

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Capparis ovata* EKSTRESİNİN DENEYSEL MULTİPL SKLEROZ HAYVAN
MODELİNDE ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS
Özden ÖZGÜN**

Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

**Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN
Prof. Dr. Alaattin ŞEN (Eş Danışman)**

TEMMUZ 2012

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 091461009 nolu öğrencisi Özden ÖZGÜN tarafından hazırlanan “*Capparis ovata* Ekstresinin Deneysel Multipl Skleroz Hayvan Modelinde Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı :
(Jüri Başkanı)

Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN (PAÜ)

Jüri Üyesi :
(Eş Danışman)

Prof. Dr. Alaattin ŞEN (PAÜ)

Jüri Üyesi :

Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN (PAÜ)

Jüri Üyesi :

Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN (PAÜ)


Jüri Üyesi :

Yrd. Doç. Dr. Tuğba TÜMER (ÇOMÜ)

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/08/2012 tarih ve 19/26 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza : 

Öğrenci Adı Soyadı : Özden ÖZGÜN

ÖNSÖZ

Capparis ovata Ekstresinin Deneysel Multipl Skleroz Hayvan Modelinde Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması çalışması, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji araştırma laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde yardımcı olan, tez çalışması süresince yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN' a ve Eş Danışmanım olan Prof. Dr. Alaattin ŞEN hocama şükranlarımı sunarım.

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN, Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN ve Yrd. Doç. Dr. Tuğba TÜMER'e teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını eksik etmeyen tüm Bölüm Hocalarıma, laboratuvar çalışmalarımında desteğini ve bilgilerini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Aslı SEMİZ hocama, laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deney hayvanlarıyla çalışmalarımında yardımlarını benden esirgemeyen veteriner hekim Barbaros ŞAHİN'e ve çalışmalarım için Kapari ürünlerini sağlayan Aşçı Murat Mihladi Arge Üretim Merkezine ayrıca teşekkür ederim.

Maddi destek sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2010FBE048) ve KOSGEB (2011/1-3)'e teşekkür ederim.

Son olarak, bu güne kadar her konuda yanımda olan ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2012

Özden ÖZGÜN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Multipl Skleroz	1
1.1.1. Prevalans ve Epidemiyoloji.....	2
1.1.2. Genetik	3
1.1.3. Hastalığın Seyri.....	4
1.1.4. MS Patolojisi.....	5
1.2. Multipl Skleroz İle İlişkili Genler.....	6
1.2.1. Multipl Skleroz İle İlişkili Miyelin Antijenleri.....	6
1.2.2. Matriks Metalloproteinazlar	10
1.2.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)	11
1.2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	13
1.3. Deneysel Alerjik Ensefalomyelit	14
1.4. Deneysel Materyal: Kapari.....	17
1.5. Çalışmanın Amacı.....	19
2. MATERYAL ve METOT.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	20
2.1.3. Çalışmada kullanılan kitler	21
2.1.4. Hayvan temini	21
2.1.5. Kapari ekstresi	21
2.1.6. Primerler	21
2.2. Metotlar	23
2.2.1. Kapari sulu ekstresinin hazırlanması.....	23
2.2.2 MS modeli (Deneysel Alerjik Ensefalomyelit) oluşturulması	23
2.2.3 Kapari ekstresinin verilmesi	24
2.2.4. Dokuların temini	25
2.2.5. Total RNA izolasyonu.....	25
2.2.5. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.....	26
2.2.6. cDNA sentezi.....	26
2.2.8. Yarı Kantite Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	27
2.2.9. İstatistiksel analiz	29
3. BULGULAR	30
3.1. Deneysel alerjik ensefalomyelit induksiyonu.....	30
3.2. Hayvan Beyin Dokularından Total RNA İzolasyonu	32
3.3. MS İle İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Tayini.....	33
3.3.1. 2',3'- siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz (CNP).....	34
3.3.2. Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG)	35

3.3.3. Miyelin Temel Protein (MBP).....	36
3.3.4. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2).....	37
3.3.5. Nükleer Faktör Kappa B p50 (NF-κB p50).....	38
3.3.6. Nükleer Faktör Kappa B p65 (NF-κB p65).....	39
3.3.7. Proteolipid Protein (PLP)	40
3.3.8. Periferel Miyelin Protein (PMP).....	41
3.3.9. Tümör Nekrozis Faktör α (TNF-α).....	42
3.3.10 Beta Aktin (β Aktin).....	43
4. TARTIŞMA.....	44
5. SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR.....	53

KISALTMALAR

μL	: Mikrolitre
AGE	: Agaroz jel elektroforezi
BÇ	: Baz çifti
CNP	: 2', 3'- siklik nükleotit 3'- fosfodiesteraz
DAE	: Deneysel Alerjik Ensefalomiyelit
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
GA	: Glatiramer asetat
KBB	: Kan beyin bariyeri
MAG	: Miyelin ilişkili glikoprotein
MBP	: Miyelin temel protein
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mM	: Mili molar
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MOG	: Miyelin oligodendrosit glikoprotein
MS	: Multipl skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
°C	: Santigrat derece
PLP	: Proteolipit protein
PMP	: Periferel miyelin protein
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribo nükleik asit
TAE	: Tris-asetik asit-EDTA
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
UV	: Ultra viole
SS	: Standart sapma

TABLO LİSTESİ

Tablolar

1.1: MS patojenezinde rol oynayan ve otoantikör oluşumuna neden olduğu gösterilen miyelin ve diğer MSS antijenleri.....	6
1.2: MSS miyelin tabakasında bulunan proteinler	8
1.3: MS hastalarının tedavi amaçlı kullandıkları alternatif ürünler.....	17
1.4: Kapari bitkisinin içeriği.	18
2.1: Primerler ve özellikleri	22
2.2: MS takibinde kullanılan skorlama tablosu.....	24
2.3: cDNA sentez karışımı.....	27
2.4: Çalışılan genlerin PZR koşulları	28
2.5: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları.....	28
4.1:Çalışılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası farklılıkları	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

1.1: Multipl skleroz hastalığının coğrafik dağılımı	2
1.2: Multipl skleroz için potansiyel tetikleyiciler.....	3
1.3: Oligodendrositlerin miyelin tabakası yapımı	5
1.4: Miyelin tabakası proteinleri.	7
1.5: NF-κB'nin rol aldığı hastalık grupları	12
1.6: NF-κB aktivasyonu.....	13
1.7: DAE indüksiyonu ve skorlama ölçekleri.	15
1.8: Capparis ovata	18
3.1: Kontrol, Deneysel MS (DAE), Deneysel MS (DAE)+kapari ekstresi ve Deneysel MS (DAE)+kapari ekstresi (paralel) farelerde gözlenen klinik skorlar.....	31
3.2: DAE ve tedavi grubu hayvanların ulaştığı ortalama maksimum skorlar.	32
3.3: Deney hayvanlarının beyin dokularından izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi.	33
3.4: Kapari ekstresinin CNP mRNA seviyesine olan etkisi.....	34
3.5: Kapari ekstresinin MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	35
3.6: Kapari ekstresinin MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....	36
3.7: Kapari ekstresinin MMP-2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	37
3.8: Kapari ekstresinin NF-κB p50 mRNA seviyesine olan etkisi.....	38
3.9: Kapari ekstresinin NF-κB p65 mRNA seviyesine olan etkisi.....	39
3.10: Kapari ekstresinin PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	40
3.11: Kapari ekstresinin PMP mRNA seviyesine olan etkisi.....	41
3.12: Kapari ekstresinin TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.....	42
3.13: Beta aktin PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi.	43

