



**MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA BAKIR VE
ÇİNKO HOMEOSTAZININ METALLOTİYONEİN
DÜZEYLERİ VE DNA HASARI İLE İLİŞKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hande YÜCE

**İnönü Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR
Ortak Tez Danışmanı: Doç. Dr. İlker ATEŞ**

Doktora Tezi-2024

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA BAKIR VE ÇİNKO
HOMEOSTAZININ METALLOTİYONEİN DÜZEYLERİ VE DNA HASARI
İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hande YÜCE

İnönü Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı

Ortak Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR

Ortak Tez Danışmanı
Doç. Dr. İlker ATEŞ

Tez Jüri Üyeleri
Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR
Doç. Dr. İlker ATEŞ
Doç. Dr. Neşe Başak TÜRKMEN
Dr. Öğr. Üyesi Fuat KARAKUŞ
Dr. Öğr. Üyesi Zübeyde TANRIVERDİ

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDK-2022/3012 Proje numarası ile ve YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs
Programı tarafından desteklenmiştir.

MALATYA
2024

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR ve ortak tez danışmanı Doç. Dr. İlker ATEŞ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Multiple Skleroz Hastalarında Bakır ve Çinko Homeostazının Metallotiyonein Düzeyleri ve DNA Hasarı ile İlişkisinin Değerlendirilmesi” başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim./..../2024

Hande YÜCE

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Multiple Skleroz	4
2.1.1. Multiple Skleroz Tarihçesi.....	4
2.1.2. Multiple Skleroz Epidemiyolojisi.....	5
2.1.3. Multiple Skleroz Etiyolojisi.....	6
2.1.4. Multiple Skleroz Patogenezi.....	7
2.1.5. Multiple Sklerozun Klinik Seyri.....	8
2.1.6. Multiple Sklerozda Tanı ve Tedavi	10
2.2. Metalotiyoneinler.....	12
2.2.1. Metalotiyoneinler ve Esansiyel Elementler	16
2.2.2. Metalotiyoneinler ve Santral Sinir Sistemi.....	17
2.2.3. Metalotiyoneinler ve Multiple Skleroz.....	18
2.3. Esansiyel Metaller ve Santral Sinir Sistemi.....	20
2.3.1. Çinko.....	20
2.3.2. Bakır.....	21
2.3.3. Esansiyel Metaller ve Multiple Skleroz Arasındaki İlişki	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Gereçler.....	23
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Numunelerin ve Verilerin Toplanması	24
3.2.2. Hasta Seçimi, Dahil Etme/Dışlama Kriterleri.....	25
3.2.3. Serum Numunelerinin Analizi	25
3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	30
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	39

4. BULGULAR.....	41
4.1. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi	41
4.1.1. Çalışmaya dahil edilen hasta bireylerin demografik özellikleri	41
4.1.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması	41
4.2. İn Vitro Analizlerin Değerlendirilmesi.....	47
4.2.1. Hücre Canlılığı Tayini	47
4.2.2. Gen Ekpresyon Analizi Sonuçları.....	49
4.2.3. Hücre Hatlarının Comet Analiz Sonuçları.....	52
5. TARTIşMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	72
EKLER.....	86
EK-1. Özgeçmiş.....	86
EK-2. Etik Kurul Belgesi.....	87

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi süresince bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan, kıymetli tecrübelerinden yararlandığım Ankara Üniversitesi ile İnönü Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma çok teşekkür ederim.

Bitmez tükenmez enerjileri, gayretleri ve gülyüzlülükleri ile bütün laboratuvar çalışmalarına, büyük bir özveri ve titizlikle tezin tüm aşamalarına katkı sağlayan çok değerli tez danışmanım Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR ve ortak tez danışmanım Doç. Dr. İlker ATEŞ' e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmamızın klinik kısmında katkısı olan Turgut Özal Tıp Merkezi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet TECELLİOĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımızda bizlere destek olan, bilgi ve imkânlarını bizimle paylaşan Prof. Dr. Süleyman SANDAL ve Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK'e teşekkür ederim.

Deneysel aşamalarda beni yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Yasemin ŞAHİN'e ve istatistiksel analizlerde destek olan Arş. Gör. Dr. Şeyma YAŞAR'a teşekkür ederim.

Doktora eğitim ve öğretimimde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Doç. Dr. Neşe BAŞAK TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, desteklerini her zaman yanımda hissettiği canım annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde katkı sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: TDK-2022/3012) ve YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs Programı'na teşekkür ederiz.

ÖZET

Multiple Skleroz Hastalarında Bakır ve Çinko Homeostazının Metalloitiyonein Düzeyleri ve DNA Hasarı ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

Amaç: Multiple skleroz (MS), dünyadaki genç yetişkin popülasyon arasında en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Metalloitiyoneinlerin (MT) beyin metal homeostazında ve ağır metal detoksifikasyonunda önemli rolü bulunmaktadır. Yapılan tez çalışmasında, MS hastalarında MT ve çinko (Zn)/bakır (Cu) düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi ve moleküler etki mekanizmasını araştırmayı amaçladık.

Materyal ve metot: Bu çalışmaya 30 sağlıklı ve 70 MS olmak üzere 100 birey dahil edildi. Hastaların demografik özelliklerinin yanı sıra hasta ve kontrol grubundaki bireylerin serum MT düzeyleri, Zn/Cu düzeyleri, periferal lenfositlerindeki DNA hasarı düzeyi belirlendi. Hücre kültürü çalışmalarında ise insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) ve insan fibroblast hücre hattına (L929) ZnSO₄.7H₂O ve CuSO₄ ile muamele edilerek hücre canlılığı belirlendi. *MT-IIA*, *MT-III*, *metal transkripsiyonel faktör-1 (MTF-1)* ve *metal responsive element 11 (MRE11)* gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile değerlendirildi Comet yöntemi ile DNA hasarı belirlendi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen bireylerde serum MT-1, MT-2, MT-3 düzeyleri kontrole kıyasla hasta grubunda yüksek bulundu. MS grubunda Zn düzeylerinde azalış gözlenirken, Cu düzeylerinde artış bulundu. Kontrol bireylerde Zn ile MT-2 düzeyleri arasında negatif ve hasta bireylerde Cu ile MT-2 düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu. MT'lerin üç alt tipi, Zn ve Cu düzeyleri, yaş MS hastalığını öngörmeye etkili parametreler olarak bulundu. Comet analizi sonuçlarına göre MS grubunda DNA hasarı yüksek bulundu. Hücre hatlarında yapılan comet analizlerinde Zn/Cu uygulamasının DNA hasarına neden olduğu gösterildi. *In vitro* analizlerde IC₅₀ değerleri belirlenerek, SH-SY5Y hücre hattında 48 saat maruziyet sonrasında *MT-IIA* ve *MT-III* gen ekspresyonlarının *MTF-1*'e bağımlı olarak arttığı bulundu.

Sonuç: *In vitro* ve *in vivo* sonuçlarımız birbiriyle uyumlu bulundu. Çalışma kapsamında düzeyleri ölçülen MT'lerin üç alt tipi de MS'in teşhisinde uygun bir biyobelirteç olabilir. Aynı zamanda MS'te Cu ve Zn düzeylerinin ölçümü de klinik fayda sağlar. İlk defa MS hastalarında comet yöntemi ile DNA hasarının değerlendirildiği bu çalışmada, MS'te DNA hasarının belirginleştiği gözlemlendi. MT'leri kodlayan genlerin nöroblastom hücrelerde apoptotik hücre ölüm yollarını aktive ettiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Multiple skleroz, Metalloitiyonein, Çinko, Bakır, DNA hasarı, Comet

ABSTRACT

Evaluation of the Relationship of Copper and Zinc Homeostasis with Metallothionein Levels and DNA Damage in Multiple Sclerosis Patients

Aim: Multiple sclerosis (MS) is one of the most common neurological diseases among young adults worldwide. Metallothioneins (MT) play a vital role in brain metal homeostasis and heavy metal detoxification. In this thesis, we aimed to investigate the possible relationship between MT and zinc (Zn)/copper (Cu) levels and the molecular mechanism of action in MS patients.

Material and method: 100 individuals, 30 healthy and 70 with MS, were included in this study. In addition to the demographic characteristics of the patients, serum MT levels, Zn/Cu levels, and DNA damage levels in peripheral lymphocytes of the individuals in the patient and control groups were determined. In cell culture studies, cell viability was determined by treating the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and human fibroblast cell line (L929) with $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CuSO_4$. The RT-PCR method determined *MT-IIA*, *MT-III*, *metal transcriptional factor-1 (MTF-1)*, and *metal responsive element 11 (MRE11)* gene expressions. DNA damage was determined by the comet method.

Results: Serum MT-1, MT-2, and MT-3 levels in the individuals included in the study were found to be higher in the patient group compared to the control group. While a decrease in Zn levels was observed in the MS group, an increase in Cu levels was found. A negative correlation was found between Zn and MT-2 levels in control individuals and a positive correlation between Cu and MT-2 levels in patient individuals. Three subtypes of MTs, Zn and Cu levels, and age were found to be effective parameters in predicting MS disease. According to the comet analysis results, DNA damage was found to be high in the MS group. Comet analyses performed on cell lines showed that Zn/Cu application caused DNA damage. By determining IC_{50} values in *in vitro* analyses, it was found that *MT-IIA* and *MT-III* gene expressions increased related *MTF-1*-dependent manner after 48 hours of exposure in the SH-SY5Y cell line.

Conclusion: Our *in vitro* and *in vivo* results were found to be compatible with each other. All three subtypes of MTs that were measured within the scope of the study may be suitable biomarkers in the diagnosis of MS. At the same time, measuring Cu and Zn levels in MS also provides clinical benefits. In this study, DNA damage was evaluated for the first time in MS patients with the comet method, it was observed that DNA damage became evident in MS patients. It was determined that genes encoding MTs activated apoptotic cell death pathways in neuroblastoma cells.

Keywords: Multiple sclerosis, Metallothionein, Zinc, Copper, DNA damage, Comet

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
APC	: Antijen Sunan Hücreler
apo-MT	: Apo-Metallotiyonein
Arg	: Arginin
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
Cu	: Bakır
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EAE	: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünoabsorbent Testi
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
Fe	: Demir
GSH	: Glutatyon
Hg	: Civa
IC₅₀	: Hücre Canlılığının %50'sinin İnhibe Olduğu Konsantrasyon
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KİS	: Klinik İzole Sendrom
LMA	: Düşük Erime Noktalı Agar
Lys	: Lizin
MRE	: Metal Yanıt Elementi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Multiple skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MT	: Metallotiyonein
MTF	: Metal Transkripsiyon Faktör

MT-I	: Metal Transkripsiyon İnhibitörü
MTS	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4-Sülfofenil)-2h-Tetrazolyum
NMA	: Normal Erime Noktalı Agar
NMSS	: Ulusal Multiple Skleroz Derneği
NO	: Nitrik oksit
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PMS	: Fenazin Metil Sülfat
PPMS	: Birincil İlerleyici Multiple Skleroz
PRMS	: İlerleyici Tekrarlayan Multiple Skleroz
PSA	: Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
RİS	: Radyolojik İzole Sendrom
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RRMS	: Tekrarlayıcı Düzelen Multiple Skleroz
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPMS	: İkincil İlerleyici Multiple Skleroz
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
UVB	: Ultraviyole B
Zip	: Zrt-, Irt-Benzeri Proteinler
Zn	: Çinko
ZnT	: Zn ²⁺ taşıyıcıları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Ülkelere göre 100.000 kişi başına düşen MS prevalansı.....	5
Şekil 2.2. MS patogenezinin eşlik eden risk faktörleri	7
Şekil 2.3. Metalloproteinin molekülünün metal bağlama bölgeleri.....	13
Şekil 2.4. Metalloproteinlerin ana fonksiyonları	14
Şekil 2.5. Metalloproteinlerin redoks döngüsü	15
Şekil 2.6. MS hastalarında MSS'deki fizyopatolojik süreçte eksojen ve endojen metal homeostazının bozulmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.7. MSS'de çinko homeostazında rol oynayan metalloproteinler (MT), Zrt- ve Irt benzeri proteinler (ZIP) ve Zn taşıyıcıları (ZnT).....	20
Şekil 3.1. Serum numunelerinde ELISA yöntemi ile metalloprotein düzeylerinin analizi	26
Şekil 3.2. Serum Cu ve Zn düzeylerinin AAS yöntemi ile analizi.....	27
Şekil 3.3. Comet deneyinin basamakları; slaytların elektroforez tankına dizilimi, DNA hasarının floresans mikroskopla görüntülenmesi ve skorlama.....	29
Şekil 3.4. Hücrelerin skorlaması hasarsız, orta hasarlı ve şiddetli hasarlı olmak üzere gruplandırıldı (x20, x40, x100).....	29
Şekil 3.5. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarının 96 kuyucuklu steril hücre kültürü kabına ekimi	32
Şekil 3.6. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarının 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına hücre ekimi ve test maddelerinin uygulanması	33
Şekil 3.7. mRNA izolasyonu için hazırlanan hücre süspansiyonları.....	33
Şekil 3.8. Hücre süspansiyonlarına One Step RNA Reagent eklenerek inkübe edilmesi	34
Şekil 3.9. Hücre süspansiyonu fazları	34
Şekil 3.10. mRNA fazının izopropil alkolle inkübe edilmesi.....	35
Şekil 3.11. mRNA pelletinin %70'lik etanolle yıkanması	35
Şekil 3.12. mRNA pelletinden etanolün uzaklaştırılması ve pelletin kurutulması.....	36
Şekil 3.13. İzole edilen mRNA'lardan cDNA sentezi.....	37
Şekil 4.1. Bakır, çinko, MT-1, MT-2, MT-3 düzeyleri ve yaş için ROC eğrisi.....	45
Şekil 4.2. Kontrol ve MS grubu bireylerde comet analiz sonuçlarının karşılaştırılması	46

Şekil 4.3. Kontrol ve MS grubunda DNA hasarı (x40)	47
Şekil 4.4. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına uygulanan test maddelerinin IC ₅₀ konsantrasyonları	48
Şekil 4.5. L929 hücre hattında 24. saatte gen ekspresyonları.....	49
Şekil 4.6. L929 hücre hattında 48. saatte gen ekspresyonları.....	50
Şekil 4.7. SH-SY5Y hücre hattında 24. saatte gen ekspresyonları.....	51
Şekil 4.8. SH-SY5Y hücre hattında 48. saatte gen ekspresyonları.....	52
Şekil 4.9. SH-SY5Y hücre hattına uygulanan maddelerin 24 saat sonundaki comet değerleri.....	54
Şekil 4.10. SH-SY5Y hücre hattına uygulanan maddelerin 48 saat sonundaki comet değerleri.....	55
Şekil 4.11. L929 hücre hattına uygulanan maddelerin 24 saat sonundaki comet değerleri.....	57
Şekil 4.12. L929 hücre hattına uygulanan maddelerin 48 saat sonundaki comet değerleri.....	58
Şekil 4.13. L929 ve SH-SY5Y hücrelerinin kontrol, DMSO, Cu ve Zn uygulamasından sonraki DNA hasar düzeyleri (x40)	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. 2017 yılında yapılan revize McDonald kriterleri.....	10
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	23
Tablo 3.2. Kullanılan araç ve gereçler	24
Tablo 3.3. Sentezlenen primer dizileri	38
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen MS grubunun demografik özellikleri	41
Tablo 4.2. Kontrol ve MS grubunun karşılaştırılması.....	42
Tablo 4.3. Kontrol ve MS grubunda değerlendirilen parametreler arasındaki korelasyonlar.....	43
Tablo 4.4. Biyobelirteçlerin öngörülmesi gösteren ROC analizi	44
Tablo 4.5. Odds oranı.....	45
Tablo 4.6. Kontrol ve MS grubu bireylerde comet analiz sonuçları.....	46
Tablo 4.7. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına uygulanan test maddelerinin IC ₅₀ değerleri	48
Tablo 4.8. SH-SY5Y hücre hattına DMEM, DMSO, Cu ve Zn uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra comet parametrelerinin değerlendirilmesi.....	53
Tablo 4.9. L929 hücre hattına kontrol, DMSO, Cu ve Zn uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra comet parametrelerinin değerlendirilmesi	56

1. GİRİŞ

Multiple skleroz (MS) genç erişkin nüfusu etkileyen merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilişkili kronik otoimmün bir hastalıktır. MS hastalarında, MSS içerisinde plaklar ve lezyonlarla karakterize çok sayıda demiyelinize bölgeye rastlanmaktadır. Sonraki süreçlerde ise akson kaybı ve inflamasyon da eşlik etmektedir (1, 2). Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde MS prevalansı ve insidansı gün geçtikçe artmaktadır (3). MS'in başlangıç yaşı 20-40 aralığındadır ve kadınlarda görülme sıklığının erkeklerden 2-3 kat fazla olduğu bildirilmiştir (4). MS etiyojisi hala belirsizliğini korusa da pek çok farklı mekanizma öne sürülmektedir. Bunlar arasında; D vitamini eksikliği, ultraviyole B ışığına (UVB) maruz kalma, Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu, obezite ve sigara kullanımı gibi çevresel ve genetik faktörler sayılabilir (5).

1996 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Multiple Skleroz Derneği (NMSS) Danışma Komitesi'nde MS için ilk sınıflandırma; tekrarlayıcı düzelen MS (RRMS), birincil ilerleyici MS (PPMS), ikincil ilerleyici MS (SPMS) ve ilerleyici tekrarlayan MS (PRMS) şeklinde yapılmıştır (4). Ancak ilerleyen zamanlarda bu dört sınıflandırma yetersiz kalmıştır. Mevcut sınıflandırmaya ek olarak 2013 yılında komitede yapılan düzenlemeler ile radyolojik izole sendrom (RİS) ve klinik izole sendrom (KİS) da sınıflandırmaya eklenmiştir (5). Farklı tedavi seçeneklerine rağmen MS'in ilerlemesinin hala önüne geçilememektedir (6).

Metallotiyoneinler (MT), molekül ağırlığı 6-7 kilodalton (61-68 aminoasit) olan küçük molekül ağırlıklı, sisteince zengin ve metal bağlayıcı protein grubuna ait hücre içi proteinlerdir. Özellikle iki değerlikli ağır metal iyonlarına yüksek afinite gösterirler. MT ilk defa 1957 yılında atların renal korteksinde keşfedilmiştir ve o zamandan beri memelilerde MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4 olmak üzere dört MT izoformu tanımlanmıştır (7-10). MT-1 ve MT-2 vücuttaki tüm hücrelerde, MT-3, MSS başta olmak üzere pankreas ve bağırsaklarda, MT-4 ise deri ve üst gastrointestinal sistemde bulunmaktadır. MT'ler ağır metallerin detoksifikasyonunda, oksidatif strese karşı korumada, nöronal büyümenin düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Öte yandan, MSS'ni nörolojik hasarlara karşı çeşitli mekanizmalarla korumada MT'lerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Hücre içinde bulunmalarının yanı sıra hücre dışı kompartmanlarda da bulunmaktadır. MT'lerin temel işlevleri arasında metal homeostazının düzenlenmesi ile çinko (Zn) ve bakır (Cu) dahil olmak üzere temel eser elementlerin taşınması yer almaktadır. Beyin, yüksek oksidatif metabolizması

nedeniyle oksidatif strese karşı çok hassastır ve bu nedenle oksidatif stres koşullarına karşı bir koruma olarak MT aktivitesi beyinde önemlidir. Ayrıca, beyinde fizyolojik reaksiyonlar için metallerin ve MT'lerin varlığı Zn homeostazının düzenlenmesinde çok önemli unsurlar olduğundan, MT'ler beyinde kritik öneme sahiptirler (11-13).

Metaller hücre homeostazının sürdürülmesinde önemli role sahip olan enzimler, taşıyıcı proteinler ve transkripsiyon faktörleri dahil birçok hücrel mekanizmanın düzenlenmesini sağlamaktadırlar (14). Esansiyel bir element olan Cu^{2+} çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Bunun yanı sıra protein modifikasyonu, nörotransmitter sentezi, elektron ve oksijen taşınması gibi birçok fizyolojik süreçte de yer alır. MSS'de Cu seviyesindeki artışa bağlı olarak oksidatif stresin tetiklendiği düşünülmektedir. Ancak MSS'deki Cu seviyelerinin MS patolojisindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (15, 16).

Çinko, insan vücudunda en çok bulunan esansiyel elementtir. 300'den fazla enzim ve 2000 transkripsiyon faktörünün önemli bir ko-faktörüdür. Bu nedenle Zn eksikliği; bağışıklık sistemi sorunları, öğrenme güçlüğü, koku alma ve tat alma bozuklukları, yara iyileşmesi ve beyin gelişiminde gecikme, gibi birçok rahatsızlığa yol açabilir. Zn, büyüme ve yetişkinlik döneminde nörojenezin çoğalma, göç, farklılaşma ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli adımları için çok önemli bir faktördür. Zn eksikliği, nöronal proliferasyonun, farklılaşmanın ve apoptotik yollardaki aktivasyonun bozulmasına neden olur. Ayrıca Zn eksikliği Alzheimer ve Parkinson ile ilişkilidir. MS hastalarında da düşük Zn seviyeleri tespit edilmiştir (17, 18).

Oksidatif stresin MS patogenezinde önemli rolü olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiş, ancak bu çalışmalarda birbirinden farklı mekanizmalardan söz edilmiştir. DNA kırıkları oksidatif stresin sonuçlarından biri olmakla birlikte, MS hastalarında DNA kırılmasına ilişkin veriler çok az ve çelişkilidir. Meksika'da RRMS hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, serumda oksidatif stres parametrelerinde artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca, MS lezyonlarında antioksidan element ve enzim düzeylerinde azalma ve plazma toplam antioksidan kapasitesinde azalma bildirilmiştir (19).

Reaktif oksijen türleri (ROT), hücre sinyali, gen ekspresyonu ve konakçı savunması gibi çeşitli fizyolojik hücrel süreçlerde önemli rol oynayan oldukça reaktif moleküllerdir. Bununla birlikte, artan ROT seviyeleri, MS dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda yaygın gözlenen oksidatif stresi indükler. Kendilerini ROT'un neden olduğu hasar ve hücre ölümünden korumak için, hücreler kapsamlı bir antioksidan savunma ile donatılmıştır ve fizyolojik koşullar altında, hücrel ROT seviyeleri bu

endojen antioksidan sistemle dengededir. Ancak bu denge, ROT üretimindeki bir artış veya antioksidan korumanın azalmasıyla değiştiğinde, oksidatif stres ve ardından proteinlerde, lipidlerde ve DNA'da hasar meydana gelir.

Bu tez çalışması kapsamında MT'ler ile esansiyel elementler olan Cu ve Zn seviyelerinin araştırılması, *in vitro* olarak metal homeostazının bozulmasına bağlı gen ekspresyonları değişiklikleri ve MS hastalarındaki DNA hasarı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Skleroz

Merkezi sinir sistemini etkileyen ve kronik nörodejenaratif bir hastalık olan MS özellikle genç erişkinleri etkilemektedir. MS ilk kez 1868'de Fransız nörolog Jean Martin Charcot tarafından "la sclérose en plaks" olarak tanımlanmıştır (20). Ayrıca nörolojik işlev bozukluğu ile karakterize olan MS'te beyin ve omurilik beyaz cevherinde inflamatuvar hücrelerin birikimi görülmektedir (21). MS, bağışıklık sistemi elemanlarının sinir lifleri miyelinli kılıflarına saldırması ve hasar vermesi sonucu meydana gelmektedir (23). MS'in oluşumunda inflamasyona bağlı ortaya çıkan demiyelinizasyon ve astroglial proliferasyonun neden olduğu nörodejenerasyon olmak üzere iki ana mekanizma öne sürülmektedir. MSS'de meydana gelen bu demiyelinizan bozukluk ise motor fonksiyonlar, duyuşsal bozukluklar, denge, görme ve bilişsel faaliyetlerde değişiklikler ile ortaya çıkar (24, 25). Bu değişiklikler MS hastalarında farklılık gösterse de, MS özellikle genç yetişkinlerdeki nörolojik bozukluğun önemli bir nedeni olarak görülmektedir (20).

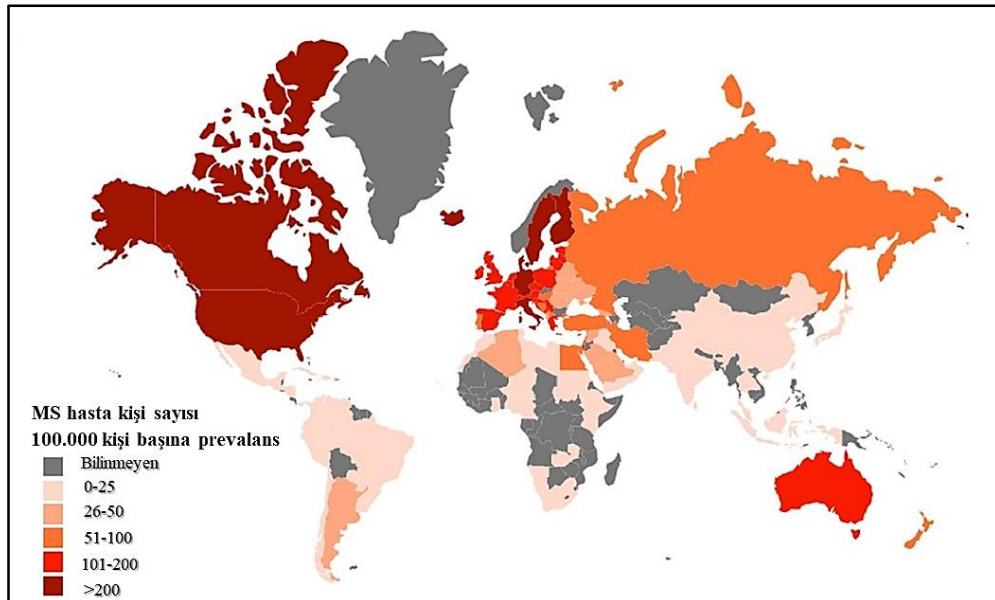
2.1.1. Multiple Skleroz Tarihçesi

Multiple skleroz hastalığı ile ilgili ilk gözlemler 15. ve 16. yüzyıla ait vaka örnekleridir. 1868 yılında Fransız bir nörolog tarafından ilk kez MS'in klinik ve patofizyolojik özellikleri tanımlanmıştır. 1885 yılında Joseph Bobinski ise MS üzerine tez yazarak beyin ve omurilikteki lezyonları detaylı bir şekilde incelemiştir. Ayrıca ilerleyen disfonksiyonların ve yürüme bozukluklarının spinal lezyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. 1940'larda daha kapsamlı yapılan kohort çalışmalarında hastalığa ait tanı kriterleri ile ilgili ölçekler geliştirilmiş ve farklı tedavi seçenekleri belirlenmiştir (26). 1965 yılında ise Schumacher paneli ile MS'in kesin tanı kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterler daha sonra oluşturulacak olan tedavi protokolleri için belirleyici niteliktedir. Tanı kriterleri 1983 yılında Poser tanı kriterleri olarak değişmiştir. Son olarak 2001 yılında McDonald kriterleri geliştirilmiş ve yayımlanmıştır. 2005-2010 yılları arasında McDonald kriterlerinin özgünlüğü korunmakla birlikte, tanı kriterlerinin duyarlılığını arttırmaya yönelik revizyonlar yapılmıştır. 2010 yılında yapılan revizyondan sonra gelişen teknoloji ve hastalık tanısı alanlara çocukların da eklenmesi ile "International

Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis” panelinde McDonald 2010 kriterleri güncellenerek 2017 yılında revize edilmiştir (27).

2.1.2. Multiple Skleroz Epidemiyolojisi

Multiple skleroz, dünyada genç erişkin nüfus arasında en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir. 20-40 yaş arasında ortaya çıkan MS’te kadınlar erkeklerden daha fazla risk altındadır (28, 29). MS’in görülme sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermekte olup, gelişmiş ülkelerde de artış görülmektedir. Dünya genelinde MS görülme sıklığı 100.000 kişide 33 olarak belirlenmiştir. Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Sahra Altı Afrika Ülkeleri’nde görülme sıklığı sırasıyla 100.000 kişide 140, 108, 2.2 ve 2.4 kişidir (30). Yapılan bir çalışmada 75 ülke genelinde MS prevalansı 100.000 kişide 2.1 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise Japonya’nın kuzeyinde MS görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (31). Türkiye’de yapılan bir araştırmada ise prevalansın 100.000 kişide 100’den fazla olduğu öne sürülmüştür. MS prevalansını etkileyen önemli çevresel faktörlerden biri de enlem gradyanıdır. Buna göre MS prevalansı kuzey yarımkürede kuzeyden güneye; güney yarımkürede ise kuzeyden güneye doğru kademeli olarak azalmaktadır (32). Günümüzde yaklaşık 2.8 milyon kişinin MS hastalığı teşhisi aldığı bilinmektedir (Şekil 2.1).

