 8(Null), 268-268. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4662009)
 8. Arslan Burak,Sepici Dinçel Aylin (2018). Evaluation Of Il-34 As A Biomarker In Multiple Sclerosis?. Xxxvi Nordic Congress In Clinical Chemistry “Information Beyond Numbers” (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4733923)
 9. Şen Bayram,Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Gülbahar Özlem,Yılmaz-Demirtaş Canan,Elbeg Şehri (2017). Manuel Mikroskopik İnceleme İle

Otomatik İdrar Analizörlerinin (İq200 İle Fus200) Karşılaştırılması. Kbud Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3955746)

10. Şen Bayram, Arslan Burak, Yılmaz Niyazi Samet, Gülbahar Özlem, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). Manuel Mikroskopik İnceleme İle Otomatik İdrar Analizörlerinin (İq200 İle Fus200) Karşılaştırılması. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo 2017 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3994223)
11. Arslan Burak, Şen Bayram, Yılmaz Niyazi Samet, Gülbahar Özlem, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). Manuel Mikroskopik İnceleme İle Iris İq200elite Ve Longx Lx-8000 otomatik İdrar Otoanalizörlerinin Analitik Performanslarının Karşılaştırılması. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo 2017 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4002873)
12. Arslan Burak, Şen Bayram, Yılmaz Niyazi Samet, Gülbahar Özlem, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). Manuel Mikroskopik İnceleme İle Iris İq200 Elşite Ve Longx Lx-8000r Otomatik İdrar Analizörlerinin Analitik Performanslarının Karşılaştırılması. Kbud Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3955618)
13. Yılmaz-Demirtaş Canan, Arslan Burak, Narlı Belkıs, Şen Bayram, Elbeg Şehri, Gülbahar Özlem (2017). Contribution Of Automatisatıon For Leanlaboratories. Uluslar Arası Biyokimya Kakongresi 2017 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4003251)

14. Yılmaz-Demirtaş Canan, Arslan Burak, Narlı Belkıs, Şen Bayram, Elbeg Şehri, Gülbahar Özlem (2017). Otomasyonun Laboratuvarı Yalınlaşmaya Katkısı. International Biochemistry Congress – 2017 /28 Th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3955008)
15. Şen Bayram, Gülbahar Özlem, Yılmaz Niyazi Samet, Arslan Burak, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). Nadir Görülen Bir Vaka: Analbuminemi. Tkbd Kıbrıs (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4073115)
16. Gülbahar Özlem, Yılmaz Niyazi Samet, Şen Bayram, Arslan Burak, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). İki Farklı İmmünasay Metodu İle Ölçülen Siklosporin Ve Takrolimus Sonuçlarının Karşılaştırılması. Tkbd Kıbrıs (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4074038)
17. Gülbahar Özlem, Yılmaz Niyazi Samet, Şen Bayram, Arslan Burak, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). İki Farklı İmmünasay Metodu İle Ölçülen Siklosporin Ve Takrolimus Sonuçlarının Karşılaştırılması. - Türkiye Klinik Biyokimya Kongresi 04-07 Mayıs 2017 Acapulco Otel Girne Kktc (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4155966)
18. Şen Bayram, Gülbahar Özlem, Yılmaz Niyazi Samet, Arslan Burak, Yılmaz-Demirtaş Canan, Elbeg Şehri (2017). Nadir Görülen Bir Vaka Analbuminemi. Türkiye Klinik Biyokimya Kongresi 04-07 Mayıs 2017 Acapulco Otel Girne Kktc (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4155707)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Yılmaz Niyazi Samet,Şen Bayram,Arslan Burak,Narlı Belkıs,Afandiyeva Nigar,Gülbahar Özlem,Yılmaz-Demirtaş Canan,Elbeg Şehri (2018). Klinik Biyokimya Laboratuvarında Çalışılan Parametrelerin Referans Değişim Değerleri. Kbud Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4662019)
2. Özaslan Ahmet,Güney Esra,Gülbahar Özlem,Arslan Burak,Büyüktaşkın Dicle,Güveli Bozkurt Melike (2018). Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (Dehb) Olan Hastalarda Serum Heat Shock Protein (Hsp-70) Düzeylerinin Değerlendirilmesi. 28. Çocuk Ve Ergen Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4687534)