ÖZET

***Capparis ovata* EKSTRESİNİN DENEYSEL MULTİPL SKLEROZ HAYVAN MODELİNDE ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI.**

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) demiyelinizasyon ve inflamasyonunu içeren, beyin ve omurilikte plakların oluşumuna neden olan bir otoimmün hastalıktır. Çalışmada kullanılan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml.ve İhr.Ltd. tarafından sağlanmıştır. Çalışmamızda halk arasında sıklıkla kullanılan ve MS hastalığının tedavisi için umut vaat eden *Capparis ovata* bitkisinden elde edilmiş, kapari ekstrenin deneysel MS modelinde tedavi edici etkisinin var olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplamda 41 adet 6-8 haftalık C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Hayvanlarda deneysel MS modeli olan Deneysel Alerjik Ensefalomyelit (DAE) oluşturulmuştur. DAE oluşturulan hayvanlar hasta kontrol grubu ve kapari tedavi grubu olarak iki gruba ayrılmış; kapari tedavi grubuna 21 gün hayvan başına 500 mg/kg ağırlık olacak şekilde kapari ekstresi intragastik gavaj ile verilmiştir. Süreç sonunda farelerin beyin dokuları alınmıştır. Beyin dokularından RNA izolasyonu “Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA’lardan “Easy Script Plus cDNA sentez kiti” kullanılarak elde edilen cDNA’lar ile RT-PCR yapılmış ve MS hastalığında marker genler olan 2’,3’-siklik nükleotid 3’-fosfodiesteraz (CNP), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG), miyelin bazik proteini (MBP), matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), Nükleer faktör kappa B p50 ve p65 alt birimleri (NF κB p50 ve p65), proteolipit protein (PLP), periferal miyelin protein (PMP) ve tümör nekrozis faktör α (TNF-α)’nın ekspresyon düzeyleri arasındaki farklara bakılmıştır. CNP, MAG, MBP, PLP ve PMP mRNA ekspresyon düzeylerinde DAE grubunda kontrole göre azalma gözlenirken; kapari uygulanan grupta bu genlerin ekspresyon düzeylerinde kontrol değerlerine geri dönüşler olmuştur. Bunun yanında MMP-2, NF-κB p50 ve p65 alt birimlerinde ve TNF-α ekspresyon düzeylerinde DAE grubunda kontrole göre artış gösterirken; kapari tedavi grubunda kontrol değerlerine geri düşüşler söz konusudur. Sonuçlar elde edilen kapari ekstresinin MS hastalığı için tedavi edici ve koruyucu etkiler barındırıyor olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Capparis ovata*, MS, mRNA, ekspresyon

SUMMARY

INVESTIGATING THE MOLECULAR MECHANISMS OF THE EFFECTS OF *Capparis ovata* EXTRACT IN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease of central nervous system (CNS) that contains demyelization leading patches of plaques formation in CNS. Caper parts were supplied by Asci Murat Capers, Ice Cream, Dessert and Pickle Manufacturing & Export Co., Ltd. Caper has been widely used by the traditional medicine for healing effects in certain pathological conditions. The aim of the present study is to determine the possible therapeutic effect of *Capparis ovata* extract an experimental model of MS. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in six to eight-week-old female C57 BL/6 mice by the procedure which had been described previously. Mice were randomly assigned to two groups: EAE control mice and caper extract-treated EAE mice. Caper extract-treated EAE mice, received 500 mg extract per kg body weight intragastrically for 21 days while EAE control subjects received only water. Animals were killed by decapitation and brains were removed. Total RNA was isolated using “Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” in accordance with the manufacturer’s standard protocol. RT-PCR was performed using the First-Strand cDNA Synthesis System following the manufacturer’s protocol. We have observed the same levels of mRNA expressions for 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), myelin associated glycoprotein (MAG), myelin basic protein (MBP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), NF- κ B p50 and p65 sub unit, proteolipid protein (PLP), peripheral myelin protein (PMP) and tumor necrosis factor α (TNF- α) studied in both Caper extract-treated mice, EAE control mice, caper extract fed- and control- mice. While CNP, MAG, MBP, PLP and PMP mRNA level are decreased to compare control, Caper group are returned control level. In addition, MMP-2, NF- κ B p50 and p65 sub unit and TNF- α expression levels was increased to compare control. Caper treatment group was decreased. This result shown that caper extract may be therapeutic and protective effect for MS.

Key words: *Capparis ovata*, MS, mRNA, expression

1. GİRİŞ

Birçok bitkinin insan sağlığı üzerine olan etkileri şüphesiz asırlardır bilinmektedir ve son birkaç yüz yılda alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların bitkilere ve de onlardan elde edilen ekstrelelere olan ilgisi de, kuşkusuz diyetle alınan sebze ve meyvelerin iğerdiği fitokimyasallar hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde olduğu gibi ülkemizde de lokman hekimcilik, son yıllarda bilimsel çalışmaların alternatif tıp üzerine yoğunlaşması ile hız kazanmaktadır. Hatta Avrupa'nın birçok yerinde bu bitkisel kimyasallar ana kaynağından saflaştırılarak ya da çeşitli preparatlar halinde veya diyetel katkı maddeleri olarak pazarlanmaktadır ve pek çok hastalığın alternatif tıpla tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu bitkilerden bir tanesi kapari olarak ta bilinen *Capparis ovata*'dır. Kapari Türkiye'de ve dünyada insanlar arasında kullanımı yaygın olan bir bitkidir. Son yıllarda bu bitki, henüz kesin tedavisi olmayan, dünyada milyonlarca kişiye etkilediği bilinen Multipl Skleroz hastalığının tedavisi ve bu hastalığın alevli dönem semptomlarının azaltılması için halk arasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