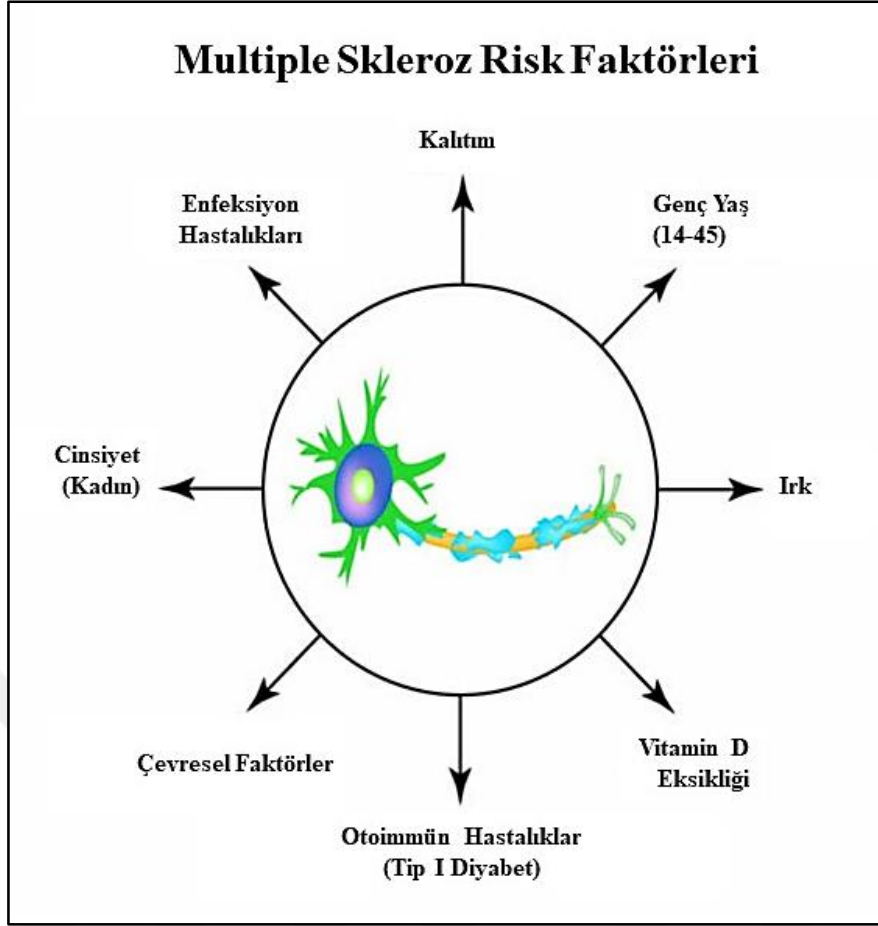


Şekil 2.1. Ükelere göre 100.000 kişi başına düşen MS prevalansı (33)

2.1.3. Multiple Skleroz Etiyolojisi

Multiple skleroz otoimmün ataklarla seyreden, hastaların iyileşme döneminin ardından tekrarlayan ve sonrasında düzelen, nöral bozulma dönemlerinin eşlik ettiği kronik bir hastalıktır. MS'in etiyolojisi belirsizliğini korumakla birlikte genetik ve çevresel faktörlerin hastalık patofizyolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada MS hastası bireylerde kardeşi MS olan bir bireyin MS olma ihtimalinin 17 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (34). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu oranın 7 kat olduğunu bildirmektedir (35, 36). Buna göre MS patofizyolojisinde çevresel faktörlerin genetik faktörlerden daha etkili olduğu görülmektedir. Hastalık patofizyolojisine katkıda bulunan en önemli çevresel faktörler; EBV, aktif/pasif sigara içimi, D vitamini eksikliğidir (37). MS'de diğer bir risk faktörü ise cinsiyet olup kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre yaklaşık üç kat daha fazladır. Bu orandaki farklılık enfeksiyonlara verilen immün yanıt ile cinsiyet hormonlarının doğrudan ilişkili olmasına bağlı olabilir (38).

Multiple skleroz patogenezinde birçok farklı genetik risk faktörü bulunmaktadır. Özellikle HLA-DRB1*15:01 halotipi hastalığın riskini 3 kat arttırmaktadır. Ayrıca HLA bölgelerinde tanımlı HLA-DR2+, HLA-DQ6, HLA-DRB1*15:01 ve HLA-DRB1*15:03 varyantları bulunmaktadır. Bu varyantların MS patolojisi ile ilişkisinin olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (39, 40).



Şekil 2.2. MS patogeneziyle eşlik eden risk faktörleri (38)

2.1.4. Multiple Skleroz Patogenezi

1898 yılında MS beyaz cevher lezyonları ve demiyelinizasyon ile karakterize olan beyaz cevher hastalığı olarak bilinmekteydi (41). Yapılan çalışmalarda MS’de fokal kortikal demiyelinizasyon lezyonları gösterilmiştir (42). Brownell ve Hughes 1962’de yaptıkları araştırmada, kortikal bölgelerde demiyelinizasyona bağlı lezyonların beyindeki toplam plak sayısının %26’sını oluşturduğunu bildirmiştir (43). Son yıllarda özellikle immünohistokimyasal çalışmalarda MS’in gri cevherde meydana gelen lezyonlarda demiyelinizasyon ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra MS’de en belirgin patoloji fokal plaklardır. Ayrıca MS’in patogeneziinde öne sürülen mekanizmalardan biri kan beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğinin değişmesidir (44). KBB’nin geçirgenliğindeki değişiklikler sonucu immün sistem elemanları MSS’ne geçmektedirler. Periferde aktive olan lenfositlerin MSS’ne geçerek lokal immün tepki oluşturması sonucunda miyelin ve aksonlar zarar görmektedir. KBB’nin geçirgenliğindeki bozulma sonucu aktive lökositlerin transendotelyal geçişi, MS’te görülen erken serebrovasküler

anormallikler arasında yer almaktadır. Bu durum ise inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile ilişkilidir (44, 45).

Merkezi sinir sisteminde beyaz ve gri cevherdeki fokal immün hücre infiltrasyonu ve inflamatuvar sitokinlerin salınımı MS'teki hasarın temel nedenidir. Araştırmalar, yardımcı T hücreleri (CD4+T helper (Th)-1) ve antijen sunan hücrelerin (APC), T lenfositlerle etkileşimi sonucunda başlayan adaptif immün yanıtın MS'in başlaması ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu hipoteze göre T hücreleri MSS'ne geçerek ve sinir dokularında hasara yol açarak immün yanıtı indüklemektedir. Histolojik araştırmalarda MS plaklarında CD4+ T helper (Th)-1 hücrelerinin azaldığı ve CD8+ hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (46). Ayrıca inflamatuvar hücrelerin dokuya geçmesi sonucunda miyelin hasarı oluşmaktadır.

Aktif plaklarda iki farklı tipte inflamasyon meydana gelmektedir. İlk olarak CD8+ T hücreleri ve mikroglial aktivasyon sonucunda oluşan başlangıç yanıtı ve miyelin hasarını tetikleyerek T hücreleri, B hücreleri ve makrofajların birikmesi gözlenmektedir. MS'in tekrarlayan-düzelen süreçlerindeki inflamasyon, inflamatuvar hücrelerinin MSS'ne infiltrasyonu sonucu meydana gelir. Lezyonların neden olduğu KBB'i hasarı ise manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile gösterilmektedir (47).

2.1.5. Multiple Sklerozun Klinik Seyri

Multiple sklerozun alt tipleri 2013 yılında Lublin ve ark. tarafından klinik izole sendrom (KİS), relapsing (ataklı) MS ve progresif (kötüleşen) MS olarak üç başlık altında tanımlanmıştır (5).

Klinik İzole Sendrom

Klinik izole sendrom, beyin ve omurilikte enfeksiyon belirtisi olmayan ilk atağa verilen isimdir. Hastalığın sinir sisteminde tuttuğu bölgeye göre semptomlar değişebilir ve bu sendrom aslında MS'in ilk atağı olabilir. Tutulum optik sinirler, omurilik beyin ve beyin sapında görülür. KİS, akut ya da subakut gelişen, yüksek ateş ya da enfeksiyon belirtisi olmadan, en az 24 saat süren tipik MS atağına benzeyen klinik bir tablodur (5, 48). KİS hastalarının ileride MS geliştirme riski olması nedeniyle düzenli aralıklarla takibi ve beyin MR'larının yeni bir belirti olmasa bile yılda bir kez tekrarlanması gerekmektedir. KİS tanısı alan hastalarda MRG'de demiyelinizan lezyonların varlığı MS tanısı konulmasını sağlar. KİS vakaları 20 yıla yakın takip edildiğinde %80 oranında MS'e dönüştüğü gösterilmiştir (49, 50). Eğer hasta sonraki dönemde MS tanısı alırsa, KİS olarak adlandırılan bu atak, MS'in ilk atağı olarak kabul edilir.

Radyolojik İzole Sendrom

Radyolojik izole sendrom (RİS), MS’de klinik olarak kabul görmese de MRG’de görülen lezyonlar bu tanıyı kuvvetlendirmektedir. 2009 yılında ilk defa ortaya atılan RİS terimi klinik belirtilerin görülmediği anormal MRG’nin eşlik ettiği hastaları tanımlamaktadır. RİS tanısı alan hastaların yaklaşık olarak yarısının 5 yıl içinde klinik olarak MS’e dönüştüğü gösterilmiştir. MS teşhisi alan hastalarda ortak kriterler arasında omurilik lezyonları, 37 yaşından küçük ve erkek olmak yer almaktadır. RİS’li hastalarda erken aksonal kayıp, beyin atrofisi ve inflamatuvar patolojilerin yanı sıra bilişsel bozukluklar, artmış anksiyete ve depresyon görülmektedir (51).

Relapsing Remitting Multiple Skleroz

Relapsing remitting multiple skleroz, MS hastalarının yaklaşık %85’inde görülen en yaygın fenotipidir. Ataklar ve iyileşmeler ile seyreden süreçlerle karakterize olup ataklardan sonra meydana gelen yeni semptomlar engelliliğe yol açabilir veya mevcut engellilikte artış görülebilir. Ataklardan sonra, en az 24 saat süreyle enfeksiyon veya metabolik bozukluk gelişmeden zayıflık, duyu değişikliği, denge bozukluğu, görme keskinliğinde bozulma, renkli görme veya çift görme gibi çeşitli nörolojik semptomlar meydana gelebilir (5). RRMS’de perivasküler lenfositik infiltratlardan dolayı meydana gelen inflamasyon, aksonal lezyonlar ve demiyelinizasyon nüks periyodu olarak adlandırılır. Nüksü takiben iyileşme döneminden sonra remiyelinizasyon görülür (52).

Sekonder Progresif Multiple Skleroz

Tedavi edilmeyen RRMS vakaları yaklaşık 20 yıl içinde SPMS vakalarına dönüşmektedir. Atak ve iyileşmeler ile devam eden dönemin ardından atak sayısının azaldığı aynı zamanda hastalarda düzelme olmayarak engellilik seviyesinin arttığı bildirilmiştir. SPMS’de yer alan patolojide RRMS’ye göre daha az seviyede inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyonun neden olduğu nörodejenerasyon ve sonucunda akson hasarı görülmektedir (5).

Primer Progresif Multiple Skleroz

Primer progresif multiple skleroz, MS’te yaklaşık %10-20 oranında görülen, başlangıçtaki RRMS evresinin olmadığı ve başlangıçtan itibaren hastalığın ilerlemesi ile karakterize klinik bir tablodur. PPMS süreci artan klinik şikayetler, MRG lezyonları ve genetik veriler ile karakterizedir. RİS hastalarının %10 oranında PPMS’e dönüşme ihtimali bulunmaktadır. PPMS hastalarında, RRMS fazının yokluğunun MSS’de meydana gelen sessiz lezyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. PPMS ve SPMS hastalarında nüks olsun ya da olmasın her iki durumda da engellilik artmaktadır. SPMS’ye benzer şekilde,

PPMS'deki patolojik tablo hafif-orta şiddette inflamasyonla birlikte ortaya çıkan nörodejenerasyon ile karakterizedir (53).

2.1.6. Multiple Sklerozda Tanı ve Tedavi

Multiple Sklerozda Tanı Kriterleri

Tekrarlayan ve ilerleyen nörolojik bulguların varlığıyla başvuran hastalar için MS tanı koyma süreci başlar. MS tanı kriterlerini değerlendirmeden önce, klinisyenler klinik öykü, muayene, görüntüleme ve diğer mevcut verilerin MS ile ilgili demiyelinizasyonla tutarlı olup olmadığını belirlemelidir. MS tanısının erken dönemde konulması uzun vadede hastalarda meydana gelen engelliliğin en aza indirilmesine katkıda bulunur (54).

Multiple skleroz tanısında öncelikle klinik tanı kriterlerinin sağlanması gerekmektedir. Laboratuvar testleri ve görüntüleme analizleri (beyin ve omurilik MRG), beyin omurilik sıvısı (BOS) analizleri ve sinir sisteminin işlevselliğine ilişkin testler kullanılmaktadır. Özellikle 2001 McDonald kriterleri hem klinik hem de laboratuvar incelemelerini birleştirdiği için günümüzde MS tanısında kullanılmaktadırlar (55). Bu kriterler; MS, olası MS ve MS dışı olmak üzere 3 bölüme ayrılmıştır. Ayrıca kriterlere 2005 yılında yapılan revizyonla 2001 yılındaki kriterlerin temel özellikleri korunarak ve özellikle MRG'nin etkisi artırılarak BOS ile ilgili karmaşık olan özellikler sadeleştirilmiştir (56, 57).

2017 yılında yapılan McDonald kriterlerinde yapılan revizyon Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. 2017 yılında yapılan revize McDonald kriterleri (58)

Atak	Objektif Klinik Bulgulu Lezyon	Ms Tanısı İçin Ek Veri
≥2 atak	≥2	Yok ^a
≥2 atak	1	Yok ^a
≥2 atak	1 + öyküde başka bir alandaki lezyona ait atak ^b	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

		Aşağıdakilerin 2'si
Sinsi Progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	<ul style="list-style-type: none"> • MS (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥ 1 lezyon • Spinal kordda ≥ 2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı
<p>^a: "Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MRG bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılmadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.</p> <p>^b: "Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güvenilirdir. Öyküdeki atağa ait dökümanite edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü inflamatuvar demyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.</p> <p>^c: "MRG'de mekanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥ 2'sinde ≥ 1 lezyon olması.</p> <p>^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.</p> <p>^e: "BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer."</p> <p>OKB: Oligoklonal band</p>		

Multiple Sklerozda Tedavi

Atak Dönemi Tedavi

Multiple sklerozda nörolojik fonksiyon bozukluğu semptomlarının akut veya subakut olarak ortaya çıkması, tekrarlaması, kötüleşmesi ile karakterize olan en az 24 saat süren yeni nörolojik bulguların ortaya çıktığı dönem atak dönemi olarak bilinmektedir. Ataklar birden fazla olmamalı ve 24 saatten az sürmemelidir. Her atak tedavi gerektirmediği gibi hastaların günlük yaşam kalitesini etkileyen ve fonksiyonel kayıplara yol açan ataklar tedavi gerektirmektedir (59).

Atak döneminde intravenöz metilprednizolon tedavisi 3-5 gün uygulanmaktadır. İdame tedavide ise steroid dozları azaltılarak uygulanır. MS'in atak döneminde meydana gelen inflamasyonu kortikosteroidler durdurmaktadır. Bunun yanı sıra uygulanan steroid tedavisi MS prognozunu düzeltmemektedir (60). Atak döneminde kullanılan alternatif seçenekler arasında adenokortikotropik hormon uygulaması, plazmaferez ve intravenöz immunglobulin kullanımı yer almaktadır. Ancak intravenöz immunglobulinin etkinliği hakkında kanıta dayalı veri bulunmamaktadır (58).

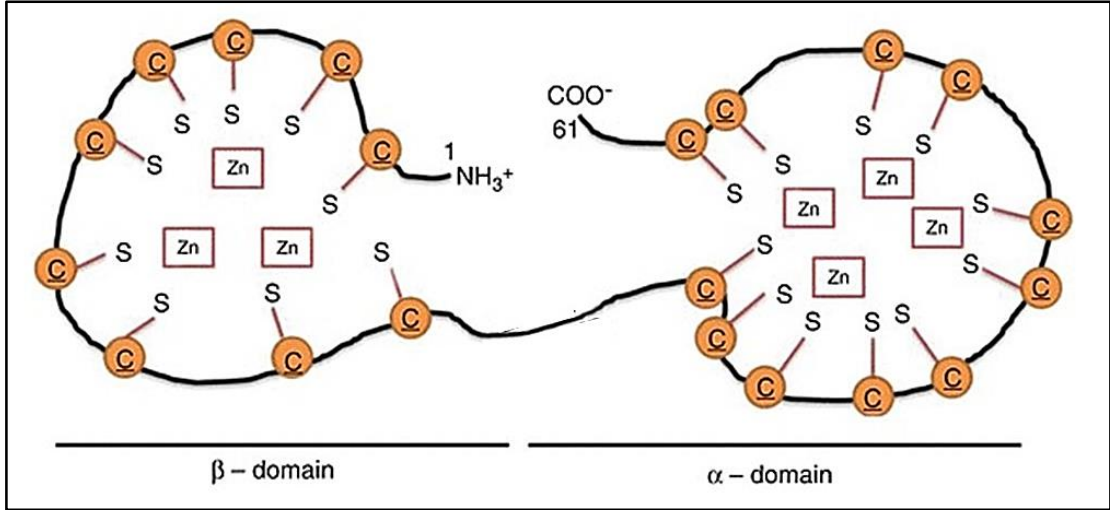
RRMS Dönemi Tedavi

Tekrarlayıcı düzelen multiple sklerozda kullanılan immünomodülatör tedavi hastalığın seyrini değiştirebilecek tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. 1993'te RRMS tedavisinde onaylanan ilk ilaç interferon-beta (IFN- β)'dır (61). IFN- β 'nın tepötik etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak sitokinlerin anti-inflamatuvar etkili olduğu bildirilmiştir. Farklı bir diğer anti-inflamatuvar ajan ise glatiramer asetattır (58). MS'de oral tedavide teriflunomid, dimetil fumarat, fingolimod ve kladribin olmak üzere 4 farklı ajan kullanılmaktadır (58, 62).

Multiple sklerozda hedefe özgü spesifik moleküller olmaları ve etkinliklerinin yüksek olması monoklonal antikorların tedavi seçenekleri arasında yer almasına neden olmuştur. Monoklonal antikorlar, MS'in patogenezinde, özellikle de erken inflamatuvar aşamalarda anahtar rol oynayan immün sistemi hedef alırlar. Hedefe yönelik olmalarından dolayı ise daha az yan etki ve ilaç-ilâç etkileşimi gözlenir. MS tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar arasında okrelizumab, natalizumab, alemtuzumab ve ofatumumab yer almaktadır (58).

2.2. Metalloiyoneinler

Metalloiyoneinler molekül ağırlığı 6-7 kilodaltondan küçük, sisteince zengin metal bağlayıcı protein grubuna ait hücre içi proteinlerdir. MT ilk defa Vallee ve ark. tarafından 1957 yılında at renal korteksinde keşfedilmiştir (63, 64). Memelilerde MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 olmak üzere 4 izoformu bulunmaktadır. MT-1 ve MT-2 vücuttaki tüm hücrelerde bulunurken, MT-3 esas olarak MSS'de ve az miktarda pankreas ve bağırsaklarda bulunur. MT-4 ise deride ve üst gastrointestinal sistemde bulunur. MT-1, MT-2 ve MT-4 izoformları 61-62 amino asitten oluşurken, MT-3 formu 68 amino asitten oluşmaktadır (65). MT molekülünün metal bağlama alanları sistein kalıntılarıdır. Bu alanlarda lizin (Lys) ve arginin (Arg) amino asit kalıntılarıyla yan yana dizilerek α ve β alanları olarak adlandırılan tiyol açısından zengin bölgeleri oluşturur. İki metal bağlama alanı, genellikle aralayıcı veya bağlayıcı olarak adlandırılan, sistein içermeyen bir sekansla ayrılır. α -alanı 31-68 arası amino asitten oluşur ve C-terminal kenarında yer alır. N-terminal β -alanı ise 1-30 arası amino asit içerir. α -domaininin Zn, kadmiyum (Cd), civa (Hg) veya (kurşun) Pb gibi iki değerlikli metal iyonlarından dört adet, β -domaininin ise üç adet bağlayabildiği gösterilmiştir (66).

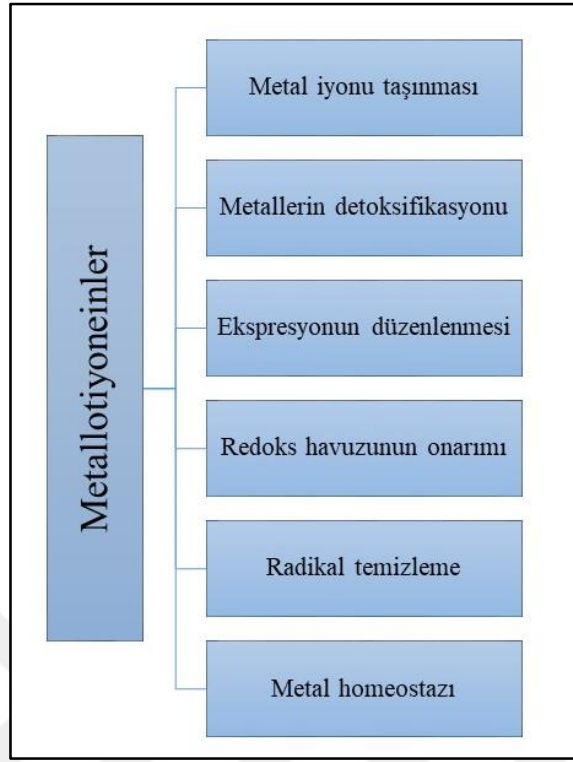


Şekil 2.3. Metallothionein molekülünün metal bağlama bölgeleri (66)

Proteinin metal bağlamayan kısmı apo-metallothionein (apo-MT) olarak adlandırılır. Aynı zamanda MT'ler 12'den fazla tek değerlikli metalle reaksiyona girme kapasiteleri vardır. Doğal olarak organizmada oluşan Zn iyonları, apo-MT'in ana bağlanma partneri olarak kabul edilir. Bununla birlikte, organizmada patolojik süreçlerde meydana gelen Cu, Cd, Hg, Pb, Pt, Cr, Bi ve Ag gibi diğer esansiyel olmayan metal iyonları da sıklıkla apo-MT bağlanma bölgelerine daha yüksek afinite gösterirler. Ancak demir (Fe) iyonları apo-MT bölgelerine düşük afinite gösterirler (67).

Metallothioneinler normal ve patolojik hücrelerin yanı sıra serumda da tespit edilmişlerdir. Birçok önemli hücresel süreci düzenleyebilir ve aracılık edebilirler. Fonksiyonel MT-1/2 izoformları temel olarak hücresel sitoplazmada ve bazı organellerde bulunur; ancak ağırlıklı olarak mitokondride eksprese edilirler. MT-3'ün ise daha çok MSS'de salgılandığı gösterilmiştir (68).

Metallothioneinlerin fizyolojik fonksiyonları arasında esansiyel metal homeostazı ve taşınması, toksik metallerin detoksifikasyonu, redoks reaksiyonlarının modülasyonu, serbest radikallere karşı savunma, nöroprotektif etkisi, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkileri yer almaktadır (Şekil 2.4). MT-1/2 izoformlarının oksidatif stres varlığında hücre çekirdeğinde hızla yer değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca MT-1/2 moleküllerinin çekirdekte lokalize olduktan sonra hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. MT-3 izoformunun, çekirdek ve sitoplazmada farklı lokalizasyonlarının DNA hasarına karşı korumada ve transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (69, 70).



Şekil 2.4. Metallothioneinlerin ana fonksiyonları

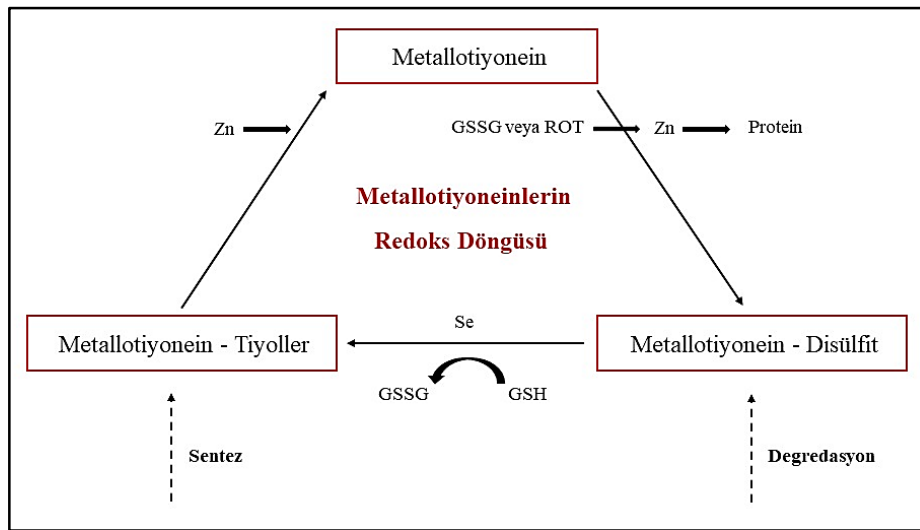
Metallothioneinlerin spesifik metal kaynaklı transkripsiyonunun kanıtı olarak MT'lerin indüksiyonunun metal bağımlı olması ve MT geninin yukarı akış dizilerinde *metal yanıt elementlerinin (MRE)* varlığı gösterilebilir. *MRE*-bağlayıcı protein olan *metal transkripsiyon faktör-1 (MTF-1)* MT gen ekspresyonunu başlatır (71). *MTF-1*'in DNA'ya bağlanması için ortamdaki Zn konsantrasyonu artmalıdır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda *MTF-1*'in, MT'nin ağır metal kaynaklı ekspresyonu için gerekli olan bir Zn parmak proteini olduğu bildirilmiştir. Yapısal olarak aktif olan *MTF-1*, *metal transkripsiyon inhibitörü (MT-I)* olarak adlandırılan Zn'ye duyarlı bir inhibitör tarafından inhibe edilmektedir. Ortamda Zn'nin varlığında; Zn-iyonları, Zn-parmak proteinlerinin bağlanma bölgelerine bağlanarak *MTF-1/MT-I* kompleksinin ayrışmasına neden olur. Böylece, *MTF-1*'in MT transkripsiyonunu aktive etmek amacıyla MT promotöründe *MRE*'lerle etkileşime girmesine izin verir (72, 73).

Yeni sentezlenen MT'lerin Zn'ye bağlanması sonucunda *MTF-1/MT-I* kompleksi yeniden düzenlenir. Cd, Cu, Hg gibi diğer metaller MT'yi indükler, ancak bunu *MRE* aktivitesi üzerinden yapmazlar. Hücre içi Cd, Cu, Hg ve serbest radikal miktarı artarsa MT'ye bağlı olan Zn serbest kalarak *MTF-1*'e bağlanır ve MT sentezinin artmasına neden

olur (74, 75). *MRE*'ler, MT ifadesini düzenleyebilen birçok proteinle etkileşime girebilir. Ayrıca serbest radikal üreten kimyasalların yanı sıra etanol, kloroform ve alkilasyon ajanları gibi çeşitli organik çözücüler de MT ekspresyonunu indükleyebilirler (76).

Metallotiyoneinler Zn homeostazında önemli rollere sahiptirler. Hücre içi Zn konsantrasyonu düzenlemesi MT'ye bağlı Zn konsantrasyonuna bağlıdır. Yeterli hücre içi Zn konsantrasyonu sağlanmadığında MT, proteaz enzimler tarafından hızlıca parçalanarak hücre içi Zn konsantrasyonu düzenlenir (13). MT'ler hem sitozolik hem de nükleer olmak üzere hücre içinde veya hücre dışında lokalize olabilirler.

Metallotiyoneinlerin ana işlevi, metal homeostazının düzenlenmesinin yanı sıra Zn ve Cu dahil olmak üzere esansiyel metallerin taşınmasıdır. Ek olarak MT'ler lipid peroksidasyonunu azaltarak, hidroksil radikalleri, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve nitrik oksit (NO) radikalleri gibi çeşitli ROT ajanlarını temizleyerek hücreleri ROT hasarına karşı korurlar (13, 77). MT'ler ROT'ları yakalayıp dokulara bağlanıp DNA hasarına neden olmasını engeller. Önemli hücre depoları olan MT'ler gerektiğinde Zn ile yer değiştirebilirler. MT-Zn kompleksleri ortamda ROT bulunduğunda ilk olarak Zn ROT'lar ile yer değiştirir. MT ile bağlanan ROT'lar hücre ve dokulara zarar veremez. MT ve Zn aslında hücre içi antioksidanlar gibi davranarak hücreleri hasardan korur. Özellikle oksidatif stres varlığında Zn'yi ortama göndererek antioksidan aktiviteyi artırır (78, 79). Zn proteinler, okside glutatyon (GSSG) gibi ROT üreten moleküllere maruziyet sonrasında içerdikleri sülfür kümelerine bağlı Zn'yi serbest bırakır ve Zn'nin aktif formu olan serbest Zn tarafından antioksidan sinyali düzenlenir (Şekil 2.5).