Diğer Yayınlar:

1. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Afandiyeva Nigar,Narlı Belkıs,Elbeg Şehri,Yılmaz-Demirtaş Canan,Gülbahar Özlem (2018). How Should Be. Cclm (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4787426)
2. İriz Ayşe,Şems Özkısa Rabia,Arslan Burak,Eser Burcu,Sepici Dinçel Aylin (2018). The Association Of Trytophan-. Turkish Journal Of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4764152)
3. Arslan Burak,Gülbahar Özlem,Yılmaz Niyazi Samet,Bolayır Başak (2018). A Different Approach. Cclm (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4787424)

4. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Şen Bayram,Yılmaz-Demirtaş Canan,Kayhan Gülsüm,Pınar Aslı,Topçu Bal Dilara (2018). A Heterozygous Mutation Nm_000518_C.7t(P.His3tyr) İn The Hbb Gene Causing Hba1c İnterference: Hb Fukuoka. Febs Open Bio (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4788946)
5. Arslan Burak,Yılmaz Niyazi Samet,Gülbahar Özlem,Yılmaz-Demirtaş Canan,Elbeg Şehri (2018). Aseptomatik Kişilerde Hemoglobin Varyant Analizinin Önemi. Turkish Journal Of Biochemistry (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4787361)
6. Yılmaz Niyazi Samet,Gülbahar Özlem,Arslan Burak,Şen Bayram,Eroğlu Altınova Alev,Törüner Füsün Saadet (2018). A Ft3 İnterference. Cclm (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4787453)
7. Arslan Burak,Kutluer İbrahim,Sepici Dinçel Aylin (2018). Evaluation Of Il-34. Xxxvi Nordic Congress İn Clinical Chemistry (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4763729)
8. Narlı Belkıs,Gülbahar Özlem,Şen Bayram,Arslan Burak,Demircan Ahmet,Çakmak Onur,Tatar Tolga,Yılmaz-Demirtaş Canan (2018). Comparison Of Troponin I. Cclm (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 4787937)
9. Kahraman Seda,Eroğlu Altınova Alev,Yalçın Mehmet Muhittin,Gülbahar Özlem,Arslan Burak,Aktürk Müjde Yaşım,Çakır Nuri,Törüner Füsün Saadet (2018). Association Of Serum Betatrophin With Fibroblast Growth Factor-21 İn Women With Polycystic Ovary Syndrome. The Turkish

Journal Of Endocrinology And Metabolism, 22(2), 65-65., Doi:
10.25179/Tjem.20182202-P171 (Ulusal) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın
No: 4803703)

11.EKLER

11.1 Olgu Rapor Formu

[illegible]

11.2 Araştırma Etik Kurul İzni

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu							
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara							
	TELEFON	0312 202 69 58							
	FAKS	0312 202 46 73							
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr							
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multiple Skleroz ve Nöromyelitis Optika Spektrum Bozuklukları Hastalarında Nörodejenerasyon, Aksonal Hasar, Astrosit Aktivasyonu ve İnflamasyonla İlgili Belirteçlerin Vücut Sıvılarında İncelenmesi							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Aylin SEPİCİ DİNÇEL							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Biyokimya AD. / G.Ü.T.F.							
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Uzmanlık tezi							
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21.12.2018	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐					
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	21.12.2018	1	Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐					
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒							
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐							
	DİĞER	☐							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 33	Toplantı tarihi: 14.01.2019							
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.								
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Canan ULUOĞLU							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza			
Prof. Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐				
Prof. Dr. Birol DEMİREL BAŞKAN YARD.	Adli Tıp AD.	G.Ü.T.F	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐				