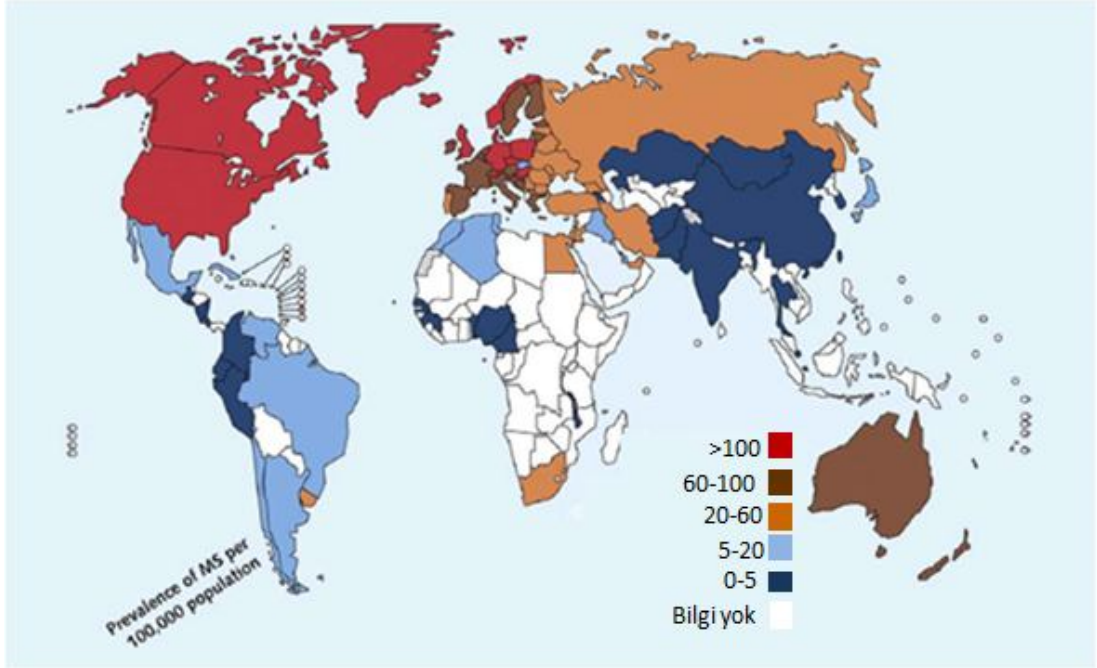
1.1. Multipl Skleroz

Multipl Skleroz (MS) genellikle genç erişkin yaşlarda başlayan, otoimmün karakterde inflamatuvar ve demiyelizan bir hastalıktır (Prryse, 2001). Bu hastalık genç insanlarda trafik kazaları dışında nörolojik nedenli zrllklerde birinci sırayı almaktadır (Noseworthy, 1999; Noseworthy ve diğ. 2000). MS ile ilgili ilk bilgiler, Charles Prosper Ollivier d'Angers'in 1824 yılında yaptığı bildiriye dayanmaktadır. MS ile ilgili ilk makroskopik değişiklikler ise, "skleroz plak" tanımı Charcot tarafından 1868 yılında bildirilmiştir (Murray, 2009). Charcot hastalığı tanımlamış ilk patolojik sürecin miyelin yıkımı ile ortaya çıktığını ve miyelin kaybı olan alanlarda skleroz plakların oluştuğunu göstermiş ve hastalığa *La Sclerose en Plaques* adını vermiştir. MS'in hayvan modeli olan Deneysel Alerjik Ensefalomyelitin

(DAE) 1932 yılında geliştirilmesi ile birlikte MS'in immün sistemin bir hastalığı olduğuna karar verilmiştir.

1.1.1. Prevalans ve Epidemiyoloji

Hastalığın tüm dünyada yaklaşık 2,5 milyon insanı etkilediği tahmin edilmektedir (Milo ve Kahana, 2010). Hastalığın prevalansı Asya kıtasında ve tropikal bölgelerde 5/100.000 iken bu oran ılıman bölgelerde >100-200/100.000'dir (Rosati, 2001) (Şekil 1.1). MS sadece hasta ve hasta yakınlarının yaşam kalitesini etkilemekle kalmayıp ciddi sosyo-ekonomik olumsuzluklara neden olan bir hastalıktır. Örneğin, İngiltere'de 1,5 milyar sterlini aşan bir maliyeti olduğu belirtilmektedir (Trisolini, 2010). Tipik olarak MS' in ilk belirtileri 15 ve 50 yaşlar arasında ortaya çıkmaktadır. Ancak bu belirtiler 3 yaşında başlayıp 70'li yaşlara kadar da uzanabilmektedir. Hastalık sıklıkla genç erişkin yaşlarda ortaya çıkıp 20-40 yaşları arasında pik yapmaktadır.



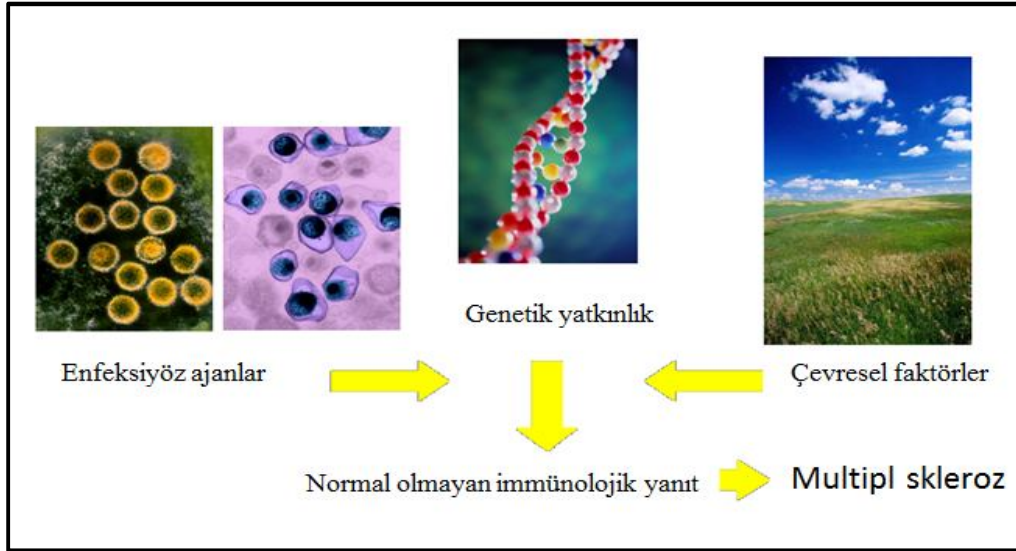
Şekil 1.1: Multipl skleroz hastalığının coğrafik dağılımı (From atlas MS resources in the world, 2008)

Dünyada MS prevalans oranları irksal ilişki göstermektedir. Beyaz ırkta risk yüksekken; Siyah ırkta oldukça düşüktür. Bu hastalık Afrika'daki siyahlarda yok denecek kadar az görülürken, ABD'de aynı yerleşim bölgelerinde yaşayan beyazlarla karşılaştırıldığında siyahlarda insidans çok daha düşüktür. Ancak ülkenin kuzeyine gidildikçe beyazlarda olduğu gibi siyahlarda da insidans artmaktadır. Bu da MS'de

genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığını düşündürmektedir (Saud ve Miller, 1995). Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi multipl sklerozda kadınlarda erkeklerden daha sık görülür. Kadın erkek oranı 2:1 ile 3:1 arasında değişmektedir (Hawkins ve McDonnell, 1999)

1.1.2. Genetik

Genetik bileşenin karmaşıklığı ailesel çalışmalar ve son dönemlerde gerçekleştirilen tüm genom çalışmalarıyla ortaya konulmuştur. Hastaların birinci derece akrabalarında %5 yüksek risk olması ve tek yumurta ikizlerinde %25-30 daha yüksek oranda MS görülmesi bu karmaşıklığı ve yatkınlığı desteklemektedir (Dyment, 2004). Ancak, tek yumurta ikizlerindeki kesin MS tanısındaki düşük ilişki, çevresel faktörlerin bu hastalığın etiolojisinde oldukça önemli olduğunu da göstermektedir. Viral enfeksiyonlar, sigara ve D vitamini eksikliği gibi faktörlerin MS patojenezinde önemli olduğu ileri sürülmektedir (Handel ve Williamson, 2010; Taylor, 2011). Sonuç olarak MS'in etyolojisi bilinmemekle birlikte genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve bozulmuş immün yanıt hastalığın oluşumuna katkıda bulunan temel faktörler arasında gösterilmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Multipl skleroz için potansiyel tetikleyiciler (Noseworthy ve diğ. 2000).

1.1.3. Hastalığın Seyri

MS hastalığının klinik sınıflandırılması büyük ölçüde hastalığın seyrine dayanmaktadır ve genel olarak 4 tipi vardır (Stauffer, 2006).

1. Selim ya da İyi huylu MS (Benign MS)

Hastaların %20 sinde iyi huylu gidiş söz konusudur. Bu tabloda ilk belirtiler başladıktan 10 yıl sonra hastalarda tam iş gücü mevcut olup bağımsız hareket edebilmektedirler. Bu hastalar MS nedeni ile kısıtlanmazlar.