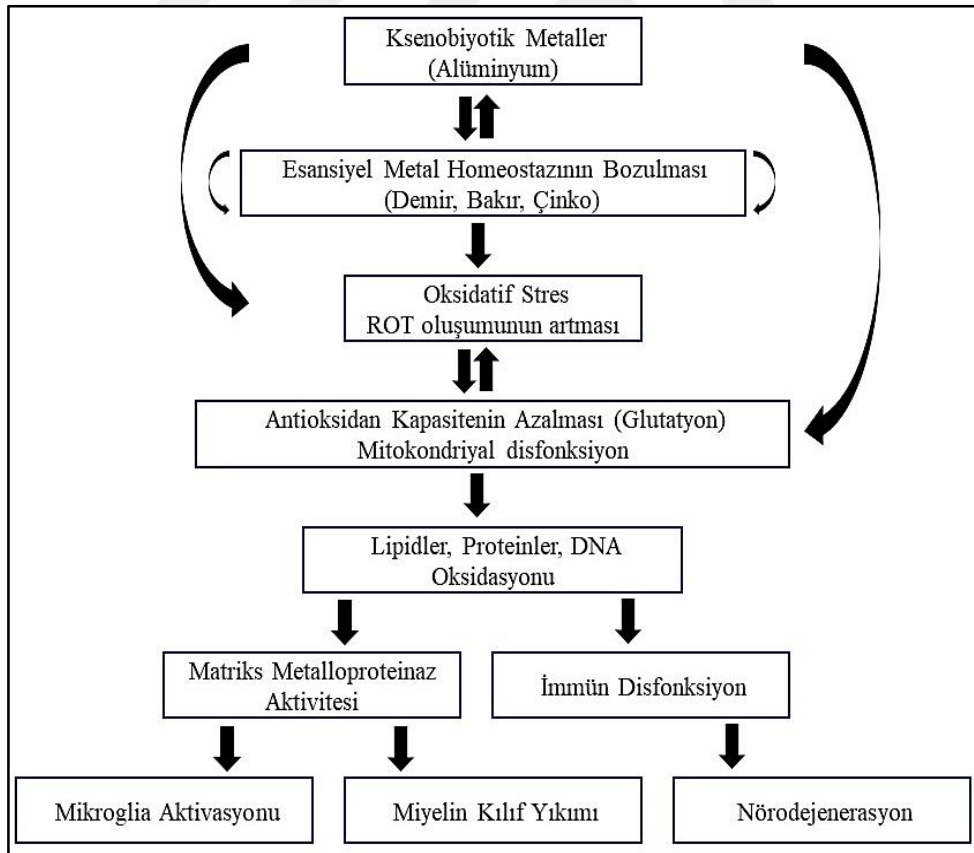


Şekil 2.5. Metallotiyoneinlerin redoks döngüsü (78)

2.2.1. Metalloiyoneinler ve Esansiyel Elementler

Metalloiyoneinler üç boyutlu yapıya sahip, tek veya üç boyutlu tiyol kümelerinin varlığıyla karakterize olan sistein açısından zengin proteinlerdir. En önemli fonksiyonları arasında metal homeostazı ve detoksifikasyonu yer almaktadır. MT'lerin hem esansiyel (Zn, Cu) hemde esansiyel olmayan metallerle (Hg, Cd) etkileşime girdiği gösterilmiştir (76).

Metaller, statik biyomoleküllerin stabilize şekilde çalışması için enzimlerin ve yapısal elementlerin vazgeçilmez kofaktörleridir. Ayrıca nörotransmitter sentezi, nöral metabolizma ve oksijen taşınması gibi beynin ana metabolik yollarına katılırlar. Son yıllarda redoks metallerle (Fe, Cu) özellikle ROT üretiminde yer aldıkları için nörodejeneratif hastalıkların nedeni olarak odaklanılmıştır. Fe ve Cu, nörolojik bozukluklarda araştırma konusu olmuştur. İndirgenmiş Fe ve Cu; DNA'ya, proteinlere, lipitlere zarar vererek hidroksil radikallerinin üretiminde rol oynarlar. Bu nedenle metallerin homeostazındaki düzensizlik, MS de dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklara katkıda bulunabilir (80-82).



Şekil 2.6. MS hastalarında MSS'deki fizyopatolojik süreçte eksojen ve endojen metal homeostazının bozulmasının şematik gösterimi (81)

Nörodejeneratif hastalıklar nöronların uzun süreli kaybı ile karakterizedir. MSS’de yavaş ve ilerleyici nöron kaybı Parkinson ve Alzheimer gibi hem akut hem de kronik nörodejeneratif durumların ana patolojik nedenidir. Günümüzde metal iyonlarının nörodejeneratif süreçlerde, özellikle de sinaptik iletimde yer aldığı gösterilmiştir. Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda dokularda yüksek Fe içeriği ile amiloid plaklarda Cu ve Zn birikiminin anormal dağılımı gözlenmiştir (83). Ayrıca Alzheimer, Parkinson, Menkes hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz ve Prion bozuklukları dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde Cu seviyelerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (84).

Beyin dokusu karaciğerden sonra en yüksek Cu içeren organdır (85). Cu; nörotransmitter biyosentezi, mitokondriyal aktivite, oksidatif hasara karşı savunma gibi temel hücrel süreçlerde yer alan proteinlerin bir kofaktörüdür. Fizyolojik olarak parankimal hücreler arasında astrositlerin beyindeki Cu homeostazı üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (86).

Çinko, MSS fizyolojisi ve patolojisinde önemli bir esansiyel elementtir. Beyinde tüm enzimatik reaksiyonları katalizlediği için nörotransmisyon ve metabolizma dahil birçok hücrel süreçte yer almaktadır (86, 87). Beyindeki başlıca Zn işlevlerinden biri sinaptik iletimi modüle etme yeteneğidir. Zn; neokorteks, amigdala ve hipokampusta yer alan glutamaterjik ve gabaerjik nöronlar gibi spesifik nöron türlerinin sinaptik keseciklerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (87). Bu nedenle beyindeki Zn seviyeleri kritik önem taşımaktadır. MT’lerin Zn’ye karşı affiniteleri bulunduğundan Zn homeostazından sorumlu oldukları bildirilmiştir (88).

2.2.2. Metalloiyoneinler ve Santral Sinir Sistemi

Metalloiyoneinler sisteyince zengin olan Zn, Cu ve Cd gibi metalleri bağlayıcı proteinler olarak bilinirler. Metal iyonlarını bağlayarak detoksifikasyon ve homeostaz mekanizmalarının düzenlenmesini sağlayan MT’ler aynı zamanda antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkilere de sahiptirler (89).

Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki homeostazın bozulmasına bağlı olarak oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres nörodejeneratif hastalıkların nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda oksidatif hasarın Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların, serebral iskemi ve epilepsi gibi diğer nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde hayati bir rol oynadığı bildirilmiştir. MT’ler

inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz gibi olayların modülasyonu yoluyla hasarlı beyin dokusu tarafından indüklenen eksitotoksisiteye karşı nöronları koruyabilirler (90).

Metallotiyoneinler astrositler başta olmak üzere hücresel sitoplazma, mitokondri, lizozom, koroid, araknoid, pia mater, meningeal ve ependimal hücreler içinde eksprese edilen proteinlerdir. Beyin yüksek seviyede oksijen tüketiminden dolayı oksidatif hasara karşı oldukça savunmasızdır. Nörodejeneratif hastalıklarda artan oksidatif stres genellikle MT-1 ve MT-2 dahil olmak üzere antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilişkilidir; MT'ler, oksidatif stresin neden olduğu hasarı hafifleterek oksidatif hasarı azaltabilirler, bu da bu protein ailesinin işlevlerinin başlangıçta düşünüldüğünden daha karmaşık ve çeşitli olduğunu düşündürmektedir (91).

Metallotiyonein 1 ve 2'nin biyosentezi beynin farklı bölgelerinde meydana gelir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MT-1/2'nin aynı zamanda hücre içi ve hücre dışı olarak dağıtıldığı, böylece nöronların bu proteinleri düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesi aracılığıyla sitoplazmalarına dahil edebildikleri bildirilmiştir. Mikroglia hücreleri, oligodendrositler ve nöronlar genellikle MT-1/2 ekspresyonu göstermese de, beyindeki hasara karşı yanıt olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (91, 92).

Metallotiyonein-3 ağırlıklı olarak nöronlarda eksprese edilmektedir. MT-3 diğer izoformlarından farklı olarak +3 ve +4 değerlikli metal iyonları içermektedir. Sağlıklı bir beyinde MT-3 ekspresyonu sınırlı olmakla birlikte beyin hasarından sonra glia hücrelerinde MT-3 artışı bildirilmiştir. MT-3'ün hücresel lokalizasyonunun esas olarak nöronlarda, özellikle de yüksek Zn konsantrasyonuna sahip alanlarda olduğu kabul edilmektedir (91, 93).

Nöroinflamasyon süreci nöral disfonksiyona ve nöral hücre kaybına yol açarak ROT'ların artışı ile birlikte nörodejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunur. MT'ler, sitokinler, interlökin (IL)-6, IL-3 ve tümör nekroz faktör (TNF)- α ile astrositlerde bulunan interferonlar olmak üzere inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu düzenler. IL-6 beyin hasarı durumunda nöroprotektif bir protein olan MT'leri indükleyerek fagositozu ve inflamatuvar sistem elemanlarının salımını artırmaktadır (91, 93, 94).

2.2.3. Metallotiyoneinler ve Multiple Skleroz

Multiple skleroz, çevresel ve genetik faktörlerin eşlik ettiği MSS'nin kronik demiyelizan inflamatuvar hastalığıdır. Hastalık gelişiminde rol oynayan mekanizmalar kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve mevcut verilerin çoğu, interferon (IFN)- γ ve TNF- α

gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılayan CD4+T helper (Th)-1 lenfositlerin aracılık ettiğini göstermektedir. Bu kapsamda ayrıca nöron ve miyelin hasarında oksidatif stresin rolü olduğu gösterilmiştir (95). MT'ler, oksidatif stresin meydana geldiği koşullar altında biriken, düşük molekül ağırlıklı ve ağır metal bağlayan sistein açısından zengin proteinlerden oluşan bir protein ailesidir. MT'lerin dört izoformu da antioksidan sistem ile ilişkili bulunmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar MT-1/2'nin deneysel otoimmün ensefalomyelitli (experimental autoimmune encephalomyelitis/EAE) farelerin beyinde indüklendiğini bildirmiştir. Zn/MT-2 tedavisinin zamana ve doza bağlı bir şekilde EAE'nin şiddetini ve mortalitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu veriler, EAE'de MT-1/2'nin koruyucu rolünü desteklemektedir (96, 97).

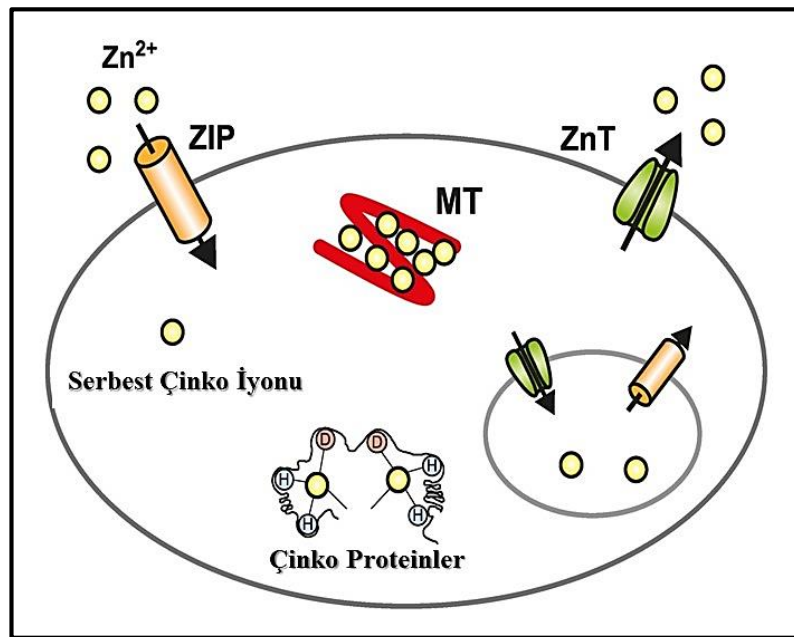
Metallotiyonein 1 ve 2'nin protein ekspresyonu, Alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, beyin iskemisi ve pick hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda incelenmiştir. Ancak MT-1/2 ekspresyonu MS'de spesifik olarak araştırılmamıştır. MS tanısı alan hastalardan alınan beyin dokusu örneklerinde mikroarray analizinin yapıldığı çalışmada tüm dokularda MT-1/2 gen ekspresyonunun önemli ölçüde indüklendiği bildirilmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal çalışmalarda ölen üç MS hastasından ve iki kontrolden alınan beyin dokularının aktif ve inaktif lezyonlarında MT-1/2 immünoreaktivitesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. MS'li beyin bölümlerinin MT-1/2 eksprese eden hücrelerinin hiçbir zaman oksidatif strese veya apoptoza maruz kalmadığı görülmüştür. Bu durum, MT'lerin muhtemelen oksidatif strese ve hücre ölümüne karşı koruyucu bir role sahip olduğu hipotezini desteklemektedir (97).

Mevcut literatür verilerine göre, MT-1/2'nin doku hasarıyla başa çıkmaya çalışan faktörler olarak MS patogenezinde yer aldığı düşünülmekte ve MT-1/2 ile tedavinin potansiyel olarak yararlı olabileceği öne sürülmektedir. Deneysel EAE modellerinde, MT-1/2'nin doğrudan antioksidan olarak etki edebileceği, makrofajlar tarafından üretilen ROT'ları azaltarak dolaylı olarak oksidatif stresi azaltabileceği veya astrosit sayısını artırarak oksidatif stresi azaltabileceği şeklinde farklı hipotezler de öne sürülmektedir. Bu nedenle bu proteinlerin EAE/MS'de tedavi edici etkileri olasıdır ve MT-1/2, MS tedavisi için potansiyel olarak aday gösterilebilir (97, 98).

2.3. Esansiyel Metaller ve Santral Sinir Sistemi

2.3.1. Çinko

Çinko, insan vücudunda en çok bulunan ikinci esansiyel eser element olarak hücresel çoğalma, transkripsiyon, apoptoz, büyüme, immün sistem ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik süreçte kritik rol oynar. İnsan vücudunda bulunan proteinlerin %10'unun işlevini gerçekleştirmesi için kofaktör olarak Zn görev alır. Zn, MSS'nin ihtiyaç duyduğu bir elementtir ve beyinde bulunan Zn, metalloenzimler ve metalloproteinlere bağlanarak etki gösterir. Zn^{2+} 'nin, kalsiyum (Ca) gibi çeşitli sinyal iletim yollarında ikincil haberci olarak hızlı ligand değişim reaksiyonlarında yer aldığı bulunmuştur. Bu nedenle, Zn^{2+} eksikliği sonucunda immün sistem bozuklukları, öğrenme güçlüğü, koku alma ve tat alma bozuklukları, beyin gelişimi, büyüme ve yara iyileşmesinde gecikme görülebilir. Redoksa karşı bir metal olarak Zn^{2+} , bir dizi molekül ve enzim aracılığıyla güçlü antioksidan özellikler sergiler ve böylece oksidatif strese karşı önemli bir rol oynar. Ancak aşırı Zn^{2+} , esas olarak oksidatif stres oluşumu yoluyla nörotoksositeye neden olabilir. Bu nedenle felç, epilepsi ve iskemi için bir risk faktörü olarak bilinmektedir (99). Beyinde, Zn^{2+} homeostazı MT, Zn^{2+} taşıyıcıları (ZnT) ve Zrt-, Irt-benzeri proteinler (ZIP) olmak üzere üç protein ailesi tarafından sağlanır (100) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. MSS'de çinko homeostazında rol oynayan metallothioneinler (MT), Zrt- ve Irt benzeri proteinler (ZIP) ve Zn taşıyıcıları (ZnT) (100)

Metallotiyonein, sitoplazmik Zn^{2+} 'yi tamponlayan ana bağlayıcı proteindir. 61 amino asitten oluşan, sistein açısından zengin bir peptiddir. MT'nin 20 sistein kalıntısı; Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ve Cd^{3+} dahil olmak üzere çeşitli iki değerlikli metallerin bağlanma bölgeleridir. Her MT, bir rezervuar olarak metal-tiolat kümeleri aracılığıyla 7 Zn^{2+} atomuna bağlanabilir. MT'lerin salgılanması Zn^{2+} düzeyindeki artışa bağlı olarak indüklenmektedir (99).

2.3.2. Bakır

Bakır, beyin dokusunda redoks dengesinin korunmasında önemli rol oynayan elektron transfer reaksiyonlarının kofaktörüdür. Nöronal gelişimin, olgunlaşmanın ve fonksiyonların önemli bir bileşeni olan Cu, beyin bariyerlerinde bulunan Cu taşıyıcısı yoluyla beyne kontrollü bir şekilde girebilmektedir. KBB ve kan-BOS bariyeri tarafından beyindeki Cu homeostazını düzenlemektedir. Beyin, vücuttaki Cu'nun yaklaşık %9'unu içeren vücudumuzda Cu seviyesinin en yüksek olduğu üçüncü organdır. Beyinde Locus coeruleus adı verilen küçük bir bölgedeki beyin sapı nöronları ise en yüksek Cu seviyesine sahiptir. Cu farklı oksidasyon durumlarında oksitlenir, ancak Cu^{+} ve Cu^{2+} oksidasyon durumları hücreler içinde en yaygın olanlardır (101).

2.3.3. Esansiyel Metaller ve Multiple Skleroz Arasındaki İlişki

Multiple sklerozun etiyolojisi hala belirsizliğini korumakla birlikte, enfeksiyon, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin hastalık patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. MS'in nedenlerinden biri ise metal homeostazının bozulmasıdır. Literatür çalışmalarında, MS hastalarının hem serum Zn^{2+} seviyelerinin hem de Zn^{2+} alımının azaldığı gösterilirken; sağlıklı kontroller ile MS hastaları arasında serum Zn^{2+} seviyelerinde anlamlı bir fark olmadığı hatta MS hastalarında plazma Zn^{2+} seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. MS hastaları üzerinde yapılan sınırlı sayıda çalışmada ise metal homeostazının bozulmasına dair net sonuçlar bulunamamıştır (99).

Multiple skleroz ile ilişkili bir diğer element olan Cu'nun, glia hücrelerindeki artan seviyeleri mitokondriyal elektron taşıma sisteminin ve sitokrom oksidaz sisteminin hasarına neden olur. Bu nedenle Cu şelatörü ajanlar, MSS üzerinde demiyelinizasyon modeli oluşturmak için kullanılırlar. Cu bağlayıcı ajanlar ile tedavi sonucunda MSS'ne taşınan Cu iyonları oligodendrosit hücreleri üzerinde toksisite göstererek, demiyelinizasyona neden olurlar. Cu homeostazının birikme yönünde bozulması ile MS arasında bir ilişki bulunmakla birlikte örneklem büyüklüğünün az olduğu çalışmalar ile

tasarlanmış ve bu çalışmalara ait çelişkili veriler bulunmuştur. MS patogeneğinde etkili proinflatuvar sitokinlerin üretiminde Zn önemli bir rol oynar. Cu ise ATP üretimindeki enzim reaksiyonlarında ve sinirlerde impuls iletiminde rol oynamaktadır. Cu birçok enzimin yapısı ve işleviyle ilişkilendirilmiş, ancak inflamatuvar süreçteki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Cu, oksijen radikallerinin oluşumunda rol oynadığı için, Cu'nun fazlası vücutta toksisiteye neden olabilir (101).

Yapılan tez kapsamında MS'e yol açan mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Bununla birlikte, serum Cu ve Zn gibi değiştirilebilir belirteçlere erken dönem müdahale edilmesi, hastalığın komplikasyonlarının azaltılmasına yardımcı olacaktır. Klinik ve *in vitro* olarak yapılan analizler kapsamında MS ile esansiyel elementler arasındaki ilişki aydınlatılarak, yeni metal hedefli terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlanacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Gereçler

Tez çalışması sürecinde kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de yer almaktadır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Adı
(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix
Dimetil sülfoksit
Dulbecco's modified eagle medium
Düşük erime noktalı agar
Etidyum bromür
Etilen diamin tetra asetik asit
Fenazin meta sülfat
Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
Fetal sıgır serumu
Hidrojen peroksit
Hidroklorik asit
Histopaque 1077
Human serum MT-1 ELISA kit
Human serum MT-2 ELISA kit
Human serum MT-3 ELISA kit
Normal erime noktalı agar
PCR MasterMix
Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
Potasyum hidroksit
Potasyum klorür
Sodyum hidroksit
Sodyum klorür
Tripsin
Triton-X 100
Trizol

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 3.2. Kullanılan araç ve gereçler

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli	Modeli
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu/-20°C	Uğur Derin Dondurucu
Derin dondurucu/-80°C	NÜVE
ELISA plak okuyucu	BioTek Synergy HTX Multimode Reader
Enzim-immünoassay plak yıkayıcı	Sorin Biomedica
Mikrosantrifüj tüpü	Eppendorf
Floresans mikroskop	Zeiss Axioscope A1
İnverted mikroskop	SopTop Instruments
Karbondioksit inkübatör	NÜVE
Manyetik karıştırıcı	Dottingen 7801
Mikrosantrifüj	NÜVE
Orbital çalkalayıcı	BOECO, PSU-2T
Otomatik pipetler	Eppendorf
pH metre	Cyberscan pH 500
Santrifüj	NÜVE
Spektrofotometre	PG Instruments-T60
Steril çalışma kabini	NÜVE
Terazi	Mettler H54, AT201
Vorteks/Minishaker	SCIOLOGEX-MX-S
Yazıcı	HP laser 1310

3.2. Yöntem

3.2.1. Numunelerin ve Verilerin Toplanması

Bu tez çalışması 2022/44 numaralı etik kurul onayı ve TDK -2022-3012 numaralı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) desteği ile yürütülmüştür. Çalışmaya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Nöroloji Anabilim Dalı'na rutin kontrol amacıyla başvuran 18-55 yaş arası 100 birey (30 kontrol ve 70 MS hastası) dahil edildi. Çalışmaya katılan tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formu alındı. Rutin testler için kan verecek hastalardan, kan alma işlemini takiben damar yolu kapatılmadan (kateter çekilmeden) önce biyokimya tüpüne 4-5 mL kan örneği alındı. Toplanan kan örnekleri oda sıcaklığında 3000 devir/dakikada 15 dakika santrifüjlenerek serum kısımları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri 3 ayrı mikrosantrifüj tüpüne konularak analiz gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Hasta Seçimi, Dahil Etme/Dışlama Kriterleri

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Multiple skleroz tanısı alan ve başvurudan en az 30 gün önce son atağı yaşayan hastalar çalışmaya dahil edildi. MS hastalarının yaşı, cinsiyeti, hastalık süresi, MS tipi, kullandığı ilaçlar kaydedildi. Poliklinik kontrolleri sırasında tüm MS hastalarının ayrıntılı hikâyesi alındı ve nörolojik muayenesi yapıldı.

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

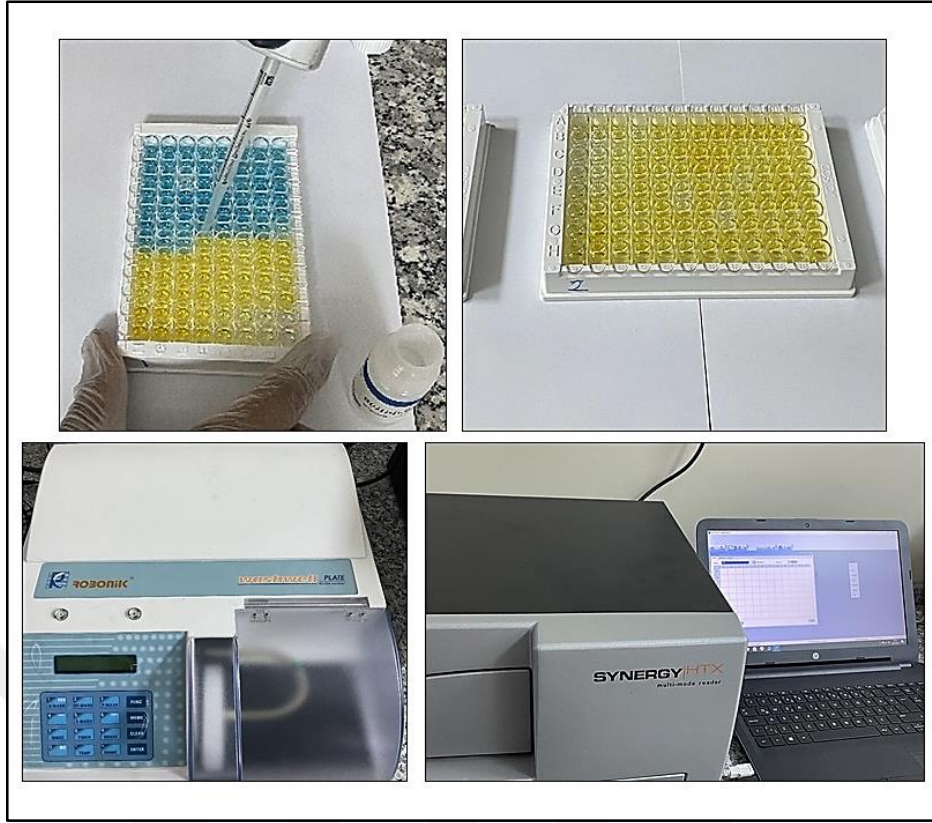
Bu tez çalışması kapsamında hastaların dışlanma kriterleri;

- İlerleyici MS tanısı konulan,
- Akut atak geçiren ve hastanede yatan,
- MS dışında herhangi bir metabolik, enfeksiyöz, inflamatuvar, karaciğer, böbrek, kardiovasküler ve psikiyatrik hastalığı bulunanlar,
- Bilinen malignite öyküsü bulunan iş kollarında çalışanlar çalışmaya dahil edilmedi.

3.2.3. Serum Numunelerinin Analizi

Metallotiyonein (MT) Düzeylerinin Belirlenmesi

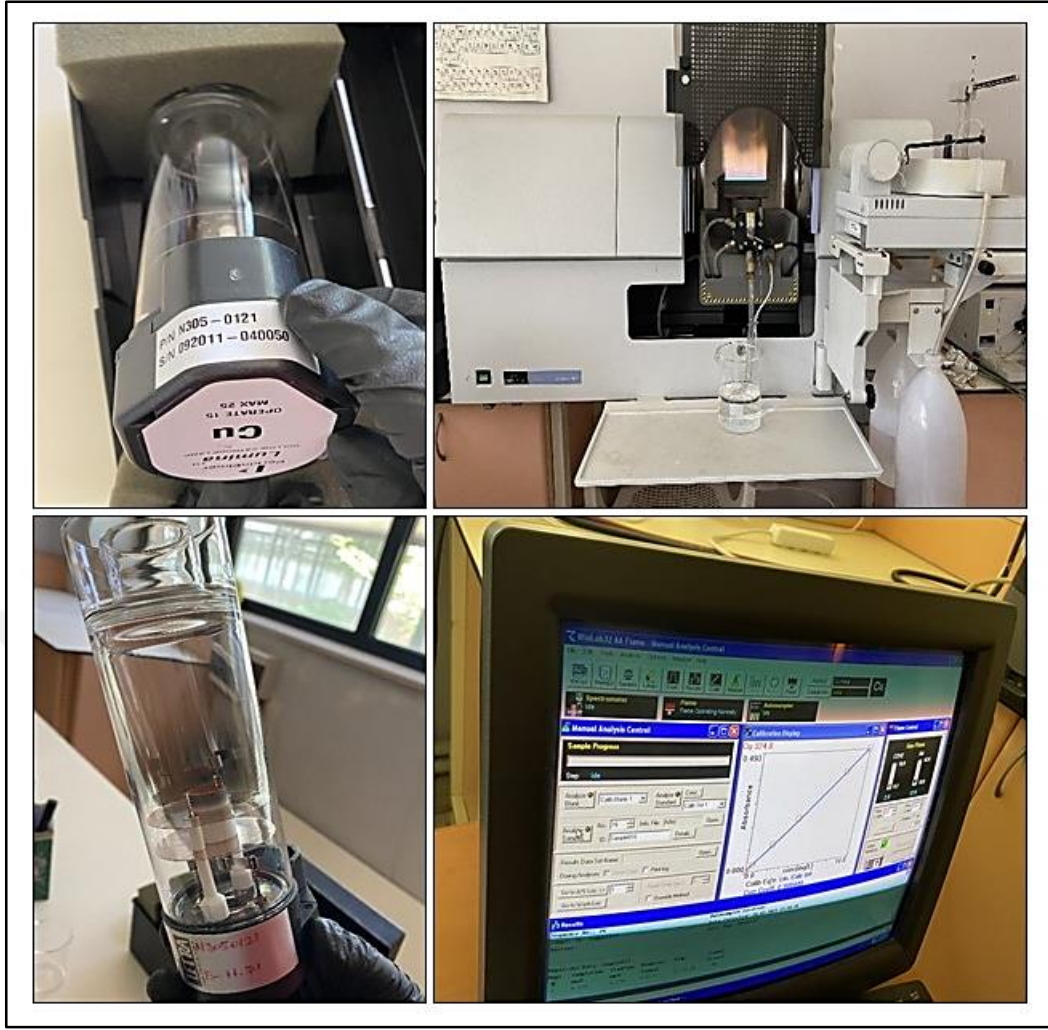
Serum MT-1, MT-2 ve MT-3 düzeylerini belirlemek için, üreticinin talimatlarına göre insan metallotiyonein enzim bağlantılı immünosorbent deney (ELISA) kit protokolüne göre deney prosedürleri uygulandı (Elabscience Biotechnology Inc.), ELISA plak okuyucuda optik dansiteleri 450 nm’de ölçüldü (BioTek Synergy HTX Multimode Reader) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Serum numunelerinde ELISA yöntemi ile metalotiyonein düzeylerinin analizi

Serum Zn ve Cu Düzeylerinin Tayini

Serum Zn ve Cu düzeyleri için kontrol ve hastalardan alınan kan örnekleri 3000 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edildi. Numuneler 1'e 3 oranında Triton X-100 ile seyreltildi. Elde edilen numunelerin serum Zn ve Cu düzeyleri atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS/PerkinElmer Instruments AAnalyst 800) kullanılarak ölçüldü (102) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Serum Cu ve Zn düzeylerinin AAS yöntemi ile analizi

Alkali Comet Tekniği ve Lenfositlerin İzolasyonu

DNA hasar analizi, Singh vd. tarafından belirtilen alkali Comet analiz yöntemine göre belirlendi (103, 104).