Prof. Dr. Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Bülent BOYACI ÜYE	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tabbi Biyokimya A.D	G.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aşlı KURUOĞLU ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	COMMAT Ltd.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. Mutlu DOĞAN ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	Ank. Numune Eğt. ve Araşt. Hast.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. N. Arda DEMİRKAN ÜYE	Genel Cerrahi AD.	A.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. Anıl TAPISIZ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. Ç. Nör. BD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Pınar ÖZDEMİR ÜYE	Biyoistatistik AD.	H.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doktor Öğr. Üyesi Mustafa GÖKSU ÜYE	Hukukçu	A.H.B.V.Ü Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Aysel ÖZER ÜYE	Sivil Temsilci	Emekli Öğr. Üyesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

11.3 Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği

Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Hastanın Adı Soyadı: _____

Tarih: ____/____/____

Bu ölçek temel olarak Multipl Skleroz (MS) hastalarının değerlendirilmesinde kullanılır.
Sıfır normal sağlık durumunu gösterirken artan değerler hastalığın daha fazla özürlülüğe yol açtığını ifade eder.
FS (Fonksiyonel Sistem) aşağıda ikinci liste içinde yer alan durumları ifade eder.

Basamak	Açıklama
0	Normal nörolojik muayene (Bütün fonksiyonel Sistemlerde (FS) Seviye 0)
1	Özürlülük yok, bir FS' de minimal belirtiler (Seviye 1)
1,5	Özürlülük durumu olmaksızın birden fazla FS' de minimal bulgular (birden fazla FS Seviye 1)
2	Bir FS' de minimal özürlülük (Bir FS Seviye 2, diğerleri 0 veya 1)
2,5	İki FS' de minimal özürlülük (İki FS Seviye 2 diğerleri 0 veya 1)
3	Bir FS de orta derecede özürlülük (bir FS Seviye 3 diğerleri 0 veya 1) ya da üç veya dört FS' de hafif özürlülük (üç/dört FS Seviye 2, diğerleri 0 veya 1) hasta tamamen ambulatuvar
3,5	Tam ambulatuvar hasta, bir FS de orta derecede özürlülük (bir FS Seviye 3) ve bir veya iki FS Seviye 3 veya beş Seviye FS Seviye 2 (diğerleri 0 veya 1)
4	Tam ambulatuvar hasta. Bir FS' de Seviye 4 (diğerleri 0 veya 1)'den oluşan göreceli şiddetli özürlülük. Hasta günün önemli bir bölümünde yardıma ihtiyaç duymaz. Geri kalan bölümünde hafif bir desteğe gereksinim duyar. Veya önceki basamakların limitlerini aşan daha küçük seviyelerin kombinasyonları. 500 metreden daha uzun mesafeyi yardım almadan ve dinlenmeden yürüyebilir.