2. Nükseden-İyileşen MS (Relapsing-Remitting MS)

Akut ataklar ve bunları izleyen tam ya da tama yakın düzelme dönemleri ve ataklar arasında hastalığın stabil kalması ile karakterize en sık rastlanan formdur. İleriki ataklar tahmin edilemeyen aralar ile ortaya çıkar. Her bir ataktan sonra hastaya ait özür lülük giderek artar. İlerleyen dönemde bu tipin sekonder progresif forma dönebilme eğilimi vardır.

3. İkincil İlerleyen MS (Secondary Progressive MS)

Erken dönemli relaps ve remisyonlar ile giden klinik form ortalama 5-6 yıl sonra sıklıkla bu forma dönüşebilmektedir. Ataklardan tam düzelme olmaksızın her bir atakta eklenen özürlerle hastanın kısıtlanması giderek artmaktadır.

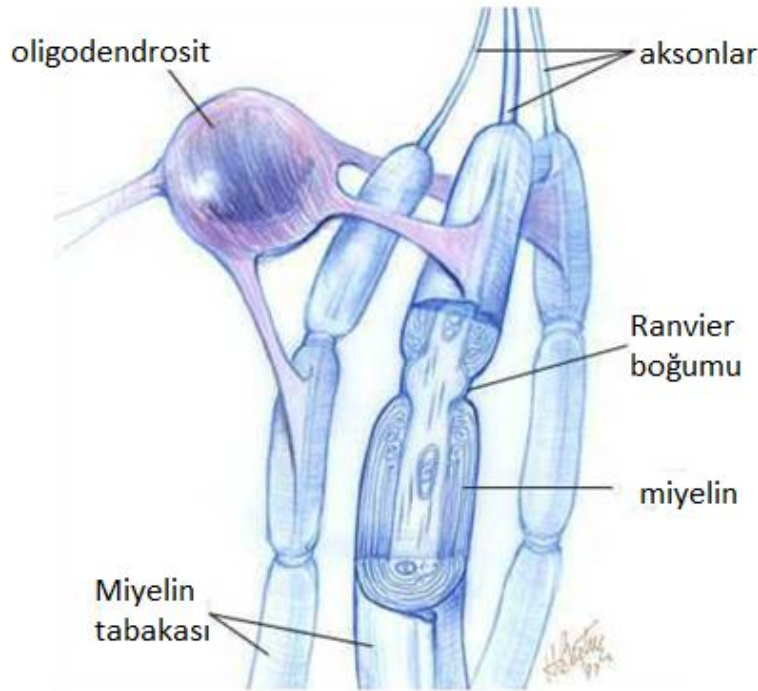
4. Birincil İlerleyen MS (Primary Progressive MS)

Genellikle iyileşmelerin kaydedilmediği, başlangıçtan itibaren hastalığın ilerlemesi ile karakterize olan formdur. Progresyon hızı değişkendir, en ağır formunda MS birkaç yıl içinde ölüm ile sonuçlanabilir. Tam tersine daha kronik yavaş ilerleyici formlarında iyi huylu gidiş benzeri bir seyir olmaktadır.

İkincil ilerleyen MS' in immünopatolojisi, başlangıçta birincil ilerleyen MS'in patolojisinin üst üste geldiği tekrarlayan MS'tir. Tekrarlayan MS'te, merkezi sinir sistemi (MSS) beyaz maddesinin aldığı hasarın çoğunun, MSS'e kan yoluyla giren otoreaktif T hücreleri yoluyla gerçekleştiği birincil ilerleyen ve ikincil ilerleyen MS'in, birbirine bitişik beyincik ve omurilik korteksinde demiyelinizasyona yol açan, beyin zarındaki lenf folüküllerinde yer alan B hücreleri tarafından üretilen antikorlar yoluyla oluştuğu önerilmektedir (Serafini ve diğ. 2004).

1.1.4. MS Patolojisi

MS lezyonlarının temel özelliği aksonun göreceli olarak korunduğu, buna karşın gelişimini tamamlamış miyelin kılıfın yıkımı ile seyreden demiyelinizasyondur. MS'in karakteristiği, miyelin tabakayı yapan hücreler olan oligodendrositlerde (Şekil 1.3) meydana gelen ve immünolojik olarak düzenlenen hasardır. Plaklarda çok sayıda akson kesintisiz yol izlerken, miyelin kılıfın yokluğu iletimi bozar ve sonuçta nörolojik hasar oluşan nöronlarda aksonal iletim yavaşlaması olur.



Şekil 1.3: Oligodendrositlerin miyelin tabakası yapımı

Erişkinde miyelin elektriksel akımın izolatörü, yüksek rezistanslı düşük kapasitans gösteren bir membran özelliğinde olup, akson boyunca sinyal iletiminin daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır. Sinir sisteminde normal koşullarda miyelinin oynadığı temel rol, miyelin kaybı ile giden hastalıklar incelenerek ortaya konmuştur. Guillain-Barre sendromu ve Charcot-Marie-Tooth hastalığında Çevresel Sinir Sistemi miyelinini etkilenirken, multipl sklerozda (MS) Merkezi Sinir Sistemi miyelinini tutulmaktadır (Dangond, 2002). Akut toksik, viral, mekanik ya da otoimmün-kökenli olayları takiben demiyelinizasyon ortaya çıkabilmektedir. Ancak MS'deki demiyelinizasyona tam olarak neyin neden olduğu, yani hastalığın tam

sebebi hala bilinmemektedir ve MS için kesin tedavi bu güne kadar yapılan çalışmalarda bulunamamıştır. MS olgularında merkezi sinir sistemi boyunca demiyelinizasyonun değişen dağılımı nedeniyle denge, koordinasyon, kas kuvveti ve duyuda bozukluklar görülebilir (Dangond, 2002).

1.2. Multipl Skleroz İle İlişkili Genler

1.2.1. Multipl Skleroz İle İlişkili Miyelin Antijenleri

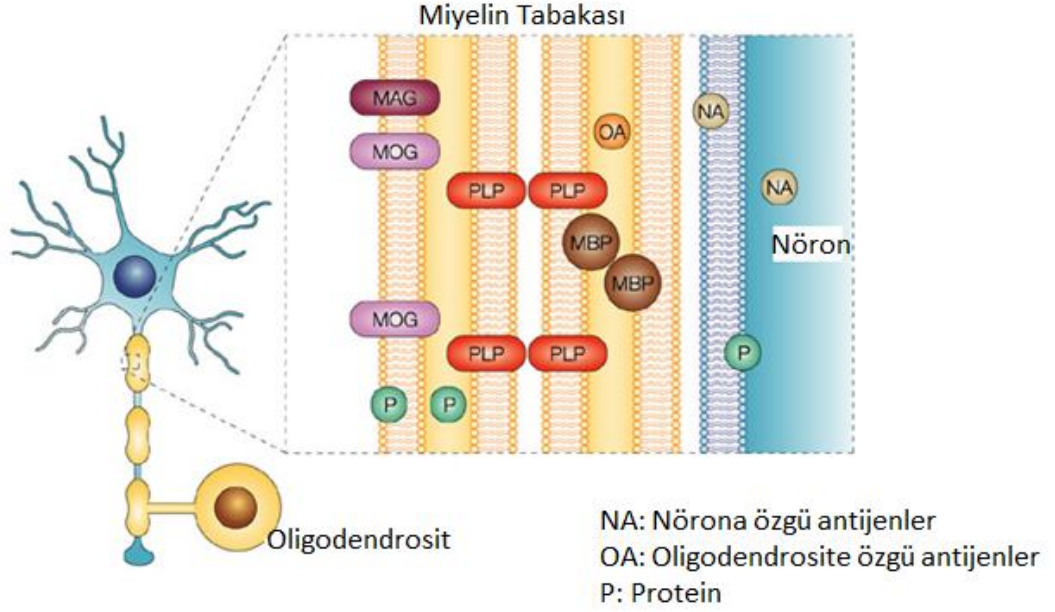
Son yirmi yılda gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde demiyelinizasyonun MS'in en belirgin patolojik özelliği olduğu ve miyelin ilişkili antijenlerin *in vivo* antikor aracılı demiyelinizasyon için hedefler oluşturduğu birçok çalışma ile desteklenmiştir (McLaughlin ve Wucherpfennig, 2008). MS patojenezinde rol oynadığı gösterilen/iddia edilen otoantikor oluşumuna neden olduğu saptanan miyelin ve diğer MSS antijenleri aşağıdaki Tablo 1.1'de derlenmiştir (Reindl ve diğ. 2003; Schwab, 2004; Mathey ve diğ. 2007; Mi ve diğ. 2007; Derfuss ve diğ. 2010). Bu antijenlerin hastalığın oluşumunda ve patofizyolojisinde değişen rolleri vardır, ancak hiçbirisi sadece MS için özgün değildir. Bu antijenlere karşı geliştirilen antikor tepkiler aynı zamanda potansiyel prognozitik markörler olarak ta kullanılmaktadır.