Lamların Hazırlanması

Mikrodalga fırında %0.65'lik normal erime noktalı agar (NMA) kontrol edilerek hazırlandı. NMA behere alınıp, lamlar beher içerisine daldırıldı ve ön yüzlerinin NMA ile kaplanması sağlandı. Lamlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 24 saat kurutuldu.

Lenfositlerin İzolasyonu

Sağlıklı kontrol ve hasta bireylerden alınan 100 µL taze kan örnekleri üzerine 100 µL soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) (+4°C) eklendi. 10 dakika boyunca buz üzerinde altüst edilerek bekletildi. Bu süre içerisinde 100 µL Histopaque 1077 tüpün dibine eklendi. Tüpler 1060 devir/dakikada +4°C'de 3 dakika santrifüj edildi. Tüplerin tam ortasında oluşam pembe bulutsu tabakada bulunan lenfositlerden 100 µL alınarak

ependorf tüplere konuldu. Toplanan lenfosit süspansiyonları 37°C’de hazırlanan %0.65’lik düşük erime noktalı agar (LMA) ile pipetaj yapılarak karıştırıldı. LMA ile karıştırılan lenfosit süspansiyonları lama yayıldı ve üzerleri lamelle kapatıldı.

Kontrol bireylerden alınan kan örneklerine H₂O₂ ile muamele edilmesi;

900 µL PBS + 100 µL H₂O₂ + 100 µL izole lenfosit süspansiyonu eklendi

1060 devir/dakikada +4°C’de 3 dakika santrifüj edildi

Eppendorf tüplerin üzerinden 1000 µL’lik kısım alındı ve altta kalan hücre süspansiyonuna 100 µL LMA eklenerek pipetaj yapıldı.

Lamlara yayılan izole lenfosit süspansiyonları buzdolabında agar katılaşmaya kadar bekletildi (20-30 dakika).

Lizis Aşaması

Üstleri lamelle kapatılan lamlar 20-30 dakika buzdolabında bekletildi. Üzerindeki lameller sıyrıldı. Lamlar cam şaleler içerisine sırt sırta dizildi ve üzerine lizis çözeltisi eklendi. Şaleler en az 1 saat buzdolabında bekletildi.

Alkali ile Muamele – Elektroforez Aşaması

Elektroforez tankının alt tabanı tamamen buz ile kaplandı. Tank buzların içerisine oturtuldu. Lamlar tankın içerisine aynı kontrol ve hasta gruplar karışıklı gelecek şekilde yerleştirildi. Lamlar 20 dakika boyunca elektroforez çözeltisinde bekletildi. 20 dakika boyunca 25 V, 300 mA uygulanarak çalıştırıldı. Tüm lamlar +’dan -’ye doğru dizildi.

Nötralizasyon Aşaması

Lamlar nötralizasyon tamponu ile muamele edilmek üzere tekrar cam şalelere dizildi. 3 kez 5 dakika aralıklarla nötralize edildi. Tüm aşamalarda lamlar buzdolabına alındı.

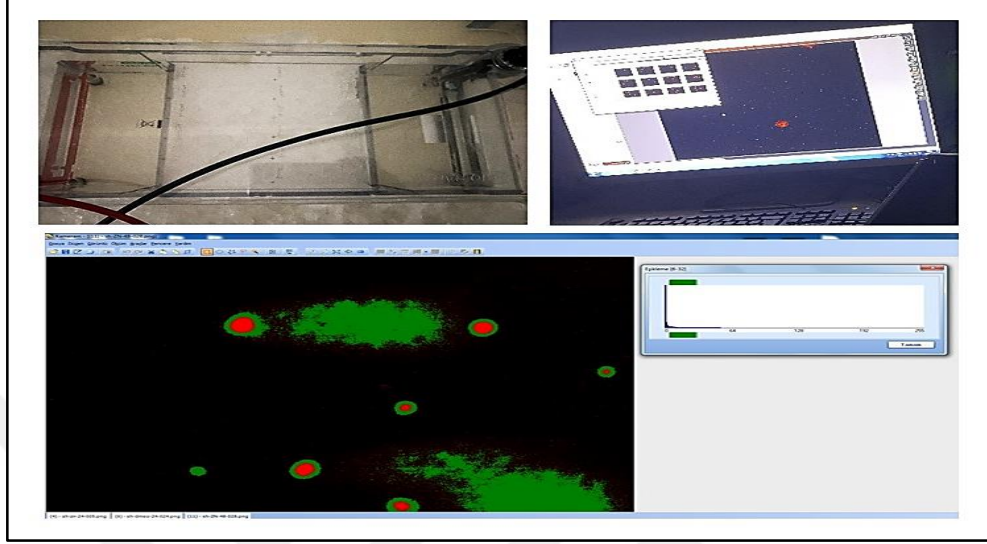
Boyama Aşaması

Lamlar 50 µL etidyum bromür çözeltisi ile boyandı. Lamların üzerine lamel kapatıldı. Lamlar 20-30 dakika boyunca buzdolabında bekletildi. Dolaptan çıkarılıp 5 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi ve analiz yapıldı.

Skorlama

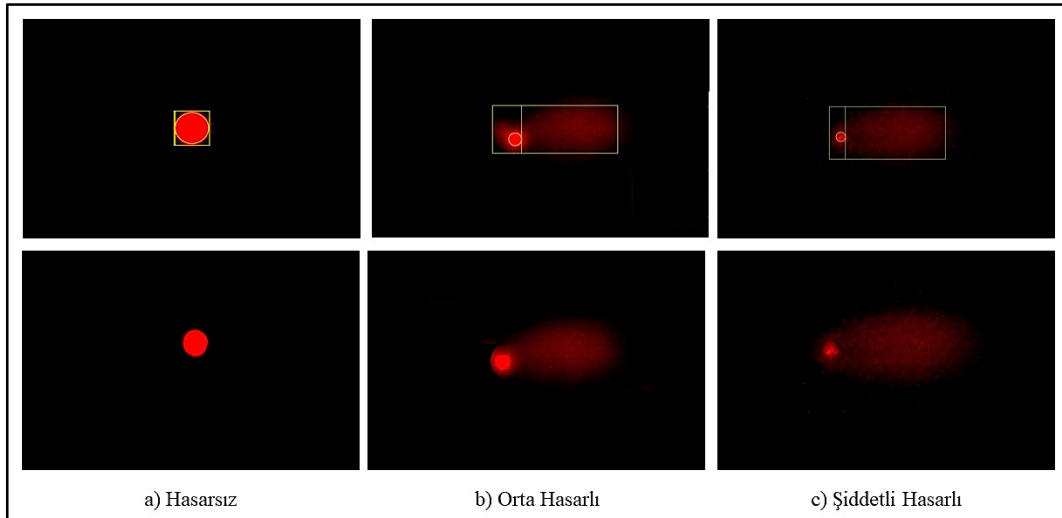
Skorlama işlemi floresans mikroskop (Leica, Almanya) ve Argenit Kameram (Ankara, Türkiye) yazılımı kullanılarak yapıldı. Her lamdan rastgele 50 hücre sayıldı,

grupların kuyruk yoğunluğu (tail intensity/TI), kuyruk uzunluğu (tail length/TL) ve kuyruk momenti (tail moment/TM) parametreleri belirlendi. TI, TL ve TM parametrelerinde meydana gelen artışlar ölçülerek, DNA hasarının varlığı ve oranı belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Comet deneyinin basamakları; slaytların elektroforez tankına dizilimi, DNA hasarının floresans mikroskopla görüntülenmesi ve skorlama

Hücrelerin skorlaması yapılırken hasarsız, orta hasarlı ve şiddetli hasarlı olmak üzere üç gruba ayrıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücrelerin skorlaması hasarsız, orta hasarlı ve şiddetli hasarlı olmak üzere gruplandırıldı (x20, x40, x100)

3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce karbondioksit inkübatörü %70'lik etanol ile silindikten sonra su haznesine 200 mL distile su eklenerek gaz vanası açıldı. 24 saatin sonunda %5 CO₂ ve 37°C'ye sabitlenerek hücreler için uygun ve steril koşullar sağlandı. Çalışma boyunca düzenli olarak temizlenip, su haznesi kontrol edildi. Çalışmada kullanılan serolojik pipetler, pipet uçları, flasklar, enjektörler, şırınga ucu filtreler, falkon tüpleri, mikrosantrifüj tüpleri ve hücre kültürü kapları steril ve tek kullanımlık olacak şekilde kullanıldı.

Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları boyunca kullanılmak üzere önce 37°C'ye ayarlanan su banyosunda; glutamin içeren Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal sığır serumu (FBS) ve Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (PSA) 15 dakika inkübe edilerek uygun sıcaklığa ulaşmaları sağlandı. İnkübasyon sonrasında %70'lik etanol ile silinerek kabin içerisine alındı. 500 mL' lik DMEM içerisine; %10 FBS ve %1 PSA eklenerek besiyeri homojen hale getirildi ve hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Hücre Hatları, Hücrelerin Çözündürülmesi ve Ekimi

Tez çalışmasında kullanılacak hücre hatları; insan nöroblastom (SH-SY5Y) ve insan fibroblast (L929) hücre hatlarıdır. -80°C'den çıkarılan hücre hatları 37°C'de çözündürüldü. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra hücreler laminar güvenlik kabin içerisinde yaklaşık içerisinde 5 mL DMEM bulunan 15'lik falkon tüplere eklendi ve 1300 devir/dakika 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında üst kısım steril serolojik pipet ile alındı. Altta kalan hücre pelleti üzerine 2 mL DMEM eklendi ve köpük oluşturmayacak şekilde pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Besiyeri miktarı 25 cm² flasklar için 5-7 mL, 75 cm² flasklar için ise 12-14 mL olarak ayarlandı. Flaskların üzerine yapılan etiketlemede hücre hattının adı ve hücre ekim tarihi yazıldı ve aktarılan hücrelerdeki hücre yoğunluğu mikroskopla incelendi sonra inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin canlılığı, morfojik görüntüleri ve çoğalma hızları her gün düzenli olarak kontrol edildi.

Test Maddelerinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

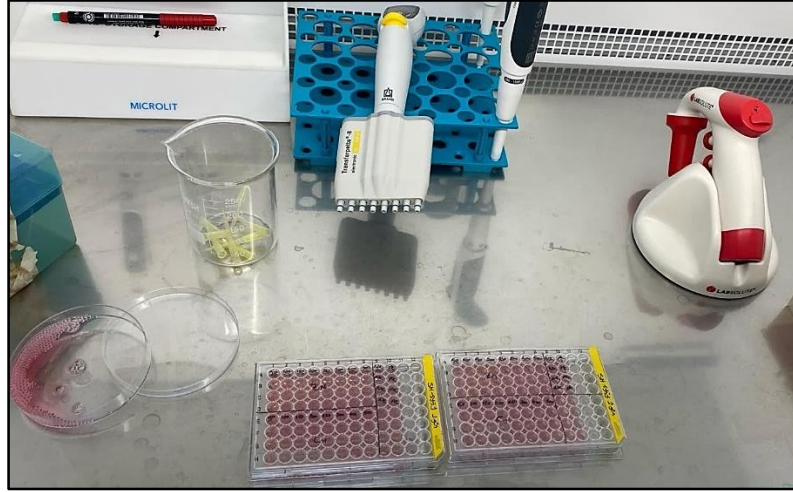
Hücre hatlarına uygulanmak üzere 10 mM'lık ZnSO₄.7H₂O ve CuSO₄ stok konsantrasyonu dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Stok konsantrasyondan hareketle 0-500 µM (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500) arasında olmak üzere dokuz farklı konsantrasyon hazırlandı. Hücrelere uygulanan dozlarda DMSO miktarı 1/1000

olarak belirlendi. Negatif kontrol olarak 1/1000 oranında DMSO içeren DMEM, pozitif kontrol olarak %20 DMSO içeren DMEM kullanıldı. Uygulanacak test maddelerinin solüsyonları her deney tekrarı için taze hazırlandı.

Hücre Canlılığı Tayini: (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil) - 2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum

Hücre kültürü çalışmalarında uygulanan maddelerin hücre canlılığına etkilerinin belirlenmesinde kolorimetrik yöntemlerden biri olan (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) testi kullanıldı (105). MTS testi için ilk olarak MTS reaktifinden 0.084 g tartıldı ve ışıktan korunması için alüminyum folyo ile falkon tüpün etrafı sarıldı. Falkon tüpün üzerine 43 mL PBS eklendi ve vorteks ile MTS'nin çözünmesi sağlandı. 0.02 g fenazin meta sülfat (PMS) tartıldı ve 2.1 mL PBS eklenerek vortekslendi. Sonrasında PMS solüsyonu MTS içeren falkon tüpe aktarılarak tüm solüsyon vortekslendi. 0.2 µm'lık filtreden geçirilerek yaklaşık 5 mL olacak şekilde falkon tüplere ayrıldı. Ayrılan MTS solüsyonları -20°C'de muhafaza edildi. Tüm çalışmalar laminar flow kabinde ve karanlık ortamda yapıldı.

96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına ZnSO₄.7H₂O ve CuSO₄, 0-500 µM (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500) arasında olmak üzere dokuz farklı konsantrasyonda uygulandı. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına test maddeleri uygulandı. Test maddelerinin uygulanmasından 24 saat öncesinde yaklaşık olarak her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 4 adet 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına ekildi (Şekil 3.5). 24 saatin sonunda ZnSO₄.7H₂O ve CuSO₄, 0-500 µM dozlarında uygulandı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki besyeri aspiratör cihazı ile aspire edildi. MTS solüsyonu her bir kuyucuğa eşit olarak dağıtıldı. Kuyucuklardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.



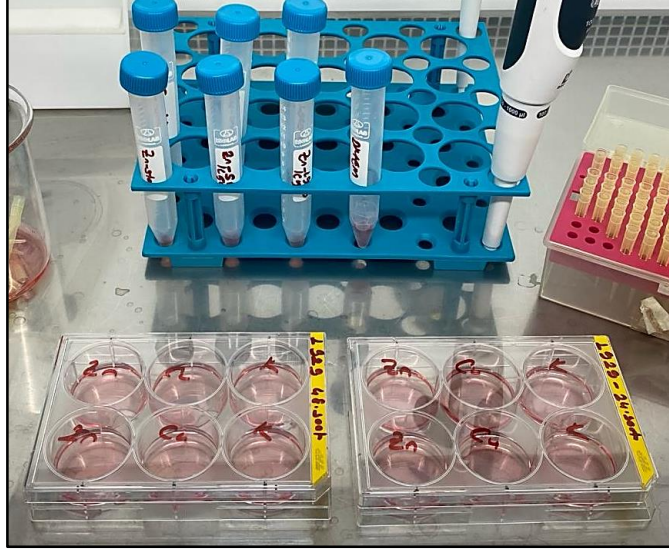
Şekil 3.5. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarının 96 kuyucuklu steril hücre kültürü kabına ekimi

Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer % 100 hücre canlılığı olarak kabul edildi. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4$ tuzları için her bir konsantrasyon 4 tekrarlı olarak çalışıldı. Her bir grup için hücre canlılığının %50'sinin inhibe olduğu dozlar (IC_{50}) belirlendi. 24. ve 48. saatin sonunda MTS testi uygulandı. Tüm MTS testi boyunca laminar flow kabinin ışığı ve laboratuvarın ışıkları kapatıldı.

Gen Ekspresyonu Analizi

MT-IIA, *MT-III*, *MTF-I*, *MRE-11* genlerinin ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile belirlenebilmesi için sırasıyla 6 kuyucuklu hücre kabına hücre ekimi ve IC_{50} konsantrasyonlarını uygulamayı takiben mRNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR analizi yapıldı (106) (Şekil 3.6).

Protokole göre T-75 flasklarda belirli yoğunlukta olan hücreler öncelikle tripsin ile kaldırıldı. 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 5×10^5 hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. Hücrelerin mikroskoptaki görüntüleri incelendikten sonra plakların tabanına tutunması için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tabana tutunan hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek belirlenen IC_{50} konsantrasyonları hücre plaklarına uygulandı. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri kullanıldı. 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakları inkübatöre kaldırılarak 24 saat inkübe edildi.



Şekil 3.6. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarının 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına hücre ekimi ve test maddelerinin uygulanması

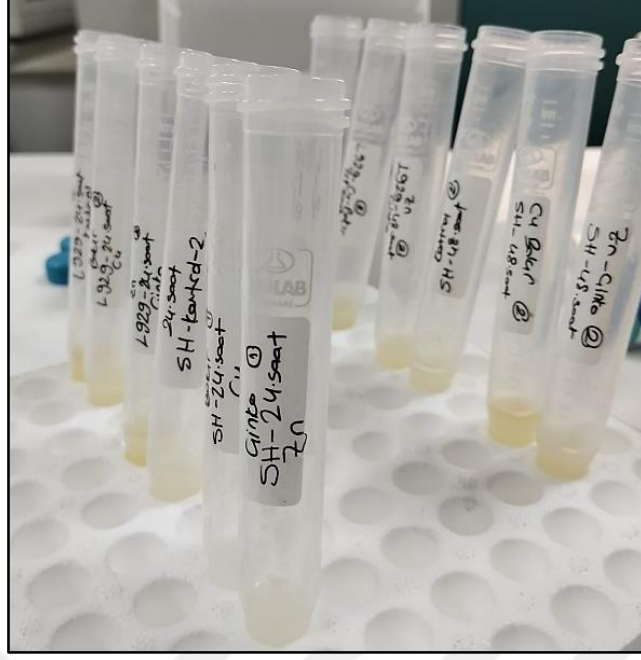
mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu One Step RNA Reagent (BioBasic) protokolü doğrultusunda yapıldı (107) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. mRNA izolasyonu için hazırlanan hücre süspansiyonları

Protokole göre 6 kuyucuklu hücre plaklarının her birine 1 mL One Step RNA Reagent eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.8).



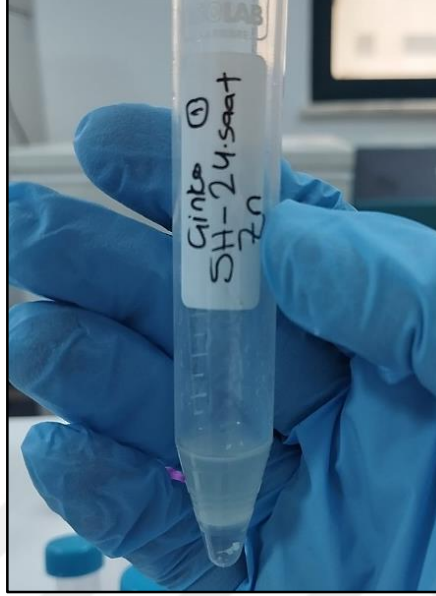
Şekil 3.8. Hücre süspansiyonlarına One Step RNA Reagent eklenerek inkübe edilmesi

Hücre süspansiyonu üzerine 200 μ L kloroform eklendi ve pembe renk elde edilene kadar vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu takiben 4°C’de 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Hücre süspansiyonu en üst şeffaf faz mRNA, orta beyaz faz DNA, alt faz protein olmak üzere 3 faza ayrıldı. mRNA’nın bulunduğu üst fazlar alınarak steril ependorf tüplere aktarıldı (Şekil 3.9).



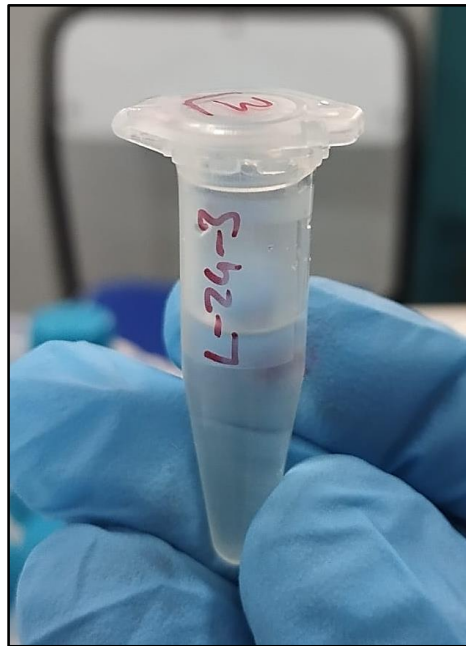
Şekil 3.9. Hücre süspansiyonu fazları

Ependorf tüplere 500 μ L izopropil alkol eklenerek alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu takiben 4°C’de 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.10).



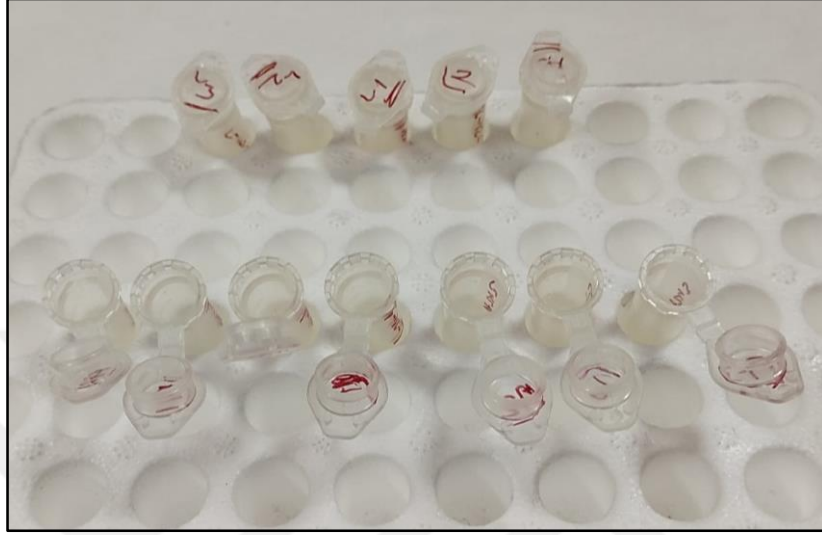
Şekil 3.10. mRNA fazının izopropil alkolle inkübe edilmesi

Süpernatant kısmı atılarak kalan pelletin üzerine 1 mL %70’lik etanol eklenerek 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. mRNA pelletinin %70’lik etanolle yıkanması

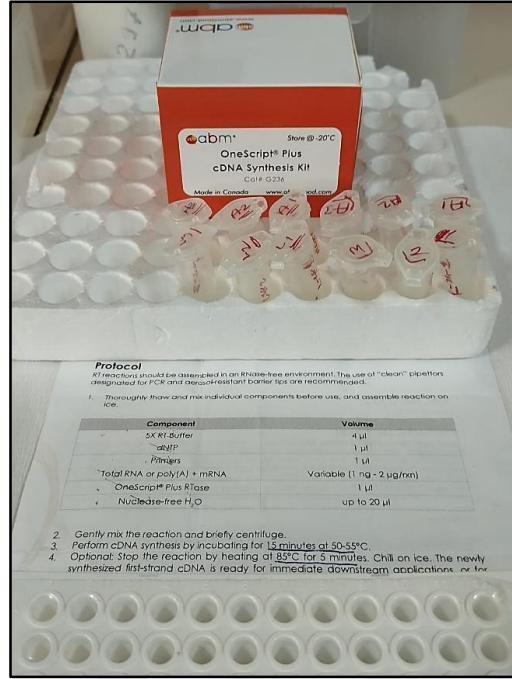
Süpernatant kısmı pipetle alınarak kalan pelletten etanolün uzaklaştırılması için ependorf tüpler kapakları açık bir şekilde 20 dakika inkübe edildi (Şekil 3.12). mRNA pelleti üzerine 20 µL RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek ve pipetaj yapılarak çözdürüldü.



Şekil 3.12. mRNA pelletinden etanolün uzaklaştırılması ve pelletin kurutulması

cDNA Sentezi

İzole edilen mRNA'lardan yapılan cDNA sentezi OneScript Plus cDNA sentez kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi (108) (Şekil 3.13). 5 µL alınan mRNA üzerine; 4 µL 5x RT Buffer, 1 µL dNTP, 1 µL Oligo (dT), 1 µL OneScript Plus RTase ve 8 µL RNaz-DNaz içermeyen su eklendi. 55°C' de 15 dakika ve 85°C' de 5 dakika inkübe edilerek cDNA'lar sentezlendi (Roche LightCycler® 480). RT-PCR analizi yapmak üzere -20°C' de muhafaza edildi.



Şekil 3.13. İzole edilen mRNA'lardan cDNA sentezi

RT-PCR Analizi

RT-PCR analizi sentezlenen cDNA örneklerinden BlasTaq 2X qPCR MasterMix kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi (109). RT-PCR analizinde kullanılan *MT-IIA*, *MT-III*, *MTF-I*, *MRE-11* ve referans gen olan β -actin primerleri (Bio Basic Canada) OriGene'den alınarak sentezlendi (Tablo 3.1). Bir kuyucuğa sırasıyla; 10 μ L BlasTaq 2X qPCR, 8 μ L RNaz-DNaz içermeyen su, 1 μ L Primer ve 1 μ L cDNA eklendi. RT-PCR çalışma protokolü ise enzim aktivasyonu için 95°C'de 3 dakika 1 döngü, denatürasyon için 95°C'de 15 saniye 40 döngü ve 60°C'de 1 dakika 40 döngü olarak hazırlandı (Roche LightCycler[®] 480). PCR verilerinin analizi GeneGlobe Data Analysis (Qiagen) programında 2['] $\Delta\Delta$ CT metodu kullanılarak yapıldı. Gen ekspresyonunun karşılaştırılmasında ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi.

Tablo 3.3. Sentezlenen primer dizileri

Genler	Primer dizisi
<i>β-actin</i>	F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
	R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
<i>MT-IIA</i>	F: GAGTGCAAATGCACTTCGTGCAA
	R: GCGTTCTTTACATCTGGGAGCG
<i>MT-III</i>	F: CAAGTGCGAGGGATGCAAATGC
	R: GCACTTCTCTGCTTCTGCCTCA
<i>MTF-I</i>	F: GAGGCTTCACACAGGGAAAACG
	R: GCTTTTCCACAGCCATCGTGATC
<i>MRE-11</i>	F: CAGCAACCAACAAAGGAAGAGGC
	R: GAGTTCCTGCTACGGGTAGAAG

Hücre Kültürü Çalışmalarında Alkali Comet Tekniği

T-75 flaskta çoğaltılan SH-SY5Y ve L929 hücre hatları hemositometre ile sayıldıktan sonra 15 mL'lik falkon tüplerde test maddelerine maruz bırakılarak tripsin ile kaldırıldı. Test maddelerinin belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları taze besiyerinde 2 mL son konsantrasyon olacak şekilde hazırlandı. Falkonların üzerine gerekli kodlamalar yapıldı. Her bir falkonda yaklaşık 200.000/2 mL hücre eklendi ve pipetaj yapılarak falkon içerisine hücrelerin homojen dağılması sağlandı. 24 ve 48 saat için farklı falkonlar hazırlandı. 24 saatin sonunda; Zn, Cu, DMSO ve sadece besiyeri ile muamele edilen hücre hatları üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı. Taze besiyeri eklenerek hücrelere pipetaj yapıldı ve homojen dağılmaları sağlandı. Her bir test maddesine ait lamda 30.000-40.000 hücre olacak şekilde LMA ile hücreler karıştırılarak NMA'lı lamlara yayıldı. Üzerine lamel kapatıldı ve agar katılaşınca kadar tüm lamlar buzdolabında bekletildi.