4,5	Günün önemli bir bölümünde yardımsız olarak tam ambulatuvar, geri kısmında minimal düzeyde yardıma gereksinim duyar. Nispeten şiddetli özürlülük söz konusudur. Genellikle bir FS Seviye 4 (diğerleri 0 veya 1) veya önceki basamakların limitlerini aşan daha küçük derecelerin kombinasyonları. Yardım almadan ve dinlenmeden 300 metre yürüyebilir.
5	Yardımsız 200 metre yürüyebilir; özürlülük tam günlük aktivitesini bozacak kadar şiddetli (özel önlem olmaksızın tam gün çalışabilme gibi). Genel olarak FS eşdeğerleri tek başına bir FS' de Seviye 5, diğerleri 0 veya 1) ya da genellikle 4. basamağın özelliklerini aşan daha küçük seviyelerin kombinasyonları.
5,5	Yardımsız veya dinlenmeksizin 100 metre yürüyebilir. Özürlülük tüm günlük aktivitelerle engel olabilecek kadar şiddetli. Genel olarak FS eşdeğerleri bir FS' de tek başına bir Seviye 5, diğerleri 0 veya 1 ya da daha önceki basamağın limitlerini aşan daha küçük derecelerin kombinasyonları.
6	Yaklaşık 100 metre dinlenerek veya dinlenmeden yürüyebilmek için aralıklı veya tek taraflı sürekli yardım (koltuk değneği, baston vb.) gerekir. Genel FS eşdeğerleri birden çok FS' de 3 veya daha fazla seviye kombinasyonu).
6,5	Dinlenmeden 200 metre yürüyebilmek için sabit iki taraflı destek (koltuk değneği, baston vb.) gerekir. Genel FS eşdeğerleri ikiden çok FS' de 3 veya daha fazla seviyede bozukluk kombinasyonları).
7	Yardımla bile 5 metrenin üzerinde yürüyemez, esasen tekerlekli sandalyeye muhtaç; Standart tekerlekli sandalyeyi sürebilir ve tek başına yer değiştirebilir; günde 12 saatini tekerlekli sandalyede geçirir (genel FS eşdeğerleri birden fazla FS' de Seviye 4+ kombinasyonlarıdır; (çok nadiren, tek başına piramidal Seviye 5).
7,5	Bir kaç adımdan fazlasını atamaz, tekerlekli sandalyeye bağımlı; yer değiştirmek için yardıma ihtiyacı olabilir; sandalyeyi sürebilir, fakat standart tekerlekli sandalyede tüm günü geçiremez, motorlu tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyabilir (genel FS eşdeğerleri birden fazla FS' de Seviye 4).
8	Esas olarak yatak veya sandalyeye bağımlı ya da tekerlekli sandalye ile hareket edebilir, fakat günün çoğunu yatak dışında geçirebilir; birçok işini kendisi görebilir; genellikle kollarını etkin kullanabilir (genel FS eşdeğerleri birçok sistemde genellikle 4+ seviyelerin kombinasyonları).
8,5	Günün büyük kısmında yatağa bağımlıdır; kolların bir miktar etkili kullanabilir. Bazı kendine bakma fonksiyonlarını devam ettirebilir. Genel FS eşdeğerleri birçok sistemde genellikle Seviye 4+ kombinasyonları.
9	Ümitsizce yatağa bağımlı; iletişim kurabilir ve yemek yiyebilir. Genel FS eşdeğerlerinin çoğu Seviye 4+ kombinasyonları).
9,5	Tamamen çaresiz yataklık; etkin iletişim kurulamaz ya da yiyemez, yutamaz. Genel FS eşdeğerleri hemen hepsi Seviye 4+ kombinasyonları).
10	MS' e bağlı ölüm.

Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği Sayfa-2

Fonksiyonel Sistemler

Seviye	Piramidal fonksiyonlar
0	Normal
1	Özürlülük olmaksızın anormal belirtiler
2	Minimal özürlülük
3	Hafif ya da orta derecede paraparezi ya da hemiparezi veya şiddetli monoparezi
4	Belirgin paraparezi ya da hemiparezi; orta derecede kuadriparezi veya monopleji
5	Parapleji, hemipleji veya belirgin kuadriparezi
V	Kuadriplejik

Seviye	Serebellar Fonksiyonlar
0	Normal
1	Özürlülük olmaksızın anormal belirtiler
2	Hafif ataksi
3	Orta derecede gövde ya da ekstremitelerde ataksisi
4	Tüm ekstremitelerde şiddetli ataksi
5	Ataksi nedeniyle koordine hareketleri yapmada yetersizlik
V	Bilinmeyen
X	Bu işaretleme kas güçsüzlüğü de testin içine karışmışsa her rakamın sonuna eklenir.

Seviye	Beyinsapı Fonksiyonları
0	Normal
1	Yalnızca bulgular
2	Orta derecede nistagmus ya da diğer hafif özürlülükler
3	Şiddetli nistagmus, belirgin ekstraoküler güç kaybı ya da diğer kranial sinirlerde orta derecede yetersizliği
4	Belirgin dizartri ya da belirgin diğer özürlülükler
5	Yutma ya da konuşma yeteneğinin kaybı
V	Bilinmeyen

Seviye	Duyusal Fonksiyonlar
0	Normal
1	Bir ya da iki ekstremitelerde vibrasyon ya da şekil çizmede azalma
2	Bir ya da iki ekstremitelerde dokunma, ağrı ya da pozisyon duygusunda hafif azalma ve/veya bir veya iki ekstremitelerde vibrasyon duygusunda orta derecede azalma veya üç ya da dört ekstremitelerde tek başına vibrasyon kusuru.
3	Bir ya da iki ekstremitelerde dokunma veya ağrı ya da pozisyon duygusunda orta derecede azalma ve/veya temel olarak vibrasyon kaybı; ya da üç-dört ekstremitelerde hafif derecede dokunma ağrı ve/veya orta derecede tüm duyu testlerinde bozukluk.
4	Bir ya da iki ekstremitelerde, tek başına veya kombine, dokunma veya ağrı duygusunda belirgin azalma ve derin duyu kaybı veya ikiden fazla ekstremitelerde orta derecede dokunma ağrı ve/veya ağır derin duyu kaybı.
5	Bir ya da iki ekstremitelerde duyu kaybı veya baş altındaki vücudun hemen tamamında dokunma veya ağrı duygusunda orta derecede azalma ve/veya derin duyu kaybı.
6	Kafa altında kalan bölümlerde temel olarak duyu kaybı
V	Bilinmeyen

Genişletilmiş Özürölülük Durum Ölçeği Sayfa-3

Seviye	Bağırsak ve Mesane Fonksiyonları (1982 revize)
0	Normal
1	İdrara başlamada hafif derecede duraklama, idrara sıkışma hissi, idrar yapamama
2	Orta derecede idrar duraklaması idrara sıkışma, barsak ve mesanede retansiyon ya da nadir idrar kaçırma
3	Sık idrar kaçırma
4	Neredeyse devamlı olarak kateterizasyon gereği
5	Mesane işlevlerinin kaybı
6	Barsak ve mesane işlevlerinin kaybı
V	Bilinmeyen

Seviye	Görsel (veyaoptik) Fonksiyonlar
0	Normal
1	Düzeltilmiş görme keskinliğinin 20/30'dan daha iyi olduğu skotom
2	Daha kötü gözde en fazla düzeltilmiş görme keskinliği 20/30 ile 20/59 arasında
3	Daha kötü gözde geniş skotom ya da görme alanlarında orta derecede azalma, fakat en fazla düzeltilmiş görme keskinliği 20/60 ile 20/99 arası
4	Daha kötü gözde görme alanlarında belirgin azalma ve en fazla düzeltilmiş görme keskinliği 20/100 ile 20/200 arasında; üçüncü dereceye ek olarak daha iyi gözün en yüksek görme keskinliği 20/60 veya daha az
5	Daha kötü gözde en fazla düzeltilmiş görme keskinliği 20/200 den az; dördüncü dereceye ek olarak daha iyi gözde en fazla görme keskinliği 20/60 veya daha az
6	Beşinci dereceye ek olarak daha iyi gözün en yüksek görme keskinliği 20/60 veya daha az
V	Bilinmeyen
X	Optik sinirde 0-6 derece arası temporal solukluk varlığında diğer derecelerin sonuna eklenir.

Seviye	Serebral (veya mental) Fonksiyonlar
0	Normal
1	Sadece duygulanımda değişiklik (GÖDÖ skorunu etkilemez)
2	Zihinsel aktivitede hafif azalma
3	Zihinsel aktivitede orta derecede azalma
4	Zihinsel aktivitede belirgin azalma (orta derecede kronik beyin sendromu)
5	Demans ya da şiddetli veya yetersiz kronik beyin sendromu
V	Bilinmeyen

Seviye	Diğer:
0	Yok
1	Multipl Skleroza bağlanabilen diğer nörolojik bulgulardan herhangi biri
V	Bilinmeyen

John F. Kurtzke, MD Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS) Neurology (Cleveland) 1983;33:1444-52