Tablo 1.1: MS patojenezinde rol oynayan ve otoantikor oluşumuna neden olduğu gösterilen miyelin ve diğer MSS antijenleri

Alfa-B-kristallin	Miyelin temel proteini
Alu tekrarlar	Miyelin oligodendrosit glikoprotein
2' 3'-siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz	Nörofascin
GalaktoserebrositC	Nörofilament
Gangliosid	Fosfatidilkolin
Glikopeptidler	Oligodendrosit spesifik protein
Isı şok proteini 60	Proteolipit protein
Isı şok proteini 90	Proteozom
Miyelin ilişkili glikoprotein	Transaldolaz

MS hastalarında görülen karakteristik birincil demiyelinizasyon ve bunun miyelin proteinleri yardımıyla immünizasyonu sonucu bu durumun deneysel olarak tekrarlanması göz önüne alındığında MS'deki oto antikorların ana hedefi kuvvetle muhtemel miyelin antijenleridir.

Sinir aksonlarını çevreleyen miyelin kılıf benzersiz çoklu lamelli yapıya sahiptir. Akson boyunca aksiyon potansiyeli iletim hızını bu multi lamel yapının bütünlüğü belirler. MSS miyelin tabakasında bulunan proteinler (Şekil 1.4), miyelin örtüsündeki miktarlarına ve yerlerine göre Tablo 1.2’de listelenmiştir.



Şekil 1.4: Miyelin tabakası proteinleri (Hemmer ve diğ. 2002).

MS hastaları, miyelin temel proteini (MBP), miyelin proteolipid proteini (PLP), miyelin/oligodendrosit glikoprotein (MOG), oligodendrosit spesifik protein (OPS), miyelin ile ilişkili oligodendrosit baz protein (MOBP), periferel miyelin protein (PMP) ve 2',3'-siklik nükleotid 3-fosfodiesteraz (CNP)'da dahil olmak üzere çeşitli miyelin proteinlerine karşı T hücresi reaktifliğine sahiptirler (Sospedra ve Martin, 2005).

Tablo 1.2: MSS miyelin tabakasında bulunan proteinler

Protein	Bulunma Oranı	Lokalizasyon
Proteolipid protein (PLP)	MSS miyelin proteinlerinin %50 -60'ı	İntegral zar proteini, miyelin minesini boyunca bulunmaktadır.
Miyelin Temel Protein (MBP)	MSS proteinlerinin yaklaşık %30'unda bulunur, ayrıca çevresel sinir sistemi miyelininin önemli bir bileşenidir.	Hücrelerarası - miyelin lamelinin temel yoğun bölgesidir.
Oligodentrosit-Spesifik Protein (OSP)	MSS miyelin proteinlerinin %5-10'u	İntegral zar proteini
Miyelin / oligodendrosit glikoprotein (MOG)	MSS miyelin proteinlerinin %0,05'i	Sadece miyelin örtüsünün hücre dışı yüzeyinde bulunan Transmembran Ig benzeri proteinlerdir.
Miyelin ile ilişkili oligodentrosit protein (MOBP)	MSS miyelin proteinlerinin %5 - 10'unda	Hücrelerarası - Temel yoğun hatta MBP ile lokalize olmuştur.
Miyelin ilişkili glikoprotein (MAG)	MSS miyelin proteinlerinin %1'inde; ayrıca ÇSS miyelinde bulunur	Ig üst familyasının transmembran bağlayıcı molekülüdür.
2',3'- siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz (CNP)	MSS miyelin proteinlerinin yüzde birinden az, ayrıca ÇSS miyelinde de bulunmaktadır.	Oligodendrosit ve Schwann Hücreleri sitoplazmasında lokalize olmuştur.
Periferal miyelin protein (PMP)	Çevresel ve merkezi sinir sistemi miyelininin küçük bir unsurudur.	Çevresel ve merkezi sinir sistemi miyelinde bulunur.

Bunun yanında belirtilen oto reaktivitenin patolojik öneminin gösterilmesi zordur çünkü miyelin proteinlerine karşı T-hücreleri tepkisi normal, sağlıklı deneklerde de bulunmuştur. Geniş kapsamlı bir araştırmada PLP proteinine karşı dolaşımda olan T-Hücreleri reaksiyonu, sağlıklı denekler ve diğer sinir sistemi hastaları ile karşılaştırıldığında, tekrarlayan ya da ikincil ilerleyen MS hastalarında da bulunmuştur. PLP MS'te güçlü bir otoantijen adayıdır, çünkü PLP en çok bulunan miyelin proteini ve PLP ayrıca farelerde ensefalojenik olduğundan, insanlarda da immuno dominanttır. Bu durum da kendini miyelin tabakasının hücre dışı yüzeyinde

belli eder ve antikor kaynaklı demiyelinizasyon için potansiyel bir hedef oluşturur. MS hastalarında T-hücrelerinin PLP'e verdiği reaksiyon üzerine yapılan uzun vadeli çalışmalar, kandaki belirtilen T-hücrelerinin frekanslarında kısmen MS hastalık aktivitesi ile korelasyonu bulunan artmaları barındıran ciddi dalgalanmalara işaret etmiştir (Pender ve diğ. 2000).

Miyelin temel protein (MBP) merkezi sinir sisteminde PLP'den sonra ikinci en bol bulunan protein olup toplam proteinin %30'unu miyelin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. Diğer beyine özgü proteinlerin aksine bazik bir proteindir. MSS'nde miyelin oluşumu ve miyelinin çok katlı sıkı yapısının stabilizasyonu için gereklidir (Moscarello, 1997). MBP geni baskılanmış farelerde MSS miyelinizasyonunda belirgin azalma ve titreme, nöbetler ve erken ölüm ile karakterize ilerleyici hastalık tablosu izlenmiştir (Martini ve diğ. 1995). Miyelin kılıf tüm omurgalılarda MBP bulundurur (Harauz ve diğ. 2004). Miyelin yapısında bulunan miyelin temel proteininin farelerde 11 ekson insanlarda 10 eksondan oluşur (Givogri ve diğ. 2001).