Hücre hatlarına H₂O₂ muamelesi yapılması için öncelikle %30'luk H₂O₂ çözeltisinden 11.5 µL alınıp distile su ile 1 mL'ye tamamlanarak 0.1 M çözelti elde edildi. 0.1 M'lık çözeltiden 10 µL alındı ve PBS ile 1 mL'ye tamamlandı. 1 mM'lık H₂O₂ çözeltisinden 50 µL alındı ve 950 µL PBS eklenerek 50 µM'lık H₂O₂ çözeltisi hücrelere muamele edilmek üzere hazırlandı. Mikro santrifüj tüplerine 1 mL PBS eklendi. Üzerinden 100 µL alındı ve hücre pelletlerinin bulunduğu falkon tüpten 100 µL hüce ilave edildi, üzerine 100 µL 50 µM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. 5 dakika buzdolabında

bekletildi. Süre sonunda 1060 devir/dakika 4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi. Üstteki kısım uzaklaştırılarak kalan hücreler LMA ile karıştırılıp lamlara yayıldı.

Lizis Aşaması

Katılan lamların üzerindeki lameller sıyrıldı. Lamlar cam şaleler içerisine sırt sırt dizildi ve üzerine lizis çözeltisi eklendi. Şaleler en az 1 saat buzdolabında bekletildi.

Elektroforez Aşaması

Elektroforez tankı getirilmeden önce alt tabanı tamamen buz ile kaplandı. Tank buzların içerisine oturtuldu. Lamlar tankın içerisine aynı maddeler karşılıklı gelecek şekilde yerleştirildi. Lamlar 20 dakika süresince elektroforez çözeltisinde 25 V, 300 mA uygulanarak bekletildi. Tüm lamlar +'dan -'ye doğru dizildi.

Nötralizasyon Aşaması

Lamlar nötralizasyon tamponu ile muamele edilmek üzere tekrar cam şalelere dizildi. 3 kez 5 dakika aralıklarla nötralize edildi. Tüm aşamalarda lamlar buzdolabına alındı.

Boyama Aşaması

Lamlar 50 µL etidyum bromür çözeltisi ile boyandı. Lamların üzerine lamel kapatıldı. Lamlar 20-30 dakika boyunca buzdolabında bekletildi. Dolaptan çıkarılıp 5 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi ve analiz edildi.

Skorlama

Skorlama işlemi floresans mikroskop (Leica, Almanya) ve Argenit Kameram (Ankara, Türkiye) yazılımı kullanılarak yapıldı. Her lamdan rastgele 25 hücre sayıldı, grupların kuyruk yoğunluğu (tail intensity/TI), kuyruk uzunluğu (tail length/TL) ve kuyruk momenti (tail moment/TM) parametreleri belirlendi. TI, TL ve TM parametrelerinde meydana gelen artışlar DNA hasarı varlığının ve oranının belirlenmesine yardımcı oldu.

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler ortalama±standart sapma, ortanca (min-max) ve sayı (yüzde) ile özetlendi. Normal dağılıma uygunluk Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı. İstatistiksel analizlerde Mann-Whitney U, iki örneklem t-testi (independent sample t-test), Pearson Ki-Kare testi, Yates Düzeltmeli Ki-Kare Testi ve Fisher Kesin Ki-Kare testi uygun olan yerlerde kullanıldı. Değişkenler arası ilişki, pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir. Tanı için sınıflama performanslarının ve ilgili değişkenler için en uygun kesim noktalarının tespitinde ROC analizi uygulandı. ROC analizi uygulamasında İnönü

Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim dalı tarafından geliştiren DTROC web-tabanlı uygulaması kullanıldı (110). Diğer analizlerde IBM SPSS Statistics 26.0 programı kullanıldı. Odds oranı kestirimleri için lojistik regresyon analizi uygulanmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi

4.1.1. Çalışmaya dahil edilen hasta bireylerin demografik özellikleri

Çalışmaya MS tanısı almış 70 birey dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hasta bireylerin teşhis yılı ortalama 8.3 ± 5.6 bulundu. Hasta bireylerin EDSS (Expanded Disability Status Scale – Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği) skorlarının ortalaması 2.8 ± 1.4 bulundu. Hasta grubunun %78.3’ünde hastalıkla ilgili aile öyküsüne rastlanmadı. Hasta bireylere uygulanan ilaç tedavileri arasında Fingolimod (%42) ilk sırada yer almaktadır. Hasta grubunun %78.3’ünde ikincil bir kronik hastalık bulunmamaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen MS grubunun demografik özellikleri

		Ortalama \pm SS	Medyan (Min-Max)
	Teşhis Yılı	8.3 \pm 5.6	8.0 (1.0-25.0)
	EDSS Skoru	2.8 \pm 1.4	2.0 (1.5-6.0)
		Sayı	Yüzde (%)
Aile Öyküsü	Hayır	54	78.3
	Evet	15	21.7
Hastaların Kullandığı İlaçlar	Dimetil Fumarat	12	17.4
	İnterferon Beta-1a	3	4.3
	Okrelizumab	10	14.5
	Natalizumab	5	7.2
	Fingolimod	29	42.0
	Fampiridin	4	5.8
	Klabridin	3	4.3
	Teriflunomid	2	2.9
	Mitoksantron	1	1.4
Kronik Hastalık	Hayır	54	78.3
	Evet	15	21.7

(EDSS: Expanded Disability Status Scale – Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği)

4.1.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması

Çalışmaya 70 MS hastası ve 30 kontrol birey dahil edildi. MS grubunun yaş ortalaması kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.039$). MS grubunun kilo ortalaması ve kontrol grubunun kilo ortalaması arasında istatistiksel olarak

anlamli bir fark bulunmadı. MS grubunun serum Cu ($p=0.019$), MT-1 ($p<0.001$), MT-2 ($p=0.003$) ve MT-3 ($p<0.001$) düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamli olarak daha yüksek bulunurken, Zn ($p<0.001$) düzeyleri düşük bulundu. Değişkenler üzerine cinsiyet ve sigara kullanımının etkisinin olmadığı gözlemlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol ve MS grubunun karşılaştırılması

		Grup				p-değeri
		Kontrol		MS		
		Medyan		Medyan		
		Ortalama±SS	(Min-Max)	Ortalama±SS	(Min-Max)	
Yaş		34.03±8.92	33 (21-60)	38.17±10.39	38 (20-66)	0.039*
Kilo		64.07±14.26	65 (22-90)	69.2±12.65	70 (46-108)	0.088*
Cu (ppm)		0.23±0.06	0.21 (0.13-0.42)	0.26±0.09	0.25 (0.07-0.58)	0.019**
Zn (ppm)		0.22±0.04	0.21 (0.15-0.32)	0.14±0.04	0.13 (0.07-0.23)	<0.001**
MT-1 (ng/mL)		1.44±0.47	1.44 (0.62-2.28)	1.82±0.31	1.84 (1.08-2.39)	<0.001*
MT-2 (ng/mL)		3.89±1.93	4.01 (0.24-8)	6.21±3.61	5.59 (1.83-21.15)	0.003**
MT-3 (ng/mL)		0.37±0.23	0.35 (0.04-1.23)	0.58±0.32	0.6 (0.05-1.47)	<0.001**
		Sayı	Yüzde (%)	Sayı	Yüzde (%)	
Cinsiyet	Erkek	6	20.0%	18	26.1%	0.411***
	Kadın	24	80.0%	51	73.9%	
Sigara Kullanımı	Hayır	19	63.3%	51	73.9%	0.693***
	Evet	11	36.7%	18	26.1%	

*: İki Örneklem t-testi; **: Mann-Whitney U testi; ***: Yates Düzeltmeli Ki-Kare testi. (MS: Multiple skleroz, MT-1: Metalloiyonein-1, MT-2: Metalloiyonein-2, MT-3: Metalloiyonein-3).

Kontrol ve MS grubunda biyobelirteçler arasındaki korelasyonlar Tablo 4.3.'te verilmiştir. Kontrol grubunda Zn düzeyi ile MT-2 arasında ($r_s = -0.371$, $p=0.043$) negatif bir korelasyon bulundu. MS grubunda yaş ile kilo arasında ($r_s=0.328$, $p=0.006$) ve yaş ile Zn düzeyi arasında ($r_s=0.272$, $p=0.024$) pozitif korelasyon bulundu. Kilo ile Zn düzeyi arasında ($r_s=0.412$, $p<0.001$) ve Cu düzeyi ile MT-2 arasında ($r_s=0.291$, $p=0.044$) pozitif korelasyon bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kontrol ve MS grubunda değerlendirilen parametreler arasındaki korelasyonlar

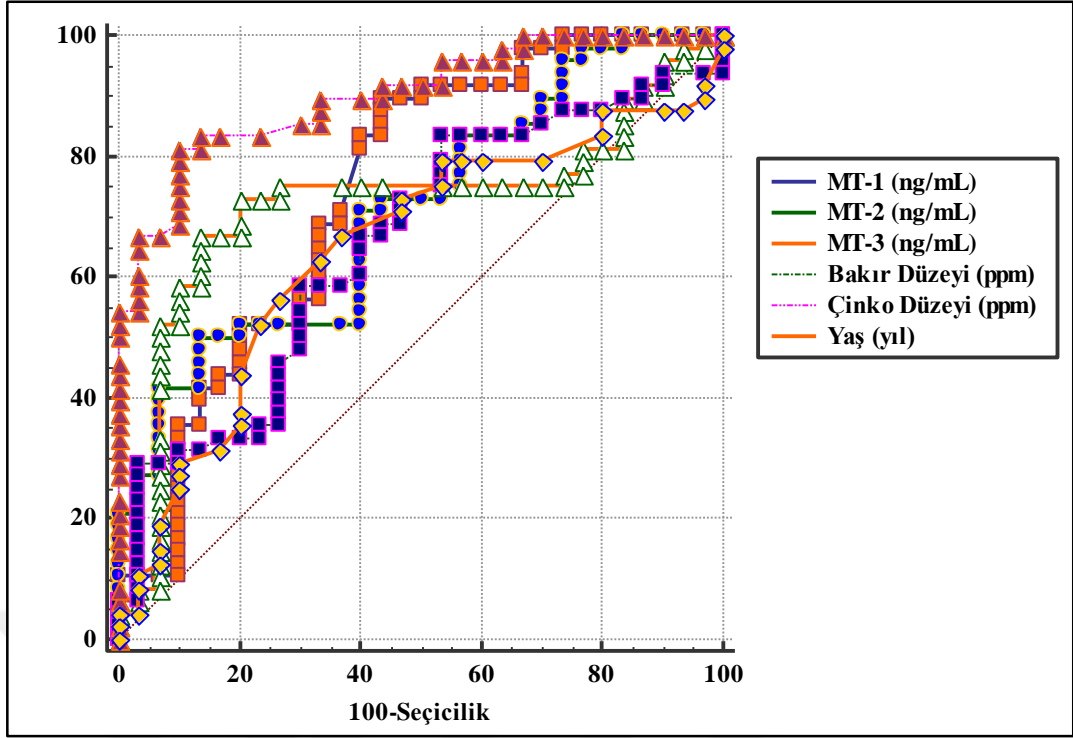
			Kilo	Cu (ppm)	Zn (ppm)	MT-1 (ng/mL)	MT-2 (ng/mL)	MT-3 (ng/mL)	
Kontrol	Yaş	rs	0.241	-0.280	-0.333	-0.086	0.074	0.240	
		p	0.200	0.133	0.073	0.653	0.698	0.201	
	Kilo	rs		-0.095	-0.025	-0.146	0.148	0.031	
		p		0.619	0.895	0.442	0.435	0.871	
	Cu (ppm)	rs			0.188	-0.150	-0.066	-0.331	
		p			0.320	0.429	0.730	0.074	
	Zn (ppm)	rs				-0.003	-0.371	0.076	
		p				0.987	0.043	0.690	
	MT-1 (ng/mL)	rs					-0.106	0.073	
		p					0.577	0.703	
	MT-2 (ng/mL)	rs						0.197	
		p						0.296	
	MS	Yaş	rs	0.328	0.086	0.272	0.074	0.169	0.276
			p	0.006	0.483	0.024	0.619	0.251	0.058
Kilo		rs		0.176	0.412	0.180	0.125	-0.064	
		p		0.147	<0.001	0.221	0.397	0.667	
Cu (ppm)		rs			0.073	0.103	0.291	-0.107	
		p			0.552	0.484	0.044	0.468	
Zn (ppm)		rs				-0.021	0.128	-0.078	
		p				0.889	0.386	0.600	
MT-1 (ng/mL)		rs					0.009	-0.134	
		p					0.951	0.363	
MT-2 (ng/mL)		rs						-0.038	
		p						0.799	

Biyobelirteçlerin öngörüsül değerini belirlemek için ROC analizi yapıldı (Tablo 4.4). Cu düzeyi (AUC=0.650; %95 CI, 0.547-0.743; p=0.011), Zn düzeyi (AUC=0.931; %95 CI, 0.861-0.972; p<0.001), MT-1 (AUC=0.742; %95 CI, 0.630-0.834; p<0.001), MT-2 (AUC=0.708; %95 CI, 0.594-0.806; p<0.001), MT-3 (AUC=0.723; %95 CI, 0.610-0.818; p<0.001), yaş (AUC=0.631; %95 CI, 0.528-0.726; p=0.028) şeklinde bulundu. Bu belirteçlerin MS hastalığını öngörmeye etkili olduğu gözlemlendi. Ancak kilodaki değişim (AUC=0.608; %95 CI, 0.505-0.705; p=0.085) MS hastalığını öngörmeye yeterli hassasiyete sahip değildir.

Tablo 4.4. Biyobelirteçlerin öngörüsöl değerini gösteren ROC analizi

Değişkenler	Kesim Noktası	Duyarlılık	Seğicilik	LR+	LR-	PPV	NPV	AUC (95%CI)	p-değeri
Cu	0.206	81.16 (69.9-89.6)	46.67 (28.3-65.7)	1.52	0.40	77.8	51.9	0.650 (0.547-0.743)	0.011
Zn	0.183	86.96 (76.7-93.9)	90.00 (73.5-97.9)	8.70	0.14	95.2	75.0	0.931 (0.861-0.972)	<0.001
Kilo	67	59.42 (46.9-71.1)	63.33 (43.9-80.1)	1.62	0.64	78.8	40.4	0.608 (0.505-0.705)	0.085
MT-1	1.46	89.58 (77.3-96.5)	56.67 (37.4-74.5)	2.07	0.18	76.8	77.3	0.742 (0.630-0.834)	<0.001
MT-2	5.56	50.00 (35.2-64.8)	86.67 (69.3-96.2)	3.75	0.58	85.7	52.0	0.708 (0.594-0.806)	<0.001
MT-3	0.45	66.67 (51.6-79.6)	86.67 (69.3-96.2)	5.00	0.38	88.9	61.9	0.723 (0.610-0.818)	<0.001
Yaş	37	53.62 (41.2-65.7)	73.33 (54.1-87.7)	2.01	0.63	82.2	40.7	0.631 (0.528-0.726)	0.028

AUC: eğrının altındaki alan, LR-:negatif olabirlik oranı, LR+: pozitif olabirlik sonucu, NPV: negatif tahmin değeri, PPV: pozitif tahmin değeri
a Koyu punto $p < 0.05$ göstermektedir.



Şekil 4.1. Bakır, çinko, MT-1, MT-2, MT-3 düzeyleri ve yaş için ROC eğrisi

Metallotiyonein-1'in değeri 1 birim arttığında MS riski 17.626 kat artmaktadır. MT-2 değişkeninin değeri 1 birim arttığında MS riski 1.594 kat artmaktadır. MT-3 değişkeninin değeri 1 birim arttığında ise MS riski 31.345 kat artmaktadır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Odds oranı.

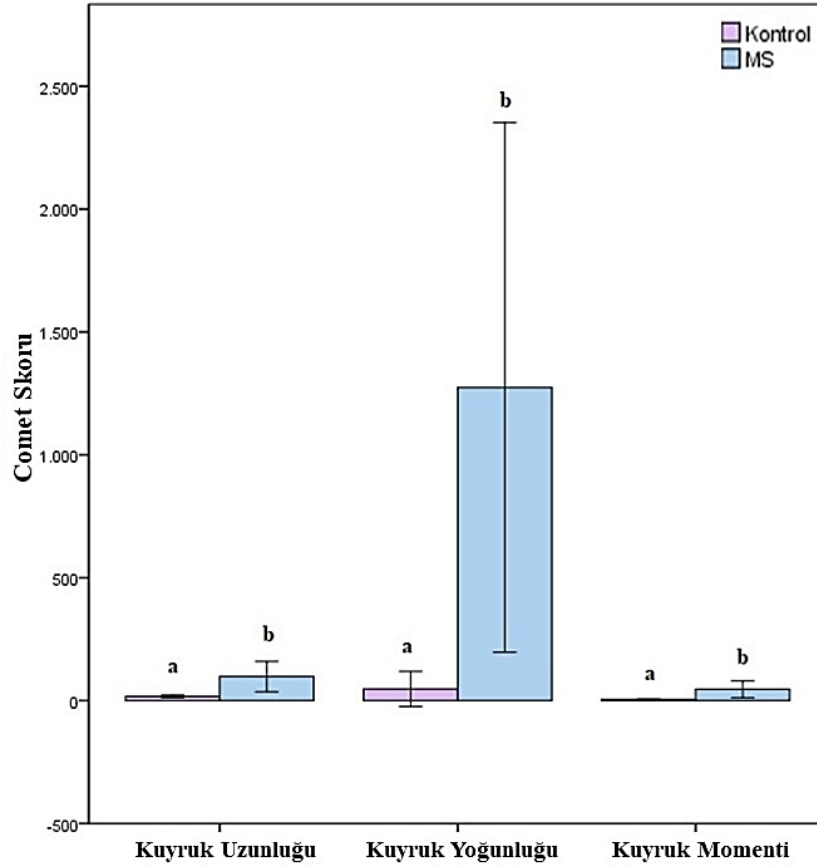
Denklemdaki Değişkenler	Odds Oranı	Odds Oranı için %95 Güven Aralığı		p-değeri
		Alt Sınır	Üst Sınır	
MT-1 (ng/mL)	17.626	3.221	96.462	0.001
MT-2 (ng/mL)	1.594	1.151	2.208	0.005
MT-3 (ng/mL)	31.345	2.112	465.233	0.012

Kontrol ve MS grubundan alınan taze kan örneklerinden lenfosit izolasyonu yapılarak alkali comet yöntemi ile DNA hasarı belirlendi. Kontrol ve MS grubunun kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kontrol ve MS grubu bireylerde comet analiz sonuçları

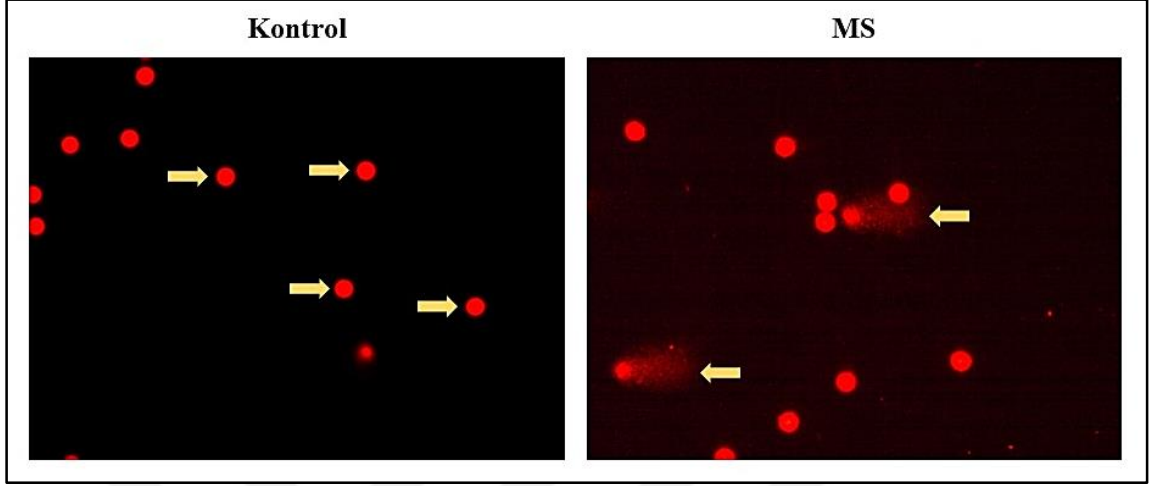
	Grup				p-değeri
	MS		Kontrol		
	Mean±SD	Median (Min-Max)	Mean±SD	Median (Min-Max)	
Kuyruk Uzunluğu	98±61.89	94 (16-446)	17.28±6.35	16 (10-52)	<0.001
Kuyruk Yoğunluğu	1274.15±1077.15	1057.49 (68.62-4610.57)	47.29±71.42	33.83 (11.86-527.26)	<0.001
Kuyruk Momenti	46.06±34.15	44.96 (2.35-227.86)	4.12±3.69	3.3 (1.24-26.72)	<0.001

Hasta grubunda DNA hasar parametrelerinden üçüde kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kontrol ve MS grubu bireylerde comet analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Kontrol ve MS bireylerden alınan kan örneklerine ait comet görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Kontrol grubu bireylerde hücre DNA'sında herhangi bir hasar gözlenmedi. MS'li bireylerde belirli düzeyde DNA hasarı gözlemlendi.

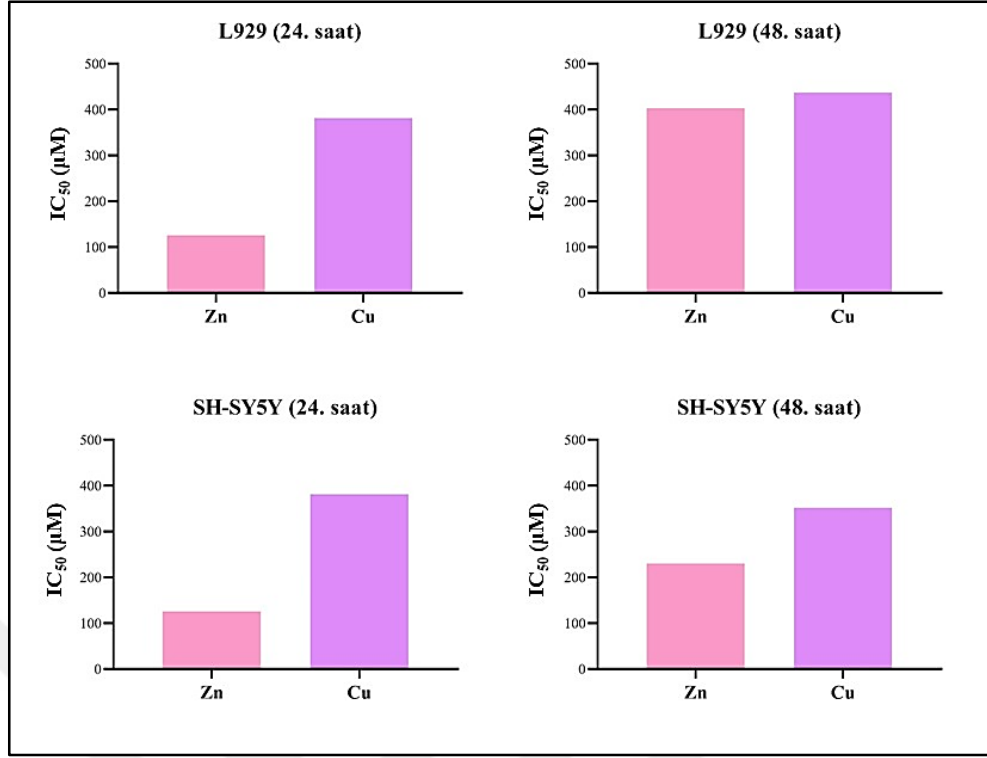


Şekil 4.3. Kontrol ve MS grubunda DNA hasarı (x40)

4.2. İn vitro Analizlerin Değerlendirilmesi

4.2.1. Hücre Canlılığı Tayini

SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına uygulanan test maddelerinin IC_{50} değerleri MTS yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına uygulanan test maddelerinin IC₅₀ konsantrasyonları

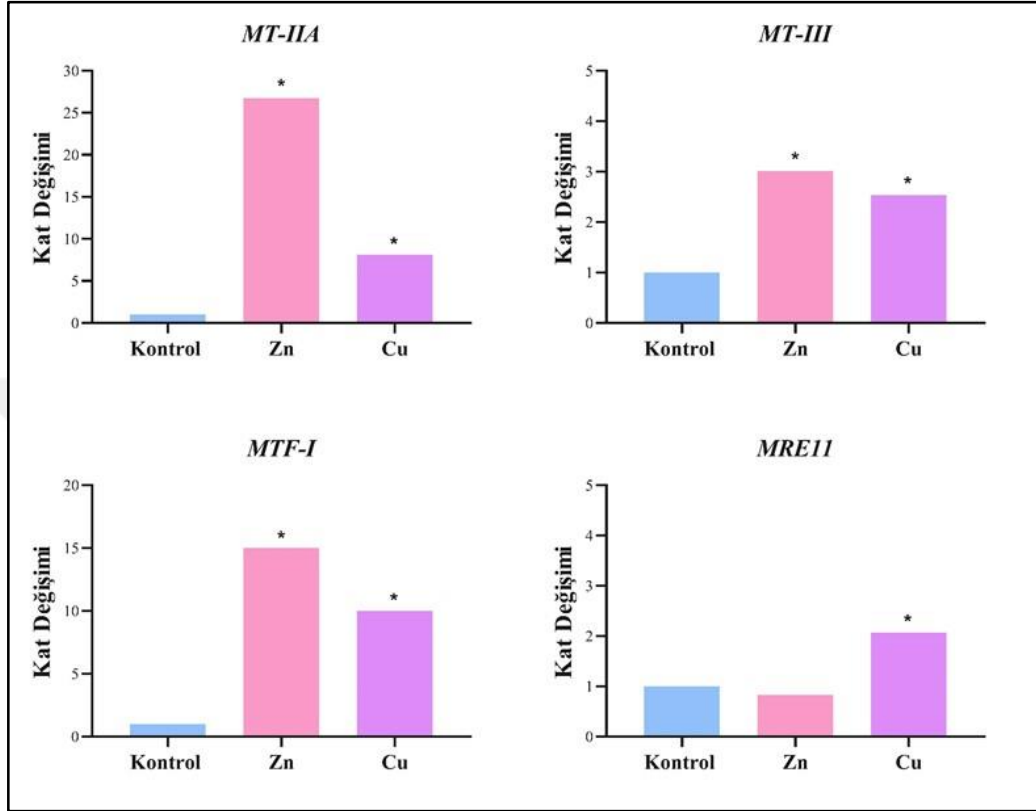
24 saat süreyle SH-SY5Y hücre hattına Cu ve Zn, 0-500 µM arasında konsantrasyonlarda uygulandı. SH-SY5Y hücre hattında IC₅₀ değerleri 24 saat süreyle Cu ve Zn için sırasıyla 381 µM ve 126.2 µM; 48 saat süreyle ise 351.5 µM ve 230.5 µM bulundu. L929 hücre hattında IC₅₀ değerleri 24 saat süreyle Cu ve Zn için sırasıyla 696.6 µM ve 379 µM; 48 saat süreyle ise 437 µM ve 403.3 bulundu. IC₅₀ konsantrasyonlarına ait sayısal değerler Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7. SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına uygulanan test maddelerinin IC₅₀ değerleri

IC ₅₀ Değerleri (µM)		
24. saat	Zn	Cu
SH-SY5Y	126.2	381
L929	379	696.6
48. saat	Zn	Cu
SH-SY5Y	230.5	351.5
L929	403.3	437

4.2.2. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları

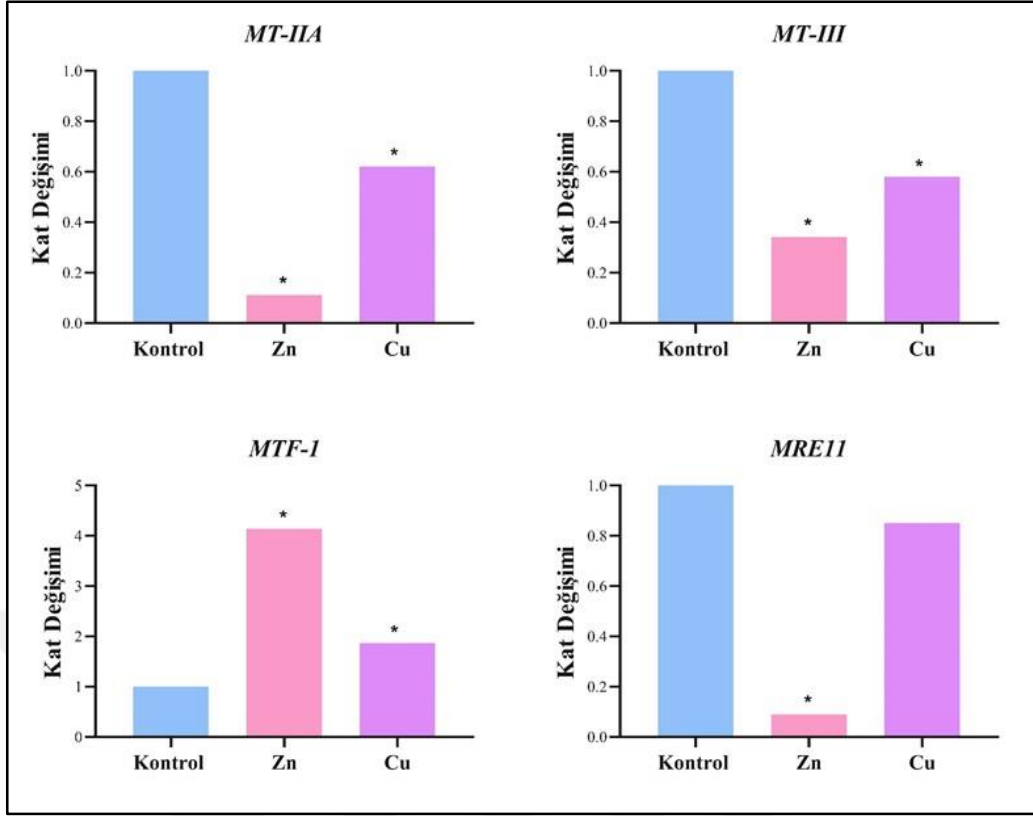
L929 hücre hattında 24 saatteki gen ekspresyon sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. L929 hücre hattında 24. saatte gen ekspresyonları

Zn uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MT-IIA*, *MTIII*, *MTF-1* gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak artarken, *MRE11* gen ekspresyon seviyesi azaldı. Cu uygulaması sonucunda ise *MT-IIA*, *MTIII*, *MTF-1* ve *MRE11* gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$).

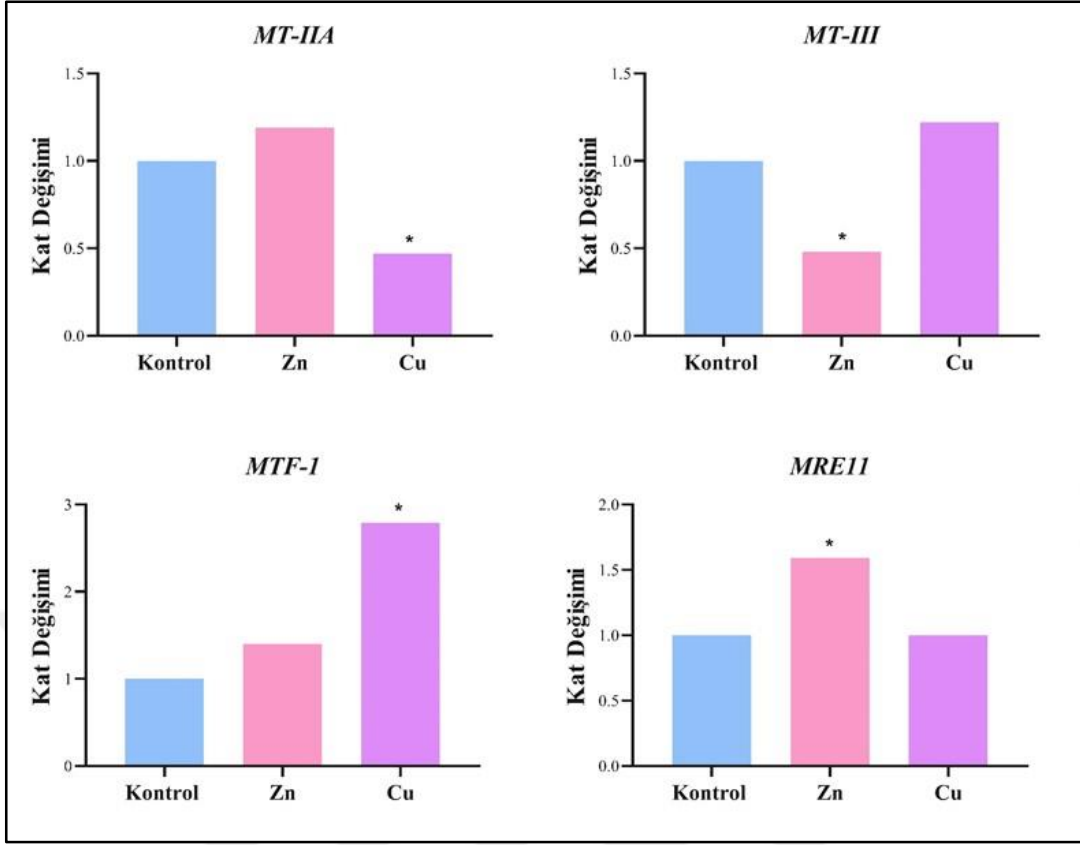
L929 hücre hattında 48 saatteki gen ekspresyon sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. L929 hücre hattında 48. saatte gen ekspresyonları

Zn uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MT-IIA*, *MTIII* ve *MRE11* gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak azalırken, *MTF-1* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak arttı. Cu uygulaması sonucunda ise *MT-IIA* ve *MTIII* gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak azalırken, *MTF-1* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$).

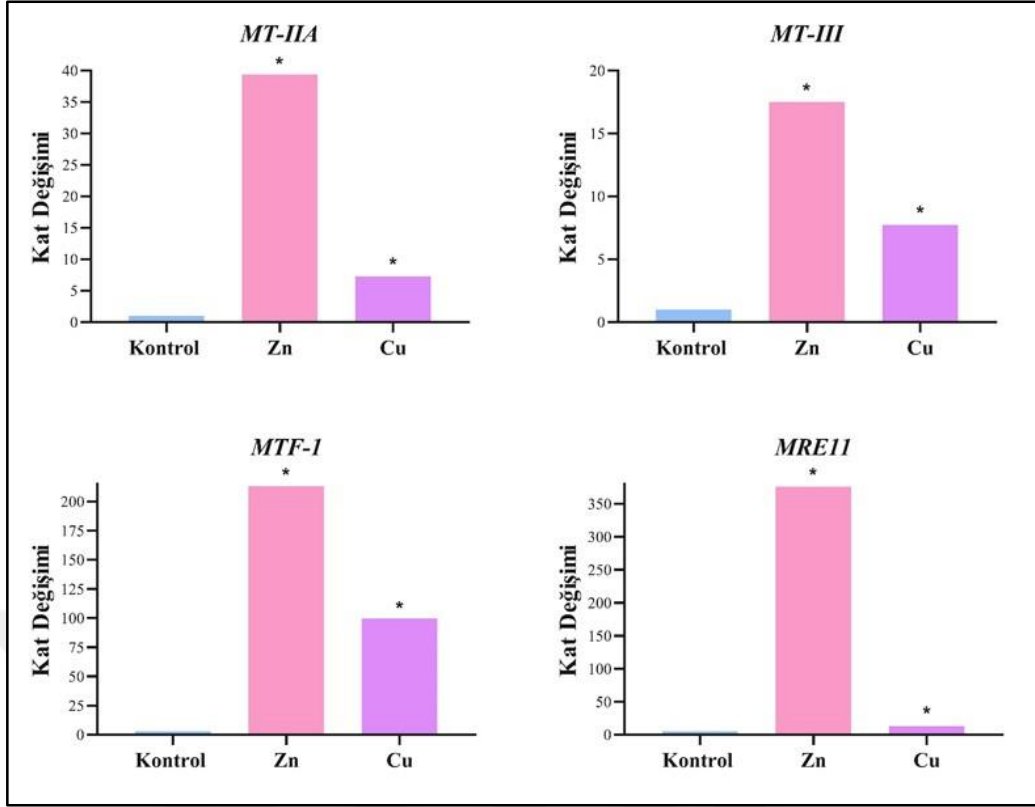
SH-SY5Y hücre hattında 24 saatteki gen ekspresyon sonuçları Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. SH-SY5Y hücre hattında 24. saatte gen ekspresyonları

Zn uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MTIII* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalırken, *MRE11* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak arttı. Cu uygulaması sonucunda ise *MT-IIA* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalırken, *MTF-1* gen ekspresyon seviyesi anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$).

SH-SY5Y hücre hattında 48 saatteki gen ekspresyon sonuçları Şekil 4.8’fe gösterilmiştir.



Şekil 4.8. SH-SY5Y hücre hattında 48. saatte gen ekspresyonları

Zn ve Cu uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre *MT-IIA*, *MTIII*, *MTF-1* ve *MRE11* gen ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$).

4.2.3. Hücre Hatlarının Comet Analiz Sonuçları

Kontrol (DMEM), çözücü (DMSO), Cu ve Zn ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattının comet analiz sonuçları Tablo 4.8’de verilmiştir.

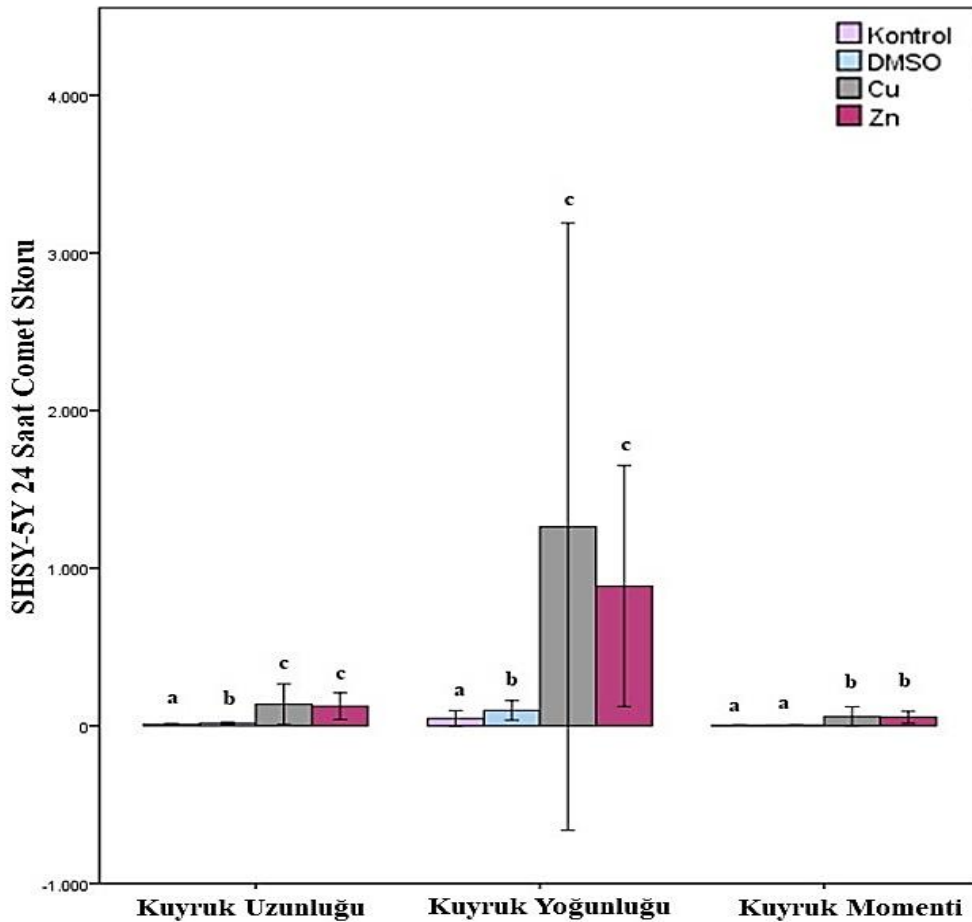
Tablo 4.8. SH-SY5Y hücre hattına D MEM, DMSO, Cu ve Zn uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra comet parametrelerinin değerlendirilmesi

Maddelere Maruz Kalma Süresi	Değişken*	Grup**			p-değeri	
		Kontrol	DMSO	Cu Zn		
24 Saat	Kuyruk	10 ^a	16 ^b	104 ^c	116 ^c	<0.001
	Uzunluğu	(2-22)	(7-41)	(22-464)	(32-363)	
	Kuyruk	25.247 ^a	92.988 ^b	420.329 ^c	627.067 ^c	<0.001
	Yoğunluğu	(1.847-196.329)	(22.012-320.31)	(67.514-6016.09)	(139.02-3176.44)	
	Kuyruk	1.466 ^a	2.498 ^a	44.233 ^b	36.989 ^b	<0.001
Momentü	(0.118-4.761)	(0.419-21.055)	(6.184-242.277)	(9.812-119.367)		
48 Saat	Kuyruk	18 ^a	25 ^{ab}	21 ^{ab}	34 ^b	<0.001
	uzunluğu	(12-38)	(3-43)	(15-66)	(8-160)	
	Kuyruk	190.631 ^{ab}	271.839 ^a	93.29 ^b	230.031 ^a	0.0215
	yoğunluğu	(81.137-572.49)	(4.6-647.271)	(41.604-700.2)	(23.098-1768.85)	
	Kuyruk	1.71 ^a	2.369 ^a	7.887 ^b	13.135 ^b	<0.001
momentü	(0.925-9.314)	(0.04-9.079)	(2.11-30.428)	(0.715-56.156)		

*: Değişkenler, 'ortanca (min. -max.)' şeklinde özetlenmiştir.

**.: Aynı harfi içermeyen grup kategorilerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

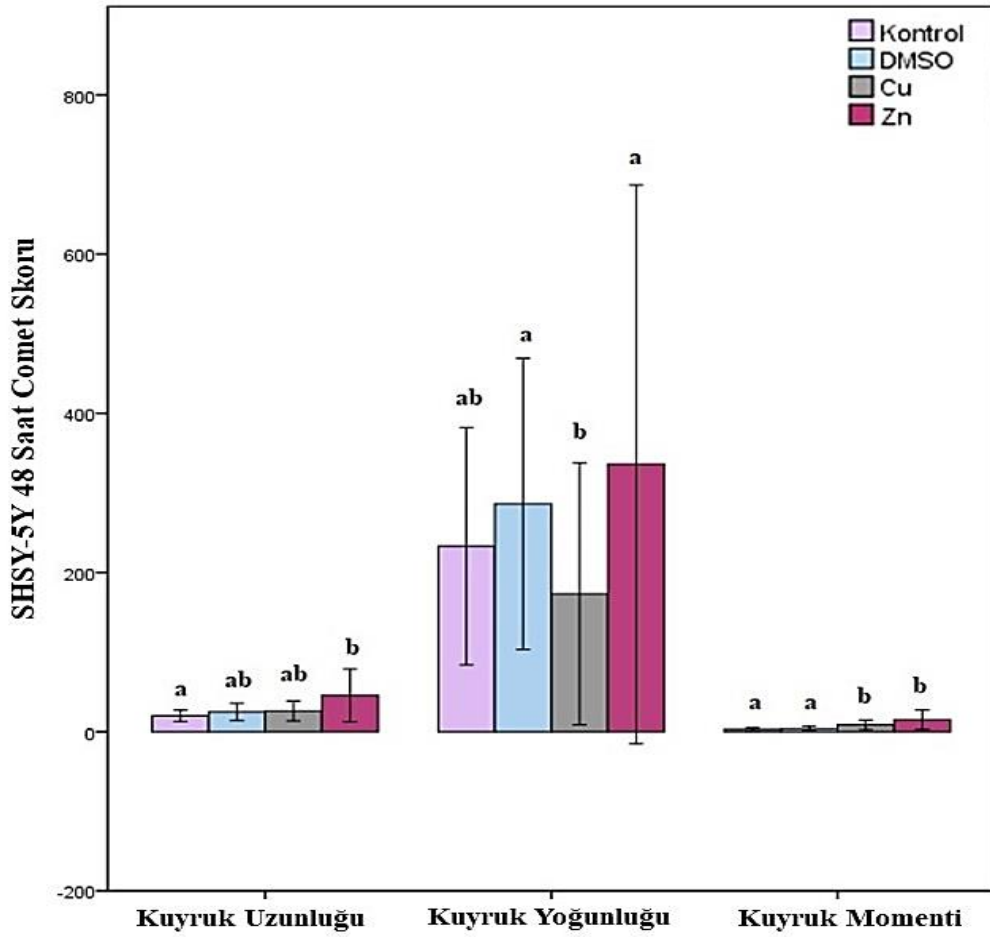
24 saat maddelere maruz kalma kuyruk uzunluğunda tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılığa neden oldu ($p<0.001$). DMSO, Cu ve Zn uygulaması sonrasında kuyruk uzunluğu kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu ($p<0.001$). Kuyruk uzunluğunda Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Kuyruk yoğunluğunda kontrol grubu kıyasla DMSO, Cu, Zn uygulanan hücrelerde yüksek bulundu ($p<0.001$). Kuyruk yoğunluğunda Cu ve Zn uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kuyruk momentinde kontrol ile DMSO arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Cu ve Zn uygulaması sonra kuyruk momentini kontrol ve DMSO grubuna kıyasla yüksek bulundu ($p<0.001$). Kuyruk momentinde Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadı. 24 saat süre Cu ve Zn ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında DNA hasar parametrelerinin üçü de kontrole kıyasla önemli düzeyde arttı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SH-SY5Y hücre hattına uygulanan maddelerin 24 saat sonundaki comet değerleri

Kontrol, DMSO, Cu ve Zn ile 48 saat süreyle muamele edilen SH-SY5Y hücre hattının comet analiz sonuçları Tablo 4.8’de verilmiştir. Kuyruk uzunluğunda kontrol ile

DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol ve Zn uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$). Kuyruk uzunluğunda Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Kuyruk yoğunluğunda kontrol ile DMSO uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kuyruk yoğunluğunda DMSO ile Cu uygulaması arasında ($p = 0.0215$) ve Cu ile Zn arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p = 0.0215$). Kuyruk momentinde kontrol grubu ile Cu ve Zn arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0.001$). Kuyruk momentinde Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Cu ve Zn ile muamele edilen SH-SY5Y hücre hattında DNA hasar parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini kontrole kıyasla önemli düzeyde arttı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. SH-SY5Y hücre hattına uygulanan maddelerin 48 saat sonundaki comet değerleri

L929 hücre hattına kontrol, DMSO, Cu ve Zn ile 24 saat muamele sonucu comet analiz sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir.

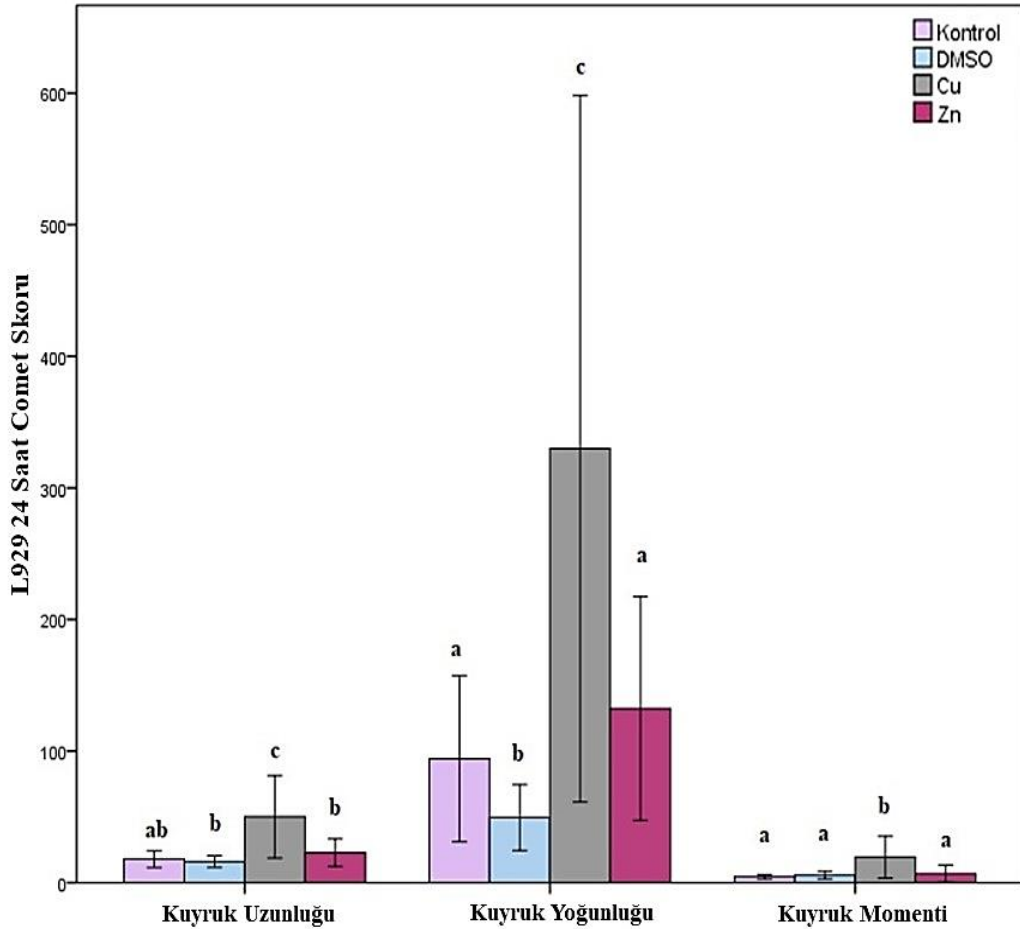
Tablo 4.9. L929 hücre hattına kontrol, DMSO, Cu ve Zn uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra comet parametrelerinin değerlendirilmesi

Maddelere Maruz Kalma Süresi	Değişken*	Grup**				p-değeri	
		Kontrol	DMSO	Cu	Zn		
24 Saat	Kuyruk	17 ^{ab}	15 ^a	37 ^c	19 ^b	<0.001	
	Uzunluğu	(7-32)	(9-27)	(14-124)	(11-46)		
	Kuyruk Yoğunluğu	60.055 ^a	37.577 ^b	233.541 ^c	111.416 ^a		
		(24.788-207.663)	(22.937-125.227)	(54.82-1052.19)	(49.302-368.247)		
48 Saat	Kuyruk	4.204 ^a	4.957 ^a	12.856 ^b	4.173 ^a	<0.001	
	Moment	(1.664-7.305)	(2.024-14.155)	(1.996-54.507)	(1.646-24.327)		
	Kuyruk	9 ^a	13 ^a	26 ^b	33 ^c		<0.001
	Uzunluğu	(4-30)	(3-27)	(8-61)	(18-50)		
48 Saat	Kuyruk	43.075 ^a	62.796 ^{ab}	76.349 ^b	230.824 ^c	<0.001	
	Yoğunluğu	(9.176-112.051)	(3.157-207.11)	(14.031-237.937)	(85.545-440.882)		
	Kuyruk	1.314 ^a	2.587 ^a	10.522 ^b	12.743 ^b		<0.001
	Moment	(0.225-6.362)	(0.109-9.121)	(1.467-24.356)	(4.287-30.733)		

*: Değişkenler, 'ortanca (min.-max.)' şeklinde özetlenmiştir.

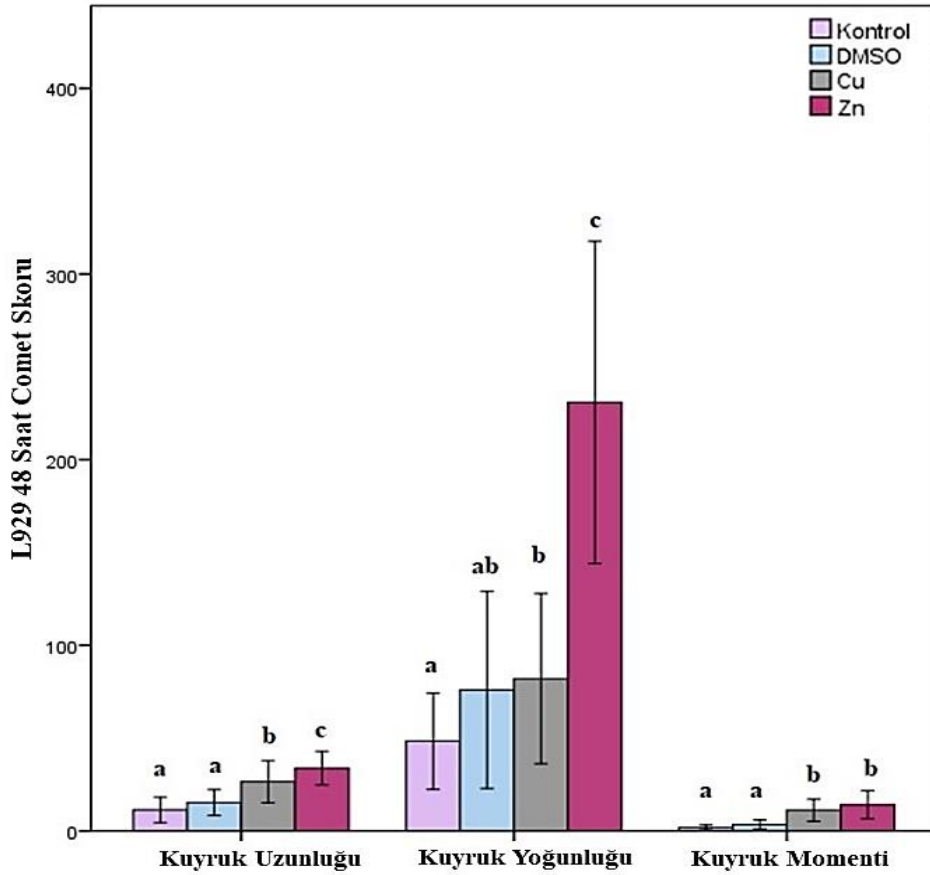
** : Aynı harfi içermeyen grup kategorilerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

Kuyruk uzunluğunda kontrol ile DMSO arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Kuyruk uzunluğunda kontrol ve Cu uygulaması arasında ($p<0.001$), DMSO ile Cu ve Zn uygulaması arasında ($p<0.001$), kontrol ile DMSO ve Cu uygulaması arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Cu ve Zn uygulaması sonrasında kuyruk uzunluğunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu ($p<0.001$). Kuyruk yoğunluğunda kontrol ile DMSO ve Cu uygulaması arasında ($p<0.001$), DMSO ile Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Kuyruk momentinde kontrol ile DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kuyruk momentinde kontrol ile Cu uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0.001$), kontrol ile Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kuyruk momentinde Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). 24 saat süre Cu ve Zn ile muamele edilen L929 hücre hattında DNA hasar parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttı (Şekil 4.11).



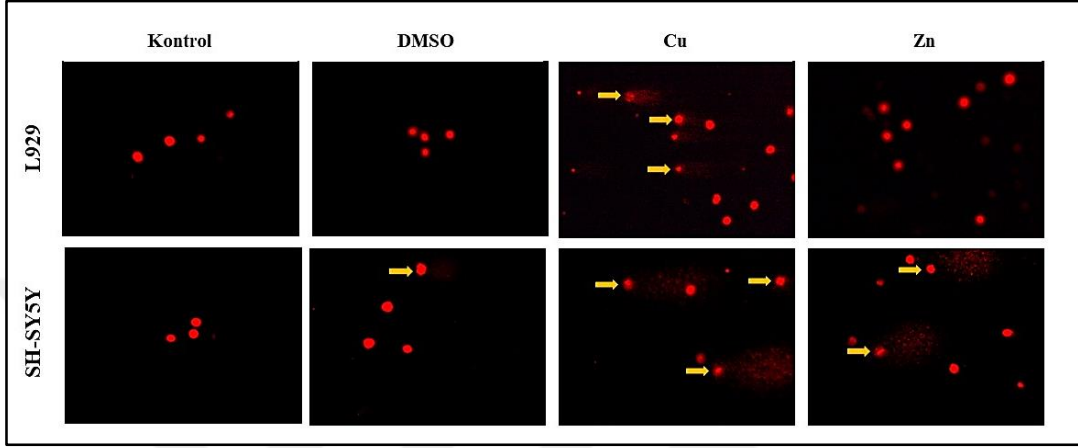
Şekil 4.11. L929 hücre hattına uygulanan maddelerin 24 saat sonundaki comet değerleri

Kontrol, DMSO, Cu ve Zn ile 48 saat süreyle muamele edilen L929 hücre hattının comet analiz sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir. Kuyruk uzunluğunda kontrol grubu ile DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kuyruk uzunluğunda kontrol ile Cu ve Zn uygulaması arasında ($p<0.001$), DMSO ile Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0.001$). Kuyruk yoğunluğu parametresinde kontrol ile DMSO arasında anlamlı bir fark bulundu. Kuyruk yoğunluğunda kontrol ile Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0.001$). Kuyruk yoğunluğunda DMSO ile Cu uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Kuyruk momentinde kontrol ile DMSO uygulaması arasında anlamlı farklılık bulunmazken, kontrol ile Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0.001$). Kuyruk momentinde DMSO ile Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Kuyruk momentinde Cu ve Zn uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadı. 48 saat süre Cu ve Zn ile muamele edilen L929 hücre hattında DNA hasar parametrelerinden üçüde kontrole kıyasla önemli düzeyde arttı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. L929 hücre hattına uygulanan maddelerin 48 saat sonundaki comet değerleri

L929 ve SH-SY5Y hücre hatlarına uygulanan DMEM, DMSO, Cu ve Zn maddelerinin hücre DNA'sında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Kontrol ve DMSO uygulaması L929 ve SH-SY5Y hücre hatlarının DNA'sında meydana gelen değişimlerle benzer bulundu. Cu ve Zn uygulaması her iki hücre hattının DNA'sında belirli düzeyde hasar meydana getirdi.