Miyelin proteinlerine karşı oluşan antikorlarında MS'te patolojik bir rolü olabilmektedir, bunun nedeni; bazı hastaların antikorlara ve aktif lezyonlar içerisinde tamamlayıcı birikintilere rastlanmasıdır (Raine, 1999; Lucchinetti ve diğ. 2000). MS hastaları yüksek miktarda anti PLP antikorlarına sahiptir. Zhou ve diğ. (2006) genelde birincil ilerleyen MS'e yakalanmış MS hastalarının, yerleşik MOG'a karşı serum IgG seviyelerini yükselttiğini bulmuştur. Zhou ve diğ. (2006) ayrıca yüksek anti MOG antikor seviyelerine sahip olan hastalardaki serumun DAE ile hayvanlara aktarılması durumunda demiyelinizasyonu ve aksiyonal hasarı arttırdığını gözlemlemiştir.

Miyelin proteinlerine ek olarak, gangliosidlerde MS'te hedef oto antijenler için potansiyel bir kaynak teşkil etmektedirler. Gangliosidler, plazma zarının karmaşık, siyalik asit içeren glikosfingolipid bileşikleridir. Çevresel sinir sisteminde görülen gangliosidlere karşı oluşan antikorlar, birçok farklı çevresel sinir hastalığına da karışmıştır. Birincil ilerleyen MS hastaları, sağlıklı deneklere ve diğer sinir hastalıklarına yakalanmış kişilere göre artan oranda dolaşımda olan T hücrelerine ve gangliosidlere karşı antikor reaksiyonuna sahiptir. İkincil ilerleyen MS hastaları ayrıca artmış dolaşımsal antigangliosit antikorlarına sahiptir. Yakın zamanda Marconi ve diğ. (2006) MS hastalarının, özellikle ikincil ilerleyen MS'ten muzdarip

kişilerin, oligodendrositler tarafından belirtilen gangliosit GD2'ye karşı yükselmiş serum immünglobulin M antikorlarına sahip olduklarını bildirmektedir.

1.2.2. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) çinko bağımlı endopeptidazlardır. Embriyo gelişiminde, doku şekillenmesi ve morfogenezde, artrit, multipl skleroz gibi hastalıklarda ve kanserde hücre invazyonunda, metastazında ve kan beyin bariyerinin (KBB) yıkılmasında önemli rolleri vardır. MS hastalarında çinko düzeyinin yüksek bulunması çinko ile dolayısıyla MMP'lar ile MS patogenezi arasında ilişki olduğunun bir göstergesidir (Ho ve diğ. 1986).

MMP'lar protein yapılarına göre beş ana gruba ayrılır (Kathryn ve diğ. 2005; Yong, 2005; Ethell ve Ethel, 2007).

1. Gelatinazlar: MMP-2, MMP-9
2. Kollejenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
3. Stromelizinler: MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11
4. Zar tipi MMP'ler: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24

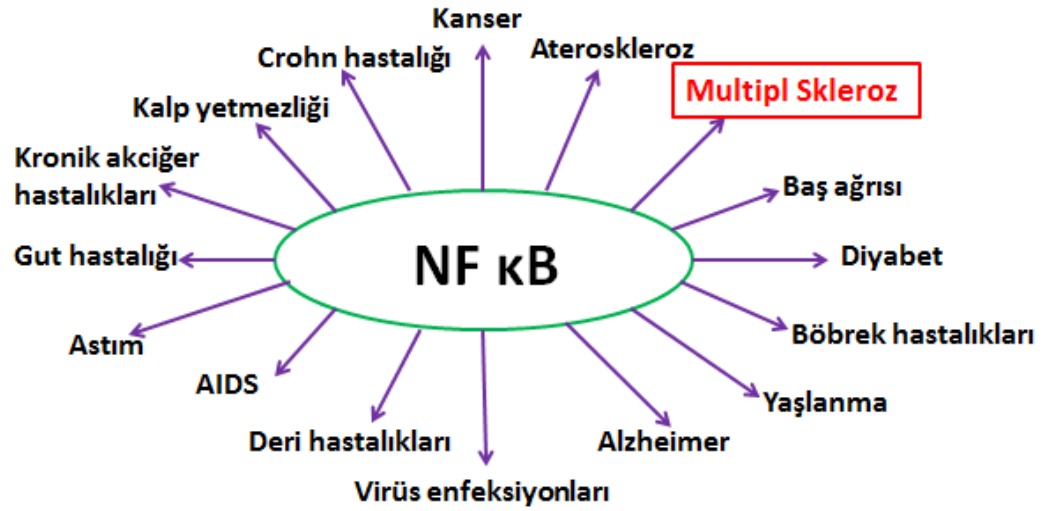
Tüm MMP'lar preproenzim olarak sentezlenir ve proenzim olarak salgılanır. Proenzimlerin aktivasyonu ekstrasellüler matriks yıkımına neden olan çok kritik bir noktadır. Ayrıca MMP'ların hedefi kan damarları ve beyin hücrelerindeki matriks proteinleridir bu olay nöronların apoptozisi ile sonuçlanır. Makrofajlar kronik hasar bölgesinde bulunurken proteazları salgırlar ve etraf dokudaki hasara neden olurlar (Sekine Aizawa ve diğ. 2001; Yong ve diğ. 2007). Ekstrasellüler matriksin proteazlar ve onların inhibitörleri tarafından düzenlenmesi MSS'nin normal gelişimi ve çeşitli nedenlerle hasarlanma sonrası tamiri için gereklidir. Normal doku gelişimi ve tamiri için gerekli olan bu enzimler, bazı kişilerde inflamasyon sırasında patolojik şekilde ani ve aşırı yükselerek yıkıcı etkilere neden olur (Huttner ve diğ. 2009). Beyinde MMP-2 ve MMP-9 en fazla bulunan MMP tipleridir. MMP-2, MMP-7 ve MMP-9'un yükselmiş seviyeleri MS'li hastalarda rapor edilmiştir (Rovira, 2007). MMP-2, anjiogenezis ve vasküler şekillenmede kritik rol oynar (Silletti, 2001).

Multipl sklerozda KBB hasar sürecinde MMP-9 aktif rol oynar. Akut MS oluşumunda MMP-9'un beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyon artışının önemli

bir rolü vardır (Gijbels ve diğ. 1992). MS atağı sırasında KBB bütünlüğünün geri kazanılması için uygulanan prednizolon (vücutta iltihaba sebep olan maddelerin salınımını engelleyerek çalışır) tedavisi KBB'nde MMP-9 konsantrasyonunu düşürür (Rosenberg ve diğ. 1996). Deneysel alerjik ensefalomyelit, multipl sklerozun hayvan modelidir ve beyin ve omurilik kan damarlarında demiyelinizasyonla ilişkilidir (Liuzzi ve diğ. 2002). Bu modelle yapılan çalışmalarda MMP inhibitörü olan GM-6001 ile hayvanların tedavisi farelerde klinik deneysel alerjik ensefalomyelit gelişimini baskılamıştır (Gijbels ve diğ. 1994). Otoimmün hastalıkların hayvan modelleri başarılı olarak MMP inhibitörleri ile tedavi edilebilmektedir. DAE'de görülen KBB hasarı MMP inhibitörleri ile azaltılabilir.