Şekil 4.13. L929 ve SH-SY5Y hücrelerinin kontrol, DMSO, Cu ve Zn uygulamasından sonraki DNA hasar düzeyleri (x40)

5. TARTIŞMA

Multiple skleroz, genç erişkenlerde MSS'ni etkileyen ilerleyici demiyelinizasyonla sonuçlanan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (28). MS 20-40 yaş aralığında daha yaygın olup kadınlarda erkeklerden 2-3 kat fazla görülür (111). MS seyri oldukça karmaşık olup MSS'nin etkilendiği bölgeye göre motor, duyu, otonom ve kognitif bozuklukları içeren heterojen bir hastalıktır. Dört alt tipi olan MS'in en yaygın formu RRMS ve SPMS'tir (112). Çalışmamıza dahil edilen MS hastalarının tamamı MacDonald kriterleri kapsamında değerlendirilmiş olup RRMS alt tipindedir.

Dünyada yaklaşık 2.3 milyon kişi MS tanısı almış ve en yüksek prevalans Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avusturalya'dadır (113). ABD'de yaklaşık 250.000 ile 350.000 arasında MS hastası olup hastaların %5'i ile %50'si hastalığın başlangıcından itibaren 15 yıl içerisinde progresif nörolojik bozukluklar takip eder. Hastalığın tanı aşamasında klinik bulgular, MRG ve BOS belirleyici unsurlardır (56). MS'in etiyolojisi hala belirsizliğini korumakla birlikte patogenezinde hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynamaktadır (5). Genetik faktörlerin yanı sıra sigara, D vitamini eksikliği, obezite ve yüksek sodyum alımı gibi çevresel faktörlerin ve yaşam tarzının da MS riski ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür.

Metallotiyoneinler +2 değerlikli metalleri bağlama yeteneğine sahiptirler. MT'ler özellikle Zn/Cu gibi esansiyel elementlerin homeostazında ve taşınmasında görevlidirler. Ayrıca hücrel savunmada hayati role sahip antioksidan proteinlerdir (7-10). MT izoformlarından MT-3 nöronlarda ve Zn konsantrasyonu yüksek hücrelerde yoğun şekilde eksprese edilmektedir (65). MS'in patolojik mekanizmasında MT'ler ve Zn/Cu düzeyleri arasındaki ilişki hala belirsizliğini korumaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak metallotiyonein düzeyleri belirlendi. Bunun yanı sıra *in vivo* Zn ve Cu düzeyleri analiz edilerek demografik özellikler, hastalık derecesi, hastalık alt tipi ve DNA hasarı arasındaki korelasyonlar değerlendirildi.

Metallotiyoneinlerin MSS'de beyin ve omurilikte lokalize olduğu gösterilmiş olmakla birlikte astrositlerin MT izoformlarını eksprese ettiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra meningeal, ependimal, koroid pleksus ve endotel hücrelerinde MT-1/2 ekspresyonu yaptığı gösterilmekle birlikte oligodentrositler ve nöronlarda bu ekspresyonun olmadığı bildirilmiştir. MT-1/2 ekspresyonu metaller (Zn, Cu, Cd, Hg), glukokortikoidler (kortikosteron, deksametazon), katekolaminler, stres ve iyonizan radyasyon gibi çeşitli faktörlerden etkilenerek koordineli bir şekilde düzenlenir. MSS'de MT-1/2

regülasyonunda immün yanıt elemanı proinflamatuvar sitokinler de rol oynamaktadır (114).

Merkezi sinir sisteminde MT'lerin fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolleri günümüzde önemli bir araştırma konusudur. MT-1/2'nin MSS'de metal iyon metabolizmasını, nöroinflamatuvar süreçlerdeki yanıtı, oksidatif stresi ve nörorejenerasyon gibi fizyolojik süreçleri modüle ettiği gösterilmiştir. MT'lerin nörodejeneratif hastalıklardaki koruyucu rolleri ile ilgili literatürde kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Alzheimer hastalarında astrositlerde artmış serbest radikallerin, metal iyonlarının ve sitokinlerin MT-1/2'de aşırı ekspresyon ile MT'nin nöroprotektif etkisinden kaynaklanan hücrel bir tepki olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra transgenik hayvanlarda amiloid plakların çevresinde astrosit, mikrogliya, korteks ve hipokampus bölgelerinde yüksek düzeyde MT-1/2 ekspresyonu gösterilmiştir (115). MT'lerin nöral hasar üzerindeki etkilerini MSS'de metal iyonu detoksifikasyonu ve regülasyonu üzerinden yaptığı düşünülmekle birlikte, MS'te meydana gelen nörol ve miyelin hasarda da koruyucu olabileceği bildirilmiştir. Penkowa ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada immünohistokimyasal yöntemle üç MS hastasının beyin dokusunda aktif ve inaktif lezyonlarda MT-1/2 ekspresyonunu analiz etmişler ve inaktif lezyonlarda yüksek düzeyde MT-1/2 ekspresyonu tespit etmişlerdir (96). Benzer şekilde çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla MS hastalarından alınan kan örneklerinde MT-1 ve MT-2 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Comes ve ark.'nın deneysel EAE modeli ile MS oluşturarak MT-1 ve 2'nin etkisini araştırdığı bir çalışmada, MT-1'den çok MT-2'nin hastalık patogenezinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir (116). Cesani ve ark. ise tam tersine EAE fare modelinde hem beyin hem de kan örneklerinde klinik fenotipin ilerlemesi sırasında, MT-1 ve MT-2 düzeylerinin anlamlı bir farklılık göstermediğini bildirmiştir (117). MT'ler ve MS arasındaki ilişki hala belirsizliğini korumakla birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalar gösteriyor ki; MT'ler glukokortikod cevap elemanı, antioksidan yanıt elemanı, MRE, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT-3) tarafından multi faktöriyel olarak aktive edilerek hücrel fonksiyonlara katılan çok işlevli proteinlerdir. Yapılan bir çalışmada, EAE modelinde beyin ve omurilikte MT-1 ve MT-2'nin yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (118). Mevcut literatür çalışmaları ve çalışma sonuçlarımız gösteriyor ki MT'ler MS patogenezinde önemli terapötik yaklaşımlar olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda yapmış olduğumuz ROC analizinde MT-1, MT-2 ve MT-3 hastalık teşhisinde ya da hastalığın klinik seyrini öngörmede hassas ve spesifik biyobelirteçler olabileceği gösterilmiştir. Son yıllarda

interferon-beta (INF- β) tedavisi alan hastalarda azalmış proinflamatuvar yanıt ve MT indüksiyonu ile hastalığın ilerlemesinin yavaşlatıldığı gösterilmiştir (119).

Çinko canlılığın devamı, kardiyovasküler faaliyetler ve nörolojik süreçler için önemli bir elementtir. Hücreler için Zn homeostazı önem taşımaktadır. Zn homeostazında Zn taşıyıcılar ve Zn bağlayıcı moleküller rol oynamaktadır. Zn, MSS'nin ihtiyaç duyduğu en önemli elementlerden biri olmakla birlikte; öğrenme, hafıza, sinaptik esneklik ve nörogenezde kritik rol oynamaktadır (120). Zn'nin nörolojik bozukluklar ile ilgili etkileri literatürde hala belirsizliğini korumakla birlikte Alzheimer ve Parkinson hastalarında subklinik olarak Zn eksikliği gösterilmiştir. Bunun yanısıra Alzheimer hastalarında kontrol grubuna kıyasla kan Zn düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, Alzheimer transgenik fare modelinde yüksek düzeyde çinkonun gavaj yoluyla uygulanması sonrası amiloid- β (A β) birikiminde artış gözlenmemiştir. Yapılan başka bir çalışmada Zn uygulamasının Alzheimer transgenik farelerde nöronal proliferasyonda, bilişsel ve mitokondriyal bozukluklarda düzelmelere neden olduğu gözlenmiştir (121). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da MS hastalarında kontrol grubuna kıyasla serum örneklerinde daha düşük Zn düzeyleri bulundu. Yapılan çalışmalarda Zn homeostazının bozulması MS ile ilişkilendirilmiştir. Farklı çalışmalarda ise MS hastalarının serum Zn seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (122). Bu bulguların aksine farklı bir çalışmada kontrol ile MS hastaları arasında serum Zn düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı ve MS hastalarında plazma Zn konsantrasyonunun daha yüksek olduğu öne sürülmüştür. Ancak yapılan meta-analiz çalışmalarında MS'de dolaşımdaki Zn seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Hastalığın atak döneminde olan hastalarda eritrosit Zn düzeylerinde azalma, bununla birlikte hastalığın iyileşme dönemlerinde artış meydana gelmiştir (123, 124). Bu bulgular ve bizim sonuçlarımız dikkate alındığında MS patogenezinde Zn homeostazının potansiyel rolünün olduğu düşünülmektedir.

Mevcut çalışmalarda Zn fazlalığının veya eksikliğinin MS ile ilişkisi hakkında veriler çelişkilidir. MS hem demiyelinizasyon hem de remiyelinizasyon süreçlerinin eşlik ettiği karmaşık bir hastalık olmakla birlikte, Zn fazlalığının beyaz madde hasarına neden olduğu gösterilmiştir. Ancak sonraki remiyelinizasyon için Zn'nin gerekli olduğu düşünülmektedir. Mevcut çalışmalar, Zn ile MS arasındaki karmaşık ilişkinin MS'in potansiyel terapötik hedefi olarak Zn'ye yeni bir bakış açısı sağlamakta olup, daha fazla moleküler hedefli çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Metallotiyoneinler Zn bağlayan ve Zn tamponu işlevi gören hücre içi proteinlerdir. MT'nin nöronal patolojideki önemi gösterilmiştir. Oksidatif strese maruz kalındığında

MT'lerden önemli miktarda Zn salınır ve nöron ölümüne neden olur. Penkowa ve ark. MT-2'nin MS için potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini, aynı zamanda EAE modelinde MSS'deki sitokin ekspresyonunu ve apoptotik nöron ölümünü azalttığını bildirmiştir (125). MT'lerin Zn homeostazının devam ettirilmesindeki temel rolleri, ağır metalleri detoksifiye etmeleri ve ROT'ları temizlemeleridir. MT'lerin rolü hala belirsizliğini korumakla birlikte, çalışmalar bu proteinlerin tedavi stratejileri için iyi bir hedef olarak seçilebileceğini düşündürmektedir.

Bakır nörotransmitter sentezi, oksijen/elektron taşınması ve protein modifikasyonundan sorumlu enzimlerin işlevini düzenleyen önemli bir temel eser elementtir. Bu nedenle, aşırı miktarda bakır mitokondriyal oksidatif solunum ürünlerinin hidroksil serbest radikaline dönüşmesi yoluyla serbest radikaller üretir. Bunun yanı sıra MSS'de artan ROT üretimi, Cu iyonlarının redoks özellikleri ile ilişkili bulunmuştur (126). Mezzaroba ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, yüksek Cu konsantrasyonunun nörotoksik olduğu ve Parkinson hastalığı ve MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda patojenik bir rol oynadığı gösterilmiştir (127). Tez çalışmamız kapsamında MS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak serum Cu düzeyleri yüksek bulundu. Yüksek Cu konsantrasyonlarının Zn emilimini azalttığı ve bu sürecin, oligodendrositlerde miyelin sentezinde rol alan TPO-1 proteininin çinko parmaklarının önemli bir parçası olan Zn'nin giderek tükenmesine yol açmaktadır. Ayrıca nörodejeneratif hastalıkları olan yaşlı hastalarda bozulmuş Zn ve Cu homeostazının bir göstergesi olarak yüksek bir Cu/Zn oranı rapor edilmiştir (128). MS patogenizinde artmış Cu konsantrasyonları oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir. Ancak MS'deki Cu düzeyleri ve MS patolojisindeki rolü ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Bunun yanı sıra MSS'de Cu birikiminin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olabileceği hakkında çok sayıda literatür bulunmakla birlikte bizim sonuçlarımız literatür ile uyumludur.

Bakır-MT düzeylerinin Alzheimer ve Parkinson benzeri nörodejeneratif hastalıklarda çinko, bakır, kadmiyum ile MT seviyelerindeki yükselmeler potansiyel bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (129). Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde çevresel faktörler ve genetik yatkınlıklar ile ilişkili olduğu düşünülen nöron hücrelerin ölümüyle ilişkili olan alfa-sinüklein proteininin anormal katlanması ve toplanması gösterilmektedir. MT-metal etkileşiminin amiloid beta peptid veya alfa-sinükleinin bakır kaynaklı agregasyonunu önlediği gösterilmiştir. Sistein bakımından zengin yapısı ve metale yanıt elementi olan MT'ler bakırla indüklenen alfa-sinükleinin agregasyonunu azaltmak için terapötik hedef olarak gösterilmektedir (130). Bu nedenle

MT'ler bakır ile oluşturulan alfa-sinükleinin agregatlarını bakır ile şelat oluşturarak engeller ve bakır/alfa-sinükleinin birleşmesinden oluşan ROT'lara karşı antioksidan işlev görürler (130, 131). Çalışmamızda MS'li bireylerden alınan kan örneklerinde Cu düzeyleri ve MT-2 seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Serum örneklerindeki yüksek Cu seviyelerinin MT-2 ile etkileşime girerek MS'li bireylerde kan metal konsantrasyonunun düzenlenmesi ile tedavi hedefi haline gelebilir. MT'ler alfa-sinükleinopatilerde nöroprotektif etki gösterebilirler, ancak nöroprotektif etkinin bakır şelasyonu yoluyla mı gerçekleştiğini yoksa ROS temizleme, nöroinflamasyon veya nörotrofik etkilerle mi ilişkili olduğunu belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bulgularımıza göre; MS'li bireylerde kontrole göre anlamlı olarak düşük Zn ve yüksek Cu seviyeleri önceki literatürler ile benzerlik göstermektedir (132). Ancak bu metallerin serumdaki değişken konsantrasyonlarının altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumakla birlikte, Zn seviyelerinin kademeli olarak azalması ve Cu birikiminin artması hastalık patolojisinin altında yatan oksidatif hasar ile ilişkilendirilebilir. Bakır, Fenton reaksiyonlarını katalize ederek fonksiyonel ve yapısal makromoleküllere zarar verebilecek ROT'lar oluşturur. ROT'lar katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler tarafından temizlenmezse, nöronlar için toksik olan hidroksil iyonu (OH⁻) üretmek için indirgenmiş Cu ile reaksiyona girer. Bu bağlamda MT'ler gibi Cu şelatlayıcı moleküller ve Zn ile tedavi hedefleri MS patogenezinin yavaşlatılması için önemli olabilir.

Multiple skleroz, günümüzde teşhisi zor olan nörodejeneratif hastalıklar arasında yer almaktadır. Prognostik belirteçlerin eksikliği ve hastalar arasındaki bireysel farklılıklar, hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Hastalara doğru tanı koymak için lezyonların hem zaman, hem de ortamdaki dağılımının gösterilmesi gereklidir, bu da uygun tanı için gereken zamanın gecikmesine ve bu süreçte hastalığın ilerlemesine neden olabilir. Yeni biyobelirteçlerin keşfi hastalığı teşhis etmek ve hastalığın ilerlemesini takip etmek için yararlı olabilir. Tez çalışması kapsamında ROC analizi yapılmış olup, Cu düzeylerinin MS teşhisinde ve ilerlemesinde hassas ve spesifik bir biyobelirteç olabileceği öne sürülebilir.

Multiple skleroz hastalığında prognostik faktörlerin belirlenmesinde demografik veriler ve klinikteki belirleyici biyomarkerlar kullanılmaktadır. Yapılan bir lojistik regresyon analizinde demografik veriler ve mevcut klinik belirleyicilerin hastalık prognozunun ilerlemesini önlemediği gösterilmiştir (133). Bu sebeple hastalığın kronik

seyrini erken dönemde tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte demografik, MRG ile yeni biyobelirteçlerin kombinasyonu ile oluşturulabilecek güçlü öngürücülere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bir çalışmada Çin popülasyonunda MS'li hastalarda eşlik eden komoribitelerin prevalansı ve riskleri analiz edilmiştir (134). Ancak literatürde lojistik regresyon analizleri değerlendirildiğinde hastalık tanı ve teşhis sürecinde yararlı olabilecek yeni biyomarkerların araştırılmadığı ve demografik özellikler, sigara kullanım durumu, hastalığın bölgesel varyasyonları gibi değişkenlerin dikkate alınmadığı gözlenmiştir (135, 136). Çalışmamızda önceki çalışmalardan farklı olarak ilk defa MT'lerin hastalığın prognozunda belirleyici bir biyomarker olabileceğini öne sürmekteyiz. Ayrıca bu tez çalışmasında, MS tanısı almış bireylerde oksidatif stresin olası rolünü periferik lenfositlerindeki DNA hasarı düzeylerini comet analizi yaparak belirledik. MS grubunun kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. Bizim çalışmamıza benzer şekilde MS ve Parkinson hastalarında lenfosit izolasyonu ile comet analizi yapılmış. Parkinson ve MS hastalarının lenfositlerindeki yüksek düzey DNA hasarı gözlenmiştir (137). Filipek ve ark. 30 MS ve 30 kontrolde periferik lenfosit izolasyonu yaparak hücreleri tert-bütül hidroperoksite maruz bırakarak comet analizi ile DNA onarım seviyelerini analiz ederek, MS grubunda DNA onarım veriminin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu göstermişlerdir. Bu bulgular bizim sonuçlarımız ile uyumlu olmakla birlikte yapılan çalışmalarda MS hastalarının lenfosit hücrelerinde artan DNA hasarı ve DNA onarım etkinliğinin azaldığı gözlenmektedir (138). Başka bir çalışmada da 28 MS ve 28 kontrolde comet analizi ile DNA hasar indeksi ve potural denge değerlendirilmiş ve MS hastalarında daha yüksek DNA hasar indeksi bulunmuştur. MS grubunda daha geniş postüral salınım aralıkları gözlenirken, DNA hasar indeksi ve postüral kontrol parametreleri arasındaki ilişkiler zayıf fakat anlamlı korelasyonlar bulundu (139).

Oksidatif stresin nedenlerinden olan NO üretimi ve sonuçlarından biri olan DNA hasarının belirlenmesi MS gibi multifaktöriyel patogenezi olan hastalıklarla ilişkili bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada 28 MS ve 15 kontrolde tam kanda ve periferik lenfosit izolasyonu yapılarak DNA hasarı belirlenmiştir. MS hastalarından alınan kan örneklerinde kontrole göre DNA kırılma düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca 22 MS ve 22 kontrolde NO üretimi belirlenerek, MS grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (140). Mevcut çalışmamız örneklem büyüklüğünün fazla olması ve literatür ile uyumlu sonuçlar gösterdiği için comet yönteminin MS patogenezinin aydınlatılmasında önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Tez çalışması kapsamında klinik sonuçlarımızın *in vitro* yöntemlerle doğrulanması, metal homeostazının bozulmasının MT gen ekspresyon faktörleri üzerine etkileri değerlendirilerek DNA hasarı ile arasındaki ilişkiye açıklık getirilmiştir. Zn/Cu tuzları SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına literatür çalışmaları ile uyumlu olacak konsantrasyonlarda (0-500 µM) uygulanmıştır (141). MTS hücre canlılığı tayini ile IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Cu uygulaması SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Zn uygulamasına göre daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttı. L929 hücre hattında her iki esansiyel metalin uygulanması SH-SY5Y hücre hattında daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttı. Çalışmamızın klinik sonuçlarında MS hastalarında Zn seviyelerinin düşük olmasına karşın *in vitro* analizlerde Zn nöroblastom hücrelerinde Cu uygulamasına göre daha düşük dozlarda hücre canlılığını azalttı. *In vitro* bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde yüksek Zn konsantrasyonlarının MT-1, MT-2 ve ZnT-1 mRNA'larının ekspresyon seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (142). Bu bağlamda Zn homeostazının bozulmasının nöronlar üzerinde zararlı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Ayrıca Zn eksikliğinin nörojenezi azaltarak nöral fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. Zn eksikliği depresyon ve MSS hastalıkları ile ilişkili bulunmuştur. Zn eksikliği ve fazlalığı ile ilgili çelişkili veriler olmakla birlikte artmış Zn düzeyleri nörotoksisite ile ilişkili bulunurken, azalmış Zn düzeylerinin nöral hücrelerde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (143, 144). Bu nedenle, çinkonun hücrelerde kontrollü ve hedefe uygun dağılımının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Merkezi sinir sisteminde fizyolojik işlevler için vazgeçilmez olan Cu nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile ilişkili bulunmuştur. Alzheimer hastalığında Aβ birikiminin MSS'de bozulmuş olan Cu homeostazı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Cu iyonlarının indirgenmiş/oksidlenmiş formları arasındaki geçişler ROS oluşumuna neden olmakla birlikte, Aβ komplekslerindeki Cu (I)'in, Fenton benzeri bir reaksiyon ile ROS aracılı nörotoksisiteye yol açtığı düşünülmektedir (145). Çalışmamızın klinik verilerinde MS hastalarında kontrol bireylere göre anlamlı olarak yüksek serum bakır düzeyleri bulundu. SH-SY5Y hücre hattına Cu uygulanarak MT gen ekspresyonları belirlendi. Benzer şekilde McLeary ve ark. Cu bağımlı alfa-sinüklein birikimini SH-SY5Y hücre hatlarına MT indüksiyonu ile hücre içi birikiminin azaldığını göstermişlerdir (146).

Metallotiyoneinler, ağır metallere maruz kalındığında uyarılan ve ağır metal düzenlemesi ve detoksifikasyonuna katılan yaklaşık 7 kDa olan farklı metalleri (Zn, Cu, Co, Cd, Hg, Pb, Ag, Bi, Sn, Ni, Au) bağlayan proteinleridir. MT protein sınıfı içinde *MT-*

I ve *MT-II* (*MT-IIA* olarak da bilinir) en yaygın olarak eksprese edilenler olup ve tüm dokularda regüle edilirler. *MT-III*'ün beyne özgü olduğu ve *MT-IV*'ün ise skuamöz epitelde eksprese edildiği bilinmektedir (147). Ayrıca *MTF-1*'in, *MT-III* promoter bölgesindeki MRE dizisine bağlanmadığı tespit edilmiştir (148).

Metallotiyoneinler, beyin fonksiyonlarında esas olarak astrositlerde bulunan çok önemli proteinlerdir. Nöronları, epileptik nöbetlerin deneysel modelleri tarafından indüklenen eksitotoksositeye karşı veya inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz gibi olayların modülasyonu yoluyla fokal serebral iskemiğe karşı koruyabilirler (149).

Metallotiyoneinleri kodlayan genlerin ağır metal kaynaklı transkripsiyonel aktivasyonuna, MRE olan cis-etkili bir DNA elementinin çoklu kopyaları aracılık eder. MRE'nin transkripsiyonel aktivitesinin her zaman *MTF-1*'e bağlanma affinitesini yansıtmadığı bildirilmiştir. Hatta insan *MT-IIA* geninin bazı MRE'leri, *in vivo* olarak hiç transkripsiyon aktivitesi göstermemesine veya çok düşük seviyede transkripsiyonel aktivite göstermesine rağmen, saflaştırılmış insan *MTF-1*'ini *in vitro* olarak bağlayabilir (150). MRE varlığı, MT'lerin çoğunun çinko tarafından indüklenmesine neden olurken MRE, çinko parmak içeren *MTF-1* ile etkileşim sonucunda aktive edilir. *MTF-1* ise ağır metaller ve oksidatif stresle ilişkili bir dizi genin düzenlenmesinden sorumludur (151).

MTF-1 hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynayan çinkoya bağımlı bir transkripsiyon faktörü olarak hücre içi Zn, Cu gibi elementlerin seviyelerindeki değişikliklere yanıt olarak sitozolden çekirdeğe translokasyona uğrar. Daha sonra bu transkripsiyon faktörü, metale duyarlı genlerin proksimal promotörlerinde bulunan MRE'lere bağlanarak transkripsiyon oranının artmasına neden olur (152).

Hücrelerdeki *MTF-1*'in etki mekanizması anti-inflamatuvar/pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu/inhibisyonu yoluyla uygun tepkinin regülasyonunu içermektedir. *MTF-1* bağlantılı sinyal yollarının regülasyonundaki bozukluklar, Zn'nin hücre içi durumunda değişikliğe neden olarak homeostazı bozar ve dejeneratif bozuklukların patofizyolojisine katkı sağlar (153). Birçok nörodejeneratif bozukluğun ilerlemesi alfa-sinüklein birikimi ile ilişkilendirilmiştir. Beta-sinüklein ise alfa-sinükleinin doğal bir regülatörüdür. Bu nedenle beta-sinüklein ekspresyonunun kontrol edilmesi, alfa-sinüklein birikimini kontrol edebilir ve sonuçta hastalığın ilerlemesini önleyebilir. *MTF-1*'in alfa-sinüklein ile karşılaştırıldığında beta-sinükleine spesifik olduğu bildirilmiştir. Buna göre *MTF-1* nörodejeneratif bozukluklarda potansiyel terapötik yeni hedefler olabilir (154).

Yapılan tez kapsamında L929 hücre hattında *MTF-1* gen ekspresyonunun artması *MRE11* gen ekspresyonunu inhibe etmiştir. SH-SY5Y hücre hattında ise *MTF-1* gen ekspresyonunun artması *MRE11* gen ekspresyonunu aktive etmiştir. Kanser hücre hatlarında özellikle Zn uygulaması oksidatif hasar veya apoptotik hücre ölümü yollarını aktive etmiş olabilir. Ayrıca sonuçlarımız *MTF-1*'in, *MTIII* promoter bölgesindeki MRE dizisine bağlanmadığını desteklemektedir.

Metallotiyoneinler özellikle çinko metabolizmasında, inflamasyonun azaltılmasında ve serbest radikal hasarına karşı korumada rol oynamaktadırlar. Son yıllarda ise beyin hasarını takiben koruyucu bir etki sağladığı bildirilmiştir. Bu kapsamda yapılan bir araştırmada MT indüksiyonunun nöronal hasarla ortaya çıktığı ve *MT-IIA*'nın fokal kortikal beyin hasarını takiben nöral iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir (155).

Metal bağlayıcı proteinlerin MT ailesi apoptotik hücre ölümüne karşı hücreyi korur ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynar. *MT-I* ve *MT-II*'nin metal bağlama özelliklerine göre bu proteinlerin iki farklı metal-tiolat aracılığıyla *in vivo* olarak 7 tane Zn^{+2} ve 12'ye kadar Cu^{+} metal iyonunu bağlayabildiği kabul edilmiştir (156). MT'nin fonksiyonel bir izoformu olan MT-II hücrenin sağkalımında sanıldığı kadar önemli değildir. Ancak *MT-IIA* geninin susturulması, kanser hücrelerinde *MT-I* izoformlarının ekspresyonunu arttırmadan apoptotik hücre ölümünü indükler. Yapılan bir çalışmada yüksek metastatik SKOV-3 hücre hattı ve yumurtalık kanseri (OVCA 432 ve OVCA 433) hücre hatlarında *MT-IIA* mRNA ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (157). Ek olarak düşük seviyede kronik kadmiyum maruziyetini takiben *MT-IIA* seviyelerinin 1.5 katından daha fazla yükseldiği gösterilmiştir (158). MT'lerin oksidatif stres koşulları altında eşzamanlı olarak aşırı eksprese edildiği tahmin edilmektedir.

Yapılan tez kapsamında özellikle SH-SY5Y hücre hattında Zn uygulamasını takiben 48. saatte *MT-IIA* geninde aşırı ekspresyon gözlenmiştir. Ayrıca kanser hücre hatlarında Zn ve Cu maruziyetinin *MT-IIA* gen ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Literatüre dayanarak *MT-IIA* ekspresyonu sonucunda oksidatif stres yollarının *MTF-1*'e bağımlı olarak indüklendiği söylenebilir. Bu nedenle *MT-IIA* terapötik bir aday olarak düşünülmektedir.

MT-III, nöronal büyümenin bir inhibitörü olarak tanımlanır ve tipik bir memeli MT'in özelliklerine sahiptir. Diğer MT'ler gibi Zn ve Cu gibi temel metal iyonlarını bağlarken, Cd ve Ag gibi toksik metal iyonlarını ayırdığı varsayılmaktadır (159, 160). Bunun yanı sıra *MT-III*, hücreleri oksidatif strese karşı korur ve hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve diğer normal hücresel fonksiyonları düzenler. Özellikle kanser

hücrelerinde başlangıçtaki oksidatif stres durumunda *MTIII*'ün ekspresyon seviyesi arttığında hücreler stresten daha hızlı kaçınabilir (161). Yapılan bir çalışmada *MT-III*'ün glutamat ve NO kaynaklı nörotoksisiteyi doza bağlı bir şekilde önlediği ve NO kaynaklı cGMP oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (162).

MT-III'ün özellikle ilgi çekici olarak Alzheimer ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıkları olan hastaların beyinde belirgin şekilde azaldığı bulunmuştur (163). SH-SY5Y hücre hattında yapılan bir çalışmada Pb ve Zn tedavisinden sonra hiç tedavi almayan gruba kıyasla *MT-III* mRNA seviyelerinin azaldığı, Co ve Li tedavisinden sonra ise arttığı bulunmuştur (164). Başka bir çalışmada ise sıçan beyinde, sıçanlar orta yaşı (16 ay) geçtikten sonra *MT-III* seviyelerinde çok büyük bir artış görülmüştür (165). Fare beyinde ise 12 hafta sonrasında *MT-III* seviyeleri daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (166). Bu nedenle *MT-III*'ün yaşla birlikte arttığı söylenebilir. *MTIII*'ün aşırı ekspresyonunun, *in vitro* ve *in vivo* olarak T24 ve HT1376 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu, metastazını ve tümör oluşumunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (167).

Yapılan tez kapsamında L929 hücre hattında Zn ve Cu maruziyeti sonrasında hiç tedavi almayan gruba kıyasla *MT-III* seviyesi artarken, ilerleyen 48 saatlik dönemde azalmıştır. SH-SY5Y hücre hattında ise 48 saat sonrasında aşırı ekspresyonu görülmüştür. Literatür ile karşılaştırıldığında sağlıklı hücrelerde oksidatif hasar ile karşılaşma sonucunda *MT-III*'ün aktive edildiği söylenebilir. Daha sonra azalması ise diğer ikincil yolak aktivasyonuna bağlı olarak proliferasyonu azalmış olabilir. Kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonunun ise *MTF-1* kaynaklı olduğu söylenebilir.

Merkezi sinir sisteminde metal homeostazının bozulmasının oksidatif stres yoluyla DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *in vitro* analizlerde SH-SY5Y ve L929 hücre hatlarına Zn/Cu tuzları IC₅₀ konsantrasyonlarında uygulandı ve DNA hasarı comet analizi yöntemiyle belirlendi. Uygulanan konsantrasyonda Zn/Cu tuzları her iki hücre hattında da kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ölçümlerini önemli derecede arttırdı. Sonuçlarımıza göre belirlenen Cu konsantrasyonunun Zn'ye göre daha az hasar verdiği gözlemlendi. Ancak her iki elementinde comet sonuçları incelendiğinde, DNA hasarına neden olduğu gözlemlendi. Literatürde Zn/Cu tuzlarının SH-SY5Y hücre hattında DNA hasarına ilişkin sınırlı çalışma bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar metallerin nanopartiküllerinin DNA hasarı üzerine etkileri şeklindedir (168). Ancak bizim çalışmamızda metallerin tuz formları kullanıldı. Mahmoud ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada Cu nanopartikülleri

SH-SY5Y hücre hattına MTT ile belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmış sitotoksik, genotoksik, oksidatif ve apoptotik etkilere neden olduğunu göstermiştir. Ek olarak yapılan başka bir çalışmada Zn nanopartiküllerin SH-SY5Y hücre hattında DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir. Yakın zamanda Pradhan ve ark. SH-SY5Y hücre hatlarında Parkinson hastalığı modeli oluşturarak manganez, çinko ve bakır uygulaması ile hastalık patolojisindeki mekanizmaları araştırmışlardır. Bu bağlamda Zn uygulaması diğer metallere kıyasla önemli ölçüde yüksek DNA hasarı, ROT oluşumu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu gözlemlendi (169). Benzer şekilde bizim verilerimizde de SH-SY5Y hücre hattında Zn uygulaması daha yüksek düzeyde DNA hasarına neden olmuştur.

Bu çalışmada MT'ler üzerinde etkisinin olduğu gösterilen esansiyel elementlerin düzeylerinin incelenmesi ve *in vitro* olarak bu metal homeostazının bozulmasının MT'lerin gen ekspresyonları üzerine etkileri ve bu etkilerinin hastalardan alınan kan örneklerinde DNA hasarı düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu yönüyle de çalışmanın özgünlüğüne katkı sağlamıştır. Önceki klinik çalışmalar incelendiğinde, çalışmalarda hasta sayılarının az olduğu görülmüştür. Bu nedenle önceki çalışmalardan farklı olarak bu çalışma kapsamında hasta sayısının önceki çalışmalara kıyasla fazla olması çalışmanın güvenilirliğini arttırdı.

Metallotiyoneinlerin MS ile ilişkili gen ekspresyonlarına etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda sadece MT gen ekspresyonları değerlendirilmiştir. Ancak Zn ve Cu gibi esansiyel elementlerin varlığında veya eksikliğinde aktive olan *MTF-1* ve *MRE* genleri bu elementlerle birlikte daha önceden incelenmediği için çalışma sonuçlarımız bu ilişkinin değerlendirildiği ilk verileri sunmaktadır. Yapılan bu çalışma MS patolojisinin aydınlatılmasına, metallerin hastalığındaki rolüne ve hastalığın nüks etmesinin önceden tahmin edilmesine yeni bir perspektif sağlayacak, ayrıca yeni metal hedefli terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında MS tanısı alan 70 hasta ve 30 kontrol bireyden alınan serum örneklerinde MT düzeyleri belirlendi ve MS hastalarında yüksek bulundu. MT'lerin metal homeostazındaki etkilerinden dolayı serum Zn/Cu düzeyleri AAS yöntemi ile belirlendi. MS hastalarında artmış Cu ve azalmış Zn düzeyleri tespit edildi. Hastalardan alınan tam kan örneğinden lenfosit izolasyonu yapılarak, comet yöntemiyle DNA hasarı belirlendi ve MS hastalarında önemli ölçüde yüksek DNA hasarı bulundu. *İn vitro* analizlerde Zn/Cu tuzlarının SH-SY5Y ve L929 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTS yöntemi ile belirlendi. MT'ler üzerinde etkisinin olduğu gösterilen esansiyel elementlerin düzeylerinin incelenmesi ve *in vitro* olarak bu metal homeostazının bozulmasının MT'lerin gen ekspresyonları üzerine etkileri ve bu etkilerin hastalardan alınan kan örneklerinde DNA hasarı düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı. Ülkemizde hastalığın görülme sıklığı değişmekle birlikte iyi bilinen tanı kriterlerine rağmen, MS tanısının konulmasında zorluk yaşanması ve klinik tanı ve tedavinin gecikmesi, hastalığın progresyonu ve prognozu üzerinde olumsuz etkiler göstermektedir. Literatür incelemelerinde semptomatik tedavinin uygulandığı MS ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar çoğunlukla nörologlar tarafından yapılan serum biyobelirteç düzeylerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalardır. Bunların dışındaki diğer MS ile ilgili çalışmalar demografik ve çevresel etkenlerle hastalık arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalardır. Ancak MS ile ilişkili mekanizma çalışmalarına rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak MT düzeyleri belirlendi. Bunun yanı sıra *in vivo* Zn ve Cu düzeyleri analiz edilerek demografik özellikler, hastalık derecesi, hastalık alt tipi ve DNA hasarı arasındaki korelasyonlar değerlendirildi.

KAYNAKLAR

1. Correale J, Gaitan MI, Ysrraelit MC, Fiol MP. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*. 2017;140: 527- 6.
2. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol*. 2018; 31: 752-9.
3. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*; 2014;83:1022-4.
4. Amato MP, Derfuss T, Hemmer B, Liblau R, Montalban X, Soelberg SP, et al. For The 2016 Ectrims Focused Workshop Group*. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016 ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler*. 2017;24:590–603.
5. 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;83:278-6.
6. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*. 2010; 9:727-39.
7. Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79:4813-4.
8. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*. 2011;9: 54-54.
9. Juárez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017: 5828056.
10. Santos CR, Martinho A, Quintela T, Gonçalves I. Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life*. 2012;64: 126-35.
11. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull*. 2001;55: 133-45.
12. Kimura T, Kambe T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*. 2016, 17: 336.
13. Juarez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruiz C, Mendez-Armenta M. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017: 5828056.

14. Aizenman E, Mastroberardino PG. Metals and neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015;81: 1-3.
15. Giacoppo S, Galuppo M, Calabrò RS, D'Aleo G, Marra A, Sessa E, et al. Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study. *Biol Trace Elem Res.* 2014;161: 151-60.
16. Wikström J, Westermarck T, Palo J, Selenium, vitamin E and copper in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1976;54: 287-90.
17. Pawlitzki M, Uebelhör J, Sweeney-Reed CM, Stephanik H, Hoffmann J, Lux A, et al. Lower Serum Zinc Levels in Patients with Multiple Sclerosis Compared to Healthy Controls. *Nutrients.* 2018;26, 10: 967.
18. Oraby MI, Hussein M, Abd Elkareem R, Elfar E. The emerging role of serum zinc in motor disability and radiological findings in patients with multiple sclerosis. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery.* 2019;55: 60.
19. Borisovs V, Leonova E, Baumane L, Kalniņa J, Mjagkova N, Sjakste N. Blood levels of nitric oxide and DNA breaks assayed in whole blood and isolated peripheral blood mononucleated cells in patients with multiple sclerosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2019;843: 90-9
20. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J, MSCOI Study Group, European Multiple Sclerosis Platform. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal.* 2017;23: 1123-36.
21. Orrell RW. Multiple sclerosis: the history of a disease. *JRSM.* 2005;98: 289.
22. Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med.* 1948;4: 653-2.
23. 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;1583: 278-6
24. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69: 292-302.
25. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet.* 2017;389: 1336-46.
26. Kuşcu DY, Efendi H. *Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu*, Galenos Yayınevi, 2018.

27. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol.* 2018;31:752–9.
28. GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18: 269-85.
29. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol.* 2015;14: 263-73.
30. Houzen H, Kondo K, Horiuchi K, Niino M. Consistent increase in the prevalence and female ratio of multiple sclerosis over 15 years in northern Japan. *Eur J Neurol.* 2018;25: 334-9.
31. Türk Börü U, Alp R, Sur H, Gül L. Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology.* 2006;27: 17-21.
32. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020;26:1816-21
33. O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology.* 2013;40:1-12.
34. Westerlind H, Imrell K, Ramanujam R, Myhr KM, Celius EG, Harbo HF, et al. Identity-by-descent mapping in a Scandinavian multiple sclerosis cohort. *Eur J Hum Genet.* 2015;23: 688-92.
35. Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M, Lichtenstein P, Hillert J. Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain.* 2014;137: 770-8.
36. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13: 25-
37. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, Langer-Gould A. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6:1905-22.
38. Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2007;2(7): e664.

39. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015;47: 1107-13.
40. Charcot JM, Lecture VI. Disseminated Sclerosis. *Pathological Anatomy.*, in *Lectures on the Diseases of the Nervous System.* The New Sydenham Society: London. 1887;157-81.
41. Schob F. Ein Beitrag zur pathologischen Anatomie der multiplen Sklerose. *European Neurology.* 1907;22: 62-87.
42. Brownell B, Hughes JT. The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *JNNP.* 1962;25: 315.
43. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014;45: 687-97.
44. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4: 43.
45. Wootla B, Eriguchi M, Rodriguez M. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune Dis.* 2012;2012: 969657.
46. Grossman RI, Braffman BH, Brorson JR, Goldberg HI, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F. Multiple sclerosis: serial study of gadolinium-enhanced MR imaging. *Radiology.* 1988;169: 117-22.
47. Miller DH, Rudge P, Johnson G, Kendall BE, Macmanus DG, Moseley IF, Barnes D, McDonald WI. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain.* 1988;11: 927-39.
48. Young J, Quinn S, Hurrell M, Taylor B. Clinically isolated acute transverse myelitis: prognostic features and incidence. *Mult Scler.* 2009;15: 1295-302.
49. Tintore M, Rovira A, Arrambide G, Mitjana R, Río J, Auger C, Nos C, et al. Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology.* 2010;75: 1933-8.
50. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol.* 2012;11:157-69.
51. Yamout B, Al Khawajah M. Radiologically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;17:234-7.
52. Coles A. Multiple sclerosis. *Pract Neurol.* 2009;9:118-26.
53. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:134-42.

54. MS International Federation. Atlas of MS. <https://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/> Son Erişim Tarihi 12 Mart 2016.
55. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:134-42.
56. Huang WJ, Chen WW, Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp Ther Med.* 2017;(6): 3163-6.
57. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17: 162-73.
58. Kuşcu DY, Efendi H. *Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu*, 2018.
59. Naldi P, Collimedaglia L, Vecchio D, Rosso MG, Perl F, Stecco A, Monaco F, Leone MA. Predictors of attack severity and duration in multiple sclerosis: a prospective study. *Open Neurol J.* 2011;5:75-82.
60. Fymat, AL. Multiple Sclerosis: III. Treatment and Prognosis. *J Neurol Res.* 2023;4: 1-46.
61. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1993;43:655-61
62. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol.* 2019;15: 53-8.
63. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001;55: 133-45.
64. Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc.* 1957;79: 4813-4
65. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 2011;20: 54.
66. Dziegiel P, Pula B, Kobierzycki C, Stasiolek M, Podhorska-Okolow M. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;218: 1-117.
67. Capdevila M, Domènech J, Pagani A, Tío L, Villarreal L, Atrian S. Zn- and Cd-metallothionein recombinant species from the most diverse phyla may contain sulfide (S²⁻) ligands. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44: 4618-22.

68. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*. 2011;20: 54.
69. Palmiter RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8428-30.
70. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*. 2000;130:1455-8.
71. Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature*. 1985;317: 828-31.
72. Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J*. 1994;13:2870-5.
73. Günes C, Heuchel R, Georgiev O, Müller KH, Lichtlen P, Blüthmann H, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J*. 1998;17: 2846-54.
74. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89: 6333-7.
75. Séguin C. A nuclear factor requires Zn^{2+} to bind a regulatory MRE element of the mouse gene encoding metallothionein-1. *Gene*. 1991;97: 295-300.
76. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2000;35:35-70.
77. Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic Res*. 1998;29: 93-101
78. Parameswari E, Ilakiya T, Davamani V, Kalaiselvi P, Sebastian SP. Metallothioneins: Diverse protein family to bind metallic ions. *Heavy Metals-Their Environmental Impacts and Mitigation*. 2021.
79. Yazğan B, Yazğan Y. Antioksidan redoks sistemi üzerinde metallothionein ve çinko ilişkisinin önemi. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*. 2016;23:3
80. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160:1-40.

81. Dales JP, Desplat-Jégo S. Metal Imbalance in Neurodegenerative Diseases with a Specific Concern to the Brain of Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2020;21:9105.
82. Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic Res.* 1998;29:93-101
83. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 2010;129:154-69.
84. Barnham KJ, Bush AI. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12: 222-8.
85. Bush AI. Metals and neuroscience. *Curr Opin Chem Biol.* 2000;4:184-91.
86. Takeda, A. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals.* 2001;14:343-51.
87. Smart TG, Hosie AM, Miller PS. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *The Neuroscientist.* 2004;10:432-42.
88. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Isumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological reviews.* 2015.
89. Quintana A, Giralt M, Rojas S, Penkowa M, Campbell IL, Hidalgo J, et al. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res.* 2005;82: 701-16.
90. Lin RF, Lin TS, Tilton RG, Cross AH. Nitric oxide localized to spinal cords of mice with experimental allergic encephalomyelitis: an electron paramagnetic resonance study. *J Exp Med.* 1993;17:643-8.
91. Sakulsak N. Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int J Morphol.* 2012;30: 1007-12
92. Juárez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruíz C, Méndez-Armenta M. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;5828056.
93. Penkowa M, Camats J, Giralt M, Molinero A, Hernández J, Carrasco J, Hidalgo J. Metallothionein-I overexpression alters brain inflammation and stimulates brain repair in transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia.* 2003;42:287-306.
94. Quintana A, Giralt M, Rojas S, Penkowa M, Campbell IL, Hidalgo J, et al. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res.* 2005;82:701-16.

95. Espejo C, Carrasco J, Hidalgo J, Penkowa M, Garcia A, Sáez-Torres I, et al. Differential expression of metallothioneins in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*. 2001;105:1055-65.
96. Penkowa M, Espejo C, Ortega-Aznar A, Hidalgo J, Montalban X, Martínez Cáceres EM. Metallothionein expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1258-66
97. Penkowa M, Hidalgo J. Metallothionein I+II expression and their role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*. 2000;32:247-63.
98. Wang B, Fang T, Chen H. Zinc and Central Nervous System Disorders. *Nutrients*. 2023;15: 2140.
99. Kimura T, Kambe T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*. 2016;17:336
100. An Y, Li S, Huang X, Chen X, Shan H, Zhang M. The Role of Copper Homeostasis in Brain Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23:13850.
101. Ay A, Alkanli N, Atli E, Gurkan H, Gulyasar T, Guler S, et al. Investigation of Relationship Between Small Noncoding RNA (sncRNA) Expression Levels and Serum Iron, Copper, and Zinc Levels in Clinical Diagnosed Multiple Sclerosis Patients. *Mol Neurobiol*. 2023;60: 875-83
102. Brown A, Halls, JD, Taylor A. Atomic spectrometry updateclinical materials, foods and beverages. *J Anal Atomic Spectromet*. 986;1:21-35.
103. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175: 184- 91
104. Sasaki YF, Nakamura T, Kawaguchi S. What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity. *Jap Soc Altern Anim Exp*. 2007;499-504.
105. Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5- dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersolubleformazans as cell-viability indicators. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*.1991;1:611-4.
106. Card QR. Muse TM Annexin V & Dead Cell Kit. <https://www.luminexcorp.com/museannexin-v-dead-cell-kit/#overview>. Son Erişim Tarihi 23 Haziran 2023.
107. One Step-RNA Reagent | Bio Basic-Bio Basic. <https://www.biobasic.com/one-step-rna-reagent-4146>. Son Erişim Tarihi 23 Mart 2023.

108. OneScript Plus cDNA Synthesis Kit. <https://www.abmgood.com/onescript-plus-cdna-synthesis-kit.html>. Son Erişim Tarihi 23 Mart 2023.
109. Peng L, He M, Chen B, Wu Q, Zhang Z, Pang D, vd. Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. *Biomaterials*. 2013;34: 9545–58.
110. Yasar S, Yagin FH, Arslan AK, Colak C, Yoloğlu, S. Interactive web-based software for evaluating diagnostic tests and roc curve analyses in health sciences. *Ann Med Res*.2021;28: 2012-8
111. Weiner, H.L., A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2008;255: 3-1.
112. Milo, R., & Kahana, E. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews*. 2010;9:387-94.
113. Penkowa, M. Metallothionein expression and roles in the central nervous system. *Biomedical Reviews*. 2002;13:1-15.
114. Kim JH, Nam YP, Jeon SM, Han HS, Suk K. Amyloid neurotoxicity is attenuated by metallothionein: dual mechanisms at work. *J Neurochem*. 2012;121:751-62.
115. Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, Martínez-Cáceres EM, Carrasco J, Quintana A, et al. Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Exp Biol Med*. 2006;23:1450-8.
116. Comes G, Fernandez-Gayol O, Molinero A, Giralt M, Capdevila M, Atrian S, et al. Mouse metallothionein-1 and metallothionein-2 are not biologically interchangeable in an animal model of multiple sclerosis, EAE. *Metallomics*. 2019;11:327-337.
117. Cesani M, Cavalca E, Macco R, Leoncini G, Terreni MR, Lorioli L, et al. Metallothioneins as dynamic markers for brain disease in lysosomal disorders. *Ann Neurol*. 2014;75:127-37.
118. Jakovac H, Grebić D, Tota M, Barac-Latas V, Mrakovčić-Sutić I, Milin C, et al. Time-course expression of metallothioneins and tissue metals in chronic relapsing form of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histol Histopathol*. 2011;26:233-45.
119. Fogel A, Olcer M, Goel A, Feng X, Reder AT. Novel biomarkers and interferon signature in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2024;389: 578328.
120. Yazgan B, Yazgan Y. Importance of relationship metallothioneins and zinc. *Med J SDU*. 2014;23:104-11.

121. Corona C, Masciopinto F, Silvestri E, Viscovo AD, Lattanzio R, Sorda RL, et al. Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis.* 2010;1: e91.
122. Armon-Omer A, Waldman C, Simaan N, Neuman H, Tamir S, Shahien R. New Insights on the Nutrition Status and Antioxidant Capacity in Multiple Sclerosis Patients. *Nutrients.* 2019;11: 427.
123. Bredholt M, Frederiksen JL. Zinc in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ASN Neuro.* 2016;8: 1759091416651511.
124. Nirooei E, Kashani SMA, Owraangi S, Malekpour F, Niknam M, Moazzen F, et al. Blood Trace Element Status in Multiple Sclerosis: a Systematic Review and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200:13-26.
125. Penkowa M, Espejo C, Martinez-Caceres EM, Poulsen CB, Montalban X, Hidalgo J. Altered inflammatory response and increased neurodegeneration in metallothionein I+II deficient mice during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2001;119:248–60.
126. Sarmadi M, Bidel Z, Najafi F, Ramakrishnan R, Teymoori F, Zarmehri HA, et al. Copper concentration in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2020;45:102426.
127. Mezzaroba L, Alfieri DF, Colado Simão AN, Vissoci Reiche EM. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology.* 2019;74:230-41.
128. Johnson S. The possible role of gradual accumulation of copper, cadmium, lead and iron and gradual depletion of zinc, magnesium, selenium, vitamins B2, B6, D, and E and essential fatty acids in multiple sclerosis. *Med Hypotheses.* 2000;55:239-41.
129. Richards RI, Heguy A, Karin M. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell.* 1984;37:263-72.
130. Okita Y, Rcom-H'cheo-Gauthier AN, Goulding M, Chung RS, Faller P, Pountney DL. Metallothionein, Copper and Alpha-Synuclein in Alpha-Synucleinopathies. *Front Neurosci.* 2017;11:114.
131. Wong YC, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2017,23:1-13.

132. Ghazavi A, Kianbakht S, Ghasami K, Mosayebi G. High copper and low zinc serum levels in Iranian patients with multiple sclerosis: a case control study. *Clin Lab*. 2012;58:161-4.
133. Baghizadeh S, Sahraian MA, Beladimoghadam N. Clinical and demographic factors affecting disease severity in patients with multiple sclerosis. *Iran J Neurol*. 2013;12:1-8.
134. Kang JH, Chen YH, Lin HC. Comorbidities amongst patients with multiple sclerosis: a population-based controlled study. *Eur J Neurol*. 2010;17:1215-19.
135. Beck CA, Metz LM, Svenson LW, Patten SB. Regional variation of multiple sclerosis prevalence in Canada. *Mult Scler*. 2005;11:516-9.
136. Salzer J, Hallmans G, Nyström M, Stenlund H, Wadell G, Sundström P. Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19:1022-7.
137. Baydar M, Aydin S, Bucurgat Ündeğer Ü, Orhan, G., Ak F, Başaran N. Assessment of DNA damage in the peripheral lymphocytes of patients with Parkinson's disease and multiple sclerosis using the comet assay Parkinson ve multipl skleroz hastalari {dotless} ni {dotless} n periferal lenfositlerindeki DNA hasari {dotless} ni {dotless} n comet yöntemiyle değerlendirilmesi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2013, 33: 4.
138. Fılıpek B, Poplawski T. Elevated Level of DNA Damage and Impaired Repair of DNA Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Patients (P7-6.010). In: *Neurology*. 2024;7185.
139. Menezes KM, Algarve TD, Flôres FS, Cruz IBM, Copetti F, Silveira AF. DNA damage and postural balance in multiple sclerosis patients. *Fisioterapia em Movimento*. 2017;30:85-91.
140. Borisovs V, Bodrenko J, Kalnina J, Sjakste N. Nitrosative stress parameters and the level of oxidized DNA bases in patients with multiple sclerosis. *Metabolic Brain Disease*. 2021;36:1935-41.
141. Lee SR. Cellular toxicity of zinc can be attenuated by sodium hydrogen sulfide in neuronal SH-SY5Y cell. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2018;14:425-36.
142. Liu W, Fan Z, Gao F, Ou L, Li M, Zhou X, et al. Emodin inhibits zinc-induced neurotoxicity in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biosci Rep*. 2019;39:BSR20182378.
143. Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci*. 2013;19: 33.

144. Levenson CW, Morris D. Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. *Adv Nutr.* 2011;2:96-100.
145. Goto N, Hara H, Kondo M, Yasuda N, Kamiya T, Okuda K, et al. Hydrogen sulfide increases copper-dependent neurotoxicity via intracellular copper accumulation. *Metallomics.* 2020;12:868-75.
146. McLeary FA, Rcom-H'cheo-Gauthier AN, Kinder J, Goulding M, Khoo TK, Mellick GD, Chung RS, Pountney DL. Dexamethasone Inhibits Copper-Induced Alpha-Synuclein Aggregation by a Metallothionein-Dependent Mechanism. *Neurotox Res.* 2018;33:229-38.
147. Oppermann B, Zhang W, Magabo K, Kantorow M. Identification and spatial analysis of metallothioneins expressed by the adult human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:188-93.
148. Bartkowska K, Swiatek I, Aniszewska A, Jurewicz E, Turlejski K, Filipek A, et al. Stress-Dependent Changes in the CacyBP/SIP Interacting Protein S100A6 in the Mouse Brain. *PLoS One.* 2017;12:e0169760.
149. Juárez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruíz C, Méndez-Armenta M. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:5828056.
150. Ogra Y, Suzuki K, Gong P, Otsuka F, Koizumi S. Negative regulatory role of Sp1 in metal responsive element-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2001;276: 16534-9.
151. Bousleiman J, Pinsky A, Ki S, Su A, Morozova I, Kalachikov S, et al. Function of Metallothionein-3 in Neuronal Cells: Do Metal Ions Alter Expression Levels of MT3? *Int J Mol Sci.* 2017;18:1133.
152. Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *PLoS One.* 2011;6:e21526.
153. Grzywacz A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B, Tyszka-Czochara M, Librowski T, Opoka W. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochim Pol.* 2015;62:491-8.
154. McHugh PC, Wright JA, Brown DR. Transcriptional regulation of the beta-synuclein 5'-promoter metal response element by metal transcription factor-1. *PLoS One.* 2011;28:e17354.
155. Chung RS, Adlard PA, Dittmann J, Vickers JC, Chuah MI, West AK. Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *J Neurochem.* 2004;88:454-61.

156. Chung RS, Howells C, Eaton ED, Shabala L, Zovo K, Palumaa P, et al. The native copper- and zinc-binding protein metallothionein blocks copper-mediated Abeta aggregation and toxicity in rat cortical neurons. *PLoS One*. 2010;11:e12030.
157. Tarapore P, Shu Y, Guo P, Ho SM. Application of phi29 motor pRNA for targeted therapeutic delivery of siRNA silencing metallothionein-IIA and survivin in ovarian cancers. *Mol Ther*. 2011,19:386-94.
158. Person RJ, Tokar EJ, Xu Y, Orihuela R, Ngilame NN, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013,273:281-8.
159. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*. 2012;4:739-50.
160. Naruse S, Igarashi S, Furuya T, Kobayashi H, Miyatake T, Tsuji S. Structures of the human and mouse growth inhibitory factor-encoding genes. *Gene* 1994, 8: 283-7.
161. Koh JY, Lee SJ. Metallothionein-3 as a multifunctional player in the control of cellular processes and diseases. *Mol Brain*. 2020;13:116.
162. Montoliu C, Monfort P, Carrasco J, Palacios O, Capdevila M, Hidalgo J, et al. Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J Neurochem*. 2000;75:266-73.
163. Sogawa CA, Asanuma M, Sogawa N, Miyazaki I, Nakanishi T, Furuta H, et al. Localization, regulation, and function of metallothionein-III/growth inhibitory factor in the brain. *Acta Med Okayama*. 2001;55: 1-9.
164. Bousleiman J, Pinsky A, Ki S, Su A, Morozova I, Kalachikov S, et al. Function of Metallothionein-3 in Neuronal Cells: Do Metal Ions Alter Expression Levels of MT3? *Int J Mol Sci*. 2017;18:1133.
165. Adam P, Křížková S, Heger Z, Babula P, Pekařík V, Vaculovičová M, et al. Metallothioneins in Prion- and Amyloid-Related Diseases. *J Alzheimers Dis*. 2016;51:637-56.
166. Choudhuri S, Liu WL, Berman NE, Klaassen CD. Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicol Lett*. 1996;84:127-33.
167. Tsui KH, Hou CP, Chang KS, Lin YH, Feng TH, Chen CC, et al. Metallothionein 3 Is a Hypoxia-Upregulated Oncogene Enhancing Cell Invasion and Tumorigenesis in Human Bladder Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;23:980.

168. Mahmoud A, Elif GE, Gül O. Copper (II) Oxide nanoparticles induce high toxicity in human neuronal cell. *Glob J Med Res.* 2016;16:7-14.
169. Pradhan SH, Liu JY, Sayes CM. Evaluating Manganese, Zinc, and Copper Metal Toxicity on SH-SY5Y Cells in Establishing an Idiopathic Parkinson's Disease Model. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24:16129.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Belgesi