1.2.3. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

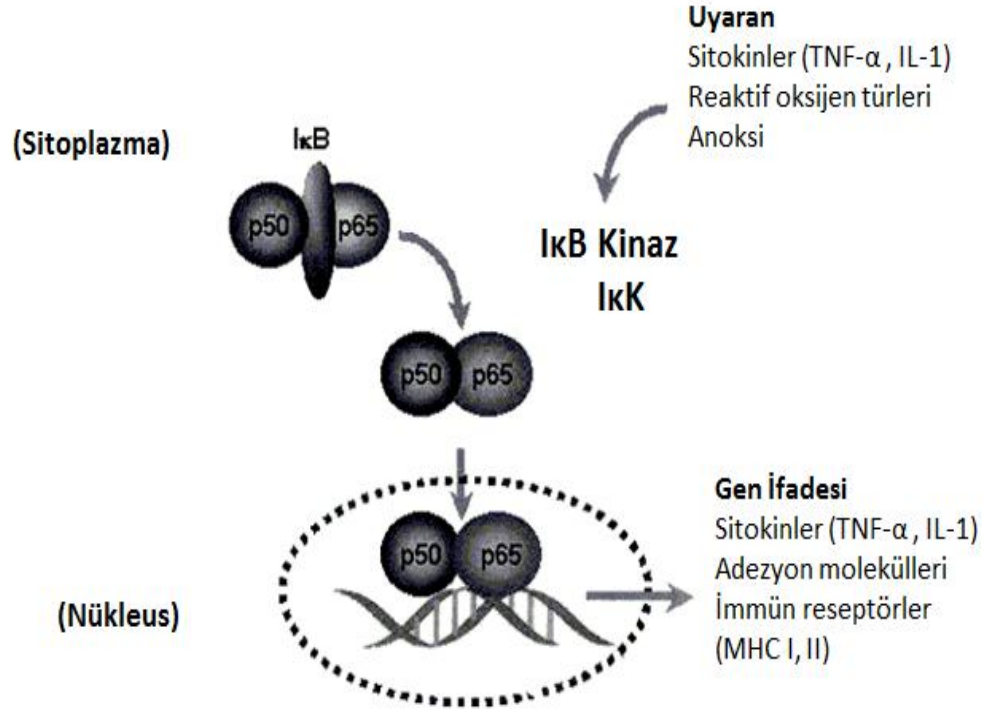
NF-κB ilk kez 1986 yılında Baltimore ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlandığında B hücrelerinde immünooglobulin kappa hafif zincirinin üretimini kolaylaştıran bir faktör olarak tarif edilen NF-κB, daha sonraları birçok organizmada ve hemen her hücre tipinde bulunan, organizmanın kendi kendini savunmada kullandığı ana şarterlerden birisi olarak kabul edilmiştir (Brasier, 2006). Aktif hale gelen NF-κB, immüno-inflamatuvar yanıtlar, hücre döngüsü, apoptoz, hücre adezyonu, anjiyogenez gibi olaylarda rol oynayan 200'den fazla genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Maeda ve Omata; 2008). NF-κB klinik olarak da viral enfeksiyonlar, immüno-inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Şekil 1.5) (Hiscott ve diğ. 2006; Okamoto, 2006; Horie, 2007).



Şekil 1.5: NF-κB'nin rol aldığı hastalık grupları

NF-κB tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF-κB1 (p50), ve NF-κB2 (p52) tarafından oluşturulan homo ya da hetero dimerler halinde bulunur ve bunlar sırası ile Rel A, Rel B, c-Rel, NF-κB1 ve NF-κB2 genleri tarafından kodlanırlar. En sık bulunan dimer p50/RelA heterodimeri olup genel olarak NF-κB olarak adlandırılan bu dimerdir (Chen ve diğ. 1998). Farklı dimerlerin fonksiyonel etkinlikleri de birbirinden farklıdır. Hatta bazı dimerler birbirlerinin tam tersi fonksiyon gösterebilmektedir. Örneğin, p50/p50 homodimerleri nükleusta bulunan NF-κB bağlanma noktalarına bağlanmakta ancak p50/RelA formunun tersine inflamasyonda rol alan proteinlerin transkripsiyonunu engellemektedir (Tong ve diğ. 2004).

NF-κB birçok hücrede bir uyarı olmadığı sürece sitoplazmada yer almaktadır. Burada inhibitör protein olan inhibitör kappa B (IκB) ile kompleks oluşturan NF-κB inaktif formundadır. Organizma bir uyarıya maruz kaldığında ise NF-κB ile IκB ayrılır ve NF-κB aktif hale geçer. Bu ayrılma iki şekilde olabilir. TNF-α, interlökin (IL) -1, CD40 ligand, lenfotoksin-B gibi çeşitli inflamatuvar sitokinler IκB kinazın (IκK) aktive olmasına neden olur (Trinh ve diğ. 2008). Aktive olan IκK, IκB'yi fosforile eder ve NF-κB aktive olur (Şekil 1.6). Aktif hale geçen NF-κB hücre sitoplazmasından nükleusa yer değiştirir. Burada sitokinler, kemokinler ve adezyon moleküllerinin de yer aldığı çeşitli inflamatuvar proteinleri kodlayan genlerin DNA sekanslarına bağlanır ve bunların transkripsiyonunu düzenler (Finco ve Baldwin, 1995).



Şekil 1.6: NF- κ B aktivasyonu (Valen ve diğ. 2001).

NF- κ B kronik inflamasyondaki önemli rolünü TNF- α , IL-1, IL-2, IL-12, IL-16, IL-18 ve interferon gama gibi sitokinlerin transkripsiyonunu artırarak yerine getirmektedir (Atreya ve diğ. 2008). Otoimmün hastalıklar ve kronik inflamasyon ile seyreden diğer hastalıkların patofizyolojisinde bu sitokinlerin önemi bilinmektedir (O'Shea ve Murray, 2008). Buna ek olarak ekspresyonu artan bu sitokinlerin de NF- κ B aktivasyonunu uyarmaları inflamasyonun kronik bir hal almasına ve şiddetinin artmasına neden olmaktadır. NF- κ B'nin inflamasyondaki rolü çeşitli hayvan deneyleri ile de desteklenmiştir. Bu çalışmalarda NF- κ B proteinlerinde eksiklik olan farelerin B ve T hücre fonksiyonlarında ciddi bozulmalar meydana geldiği ve bu farelerin bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede yeterli inflamatuvar yanıtı oluşturamadıkları tespit edilmiştir (Gerondakis ve diğ. 1999).

1.2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α , güçlü proinflamatuvar ve immün yanıtı denetleyen bir sitokindir. TNF- α başka sitokinlerin üretimini, adhezyon moleküllerinin belirginleşmesini, hücrelerin çoğalmasını ve metalloproteinazların üretimini artırır. TNF- α akut faz yanıtını, vasküler adhezyonu, kemik iliğinde farklılaşmayı ve apoptozisi regüle eder ve ayrıca

nötrofil aktivasyonuna, T ve B lenfositlerin proliferasyonuna ve immunoglobulin sentezinde artışa da yol açar. TNF- α esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve belirli koşullarda T lenfositler, nötrofiller, mast hücreleri ve endotel hücreleri senteze katkıda bulunur. TNF- α , 26 kilo dalton ağırlığında membrana bağlı pro-protein şeklinde sentezlenir ve TNF- α dönüştürücü enzim tarafından 17 kilo daltonluk bir monomere çevrilerek çözünür TNF- α molekülü şeklinde serbestleşir. Olgun TNF- α , hücrelerin çoğunda eksprese edilen TNF reseptör 1 veya TNF reseptör 2' ye bağlanarak etkilerini gösterir (Balkwill,1989; Beutler, 1995).

TNF- α 'nın MS'deki esas proinflamatuvar sitokin olduğu düşünülmektedir. TNF- α için yapılan araştırmaların sonucunda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır (Rieckmann ve Albrecht, 1995):

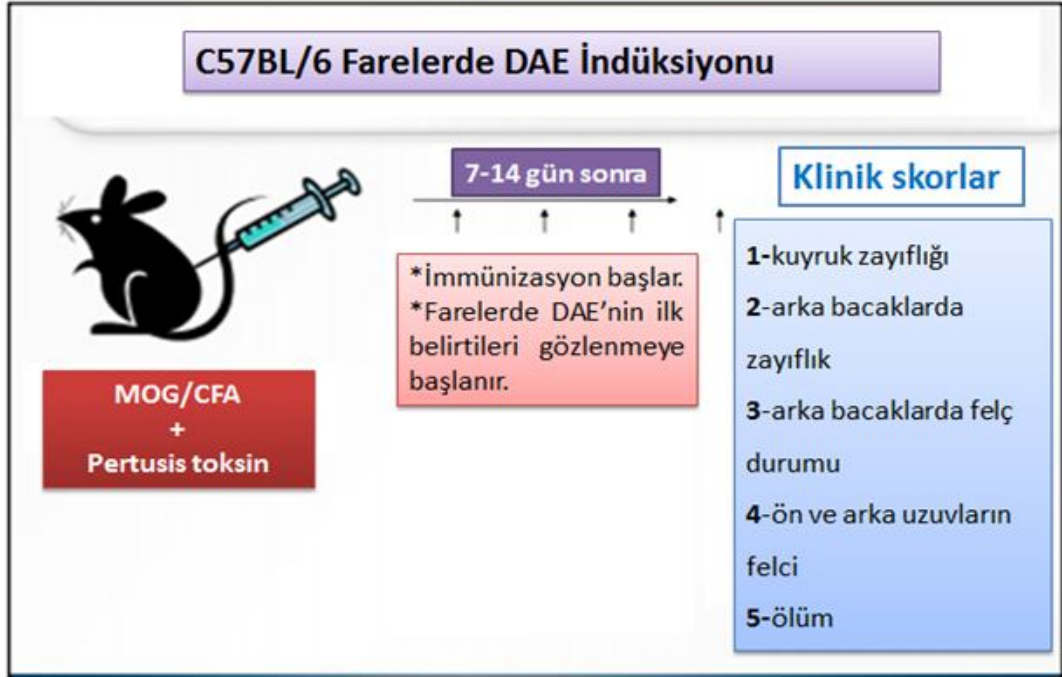
- in vivo olarak miyelin ve oligodendrositlere toksiktir.
- DAE indüksiyonunda etkilidirler.
- MS lezyonlarında ekspresyonu fazladır

Yapılan bir çalışmada, en yoğun TNF- α mRNA ekspresyonu erken aktif demiyelizan lezyonlarda gözlenirken, remiyelinize alanda ekspresyon daha düşüktür. Tüm bu sonuçlar TNF- α 'nın erken evreden başlayarak demiyelinizasyonda rol aldığını kanıtlamaktadır (Rieckmann ve Albrecht, 1995).

1.3. Deneysel Alerjik Ensefalomyelit

İnsan hastalıkları için hayvan modelleri, genellikle kemirgenlerin nadiren ise primatların kullanıldığı, insanlardaki hastalık emsallerine oldukça benzeyen ve insanlardaki formlarını daha iyi anlamak ve tedavi etmek amacıyla oluşturulan hastalıklardır. Deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) merkezi sinir sisteminin otoimmün T-hücre aracılı modeli, MS için yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında kullanılan en önemli hayvan modeli olarak kullanılmaktadır (Pluchino ve diğ. 2003; Batoulis ve diğ. 2011). DAE hayvanların MBP (miyelin temel protein), MOG (miyelin oligodendrosit glikoprotein) gibi MSS antijenlerinin enjeksiyonu ile oluşturulur ve deneysel MS modeli için en genel kabul edilen ve yaygın çalışılan modeldir. Çünkü DAE histopatolojik ve immünolojik olarak MS'e en çok benzeyen modeldir. Ayrıca, diğer modellerin aksine tamamen otoimmün karakterli bir modeldir ve virüs ya da diğer toksin etkinliğini içermez (Tsunoda ve Fujinami, 2010; Batoulis ve diğ. 2011). Miyelin bileşiklerinin (miyelin temel protein, proteolipid

protein ya da miyelin oligodendrosit glikoprotein) immünizasyonu ile tetiklenen DAE, kan-beyin bariyerinin yıkılması, MSS' nin CD4⁺ T hücreleri ve makrofajlar tarafından işgal edilmesi, glial hücrelerin harekete geçmesi (mikro-glia ve astrosit) ve oligodentrositlerin kaybına bağlı demiyelinizasyon süreçlerini kapsar. Oligodentrositlerin kaybı MS ve DAE' deki miyelin ile ilişkili olayların sıralaması tam olarak anlaşılammış ise de, işgalci hücreler ve glial hücreler tarafından salgılanan araçlar arasındaki etkileşimin, hastalığın enflamatuvar seyrine ve demiyelinizasyona katkıda bulunduğu sanılmaktadır (Martin ve McFarland, 1995; Merrill ve Benveniste, 1996; Raine, 1997). Antijenler genellikle Freund's tam adjuvan içerisinde enjekte edilir ve beraberinde pertussis toksini uygulaması daha şiddetli ve tam bir MS modeli oluşmasını sağlar (Şekil 1.7) (Hofstetter, 2002).



Şekil 1.7: DAE indüksiyonu ve skorlama ölçekleri (Zheng ve diğ. 2008' den revize edilmiştir).

DAE'nin başlamasından ve devamından sorumlu immünolojik mekanizmalar, T lenfositlerin miyelin antijenine karşı duyarlılaşması ile başlar (Godessart ve Kunkel, 2001). Antijen-spesifik tip 1 yardımcı T (T helper 1, Th1) hücreler proliferasyon olarak MSS'ne girer. MSS'nde T hücrelerin perivasküler infiltrasyonu histopatolojik olarak gösterilebilir. Bu immün yanıtın sonucunda MSS'nde demiyelinizasyon oluşur (Godessart ve Kunkel, 2001; Sorensen, 2004). Bu hayvan modellerinin olası avantaj ve dezavantajları aşağıdaki gibidir (<http://www.multiplesclerosis.org>, 2003).

DAE araştırmalarının avantajları;

- DAE bir hayvan hastalığı olduğundan, araştırmacılar, demiyelinizasyon olgusunu, MS hastası insanlarda ahlaki olarak kabul edilemeyecek şekillerde araştırabilirler.
- Araştırmacılara, kendi hayatlarını riske atmadan potansiyel tedavi yöntemlerinin etkinliğini ve güvenliğini araştırılma olanağı verir.
- Araştırmacılara DAE'nin farklı tetikleme yolları üzerinde deneyler yapabilme ve dolayısı ile MS'in olası nedenlerini bulabilme olanağı sunar.
- Birçok DAE ile ilgili türün soy ömrünün kısa olmasından ve oldukça çabuk üremelerinden dolayı bu tip hayvanların çok geniş popülasyonları, kısa bir zaman zarfında incelenebilir.

DAE araştırmalarının dezavantajları;

- DAE, MS gibi bir insan hastalığı değildir ve DAE'yi, MS' in bir hayvan modeli olarak kabul ettirmek için birçok önemli varsayımda bulunulmuştur.

Günümüzde MS tedavisinde kullanılmaya devam edilen immünmodüler terapi ajanları olan glatiramer asetat ve natalizumab DAE çalışmalarından geliştirilmiştir (Yednock ve diğ. 1992; Sela ve diğ. 1990). Bunların yanı sıra pek çok bitkisel preperatın MS hastalığı üzerinde iyileştirici ya da koruyucu etkilerinin belirlenmesi için DAE modeli sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar MS hastalarının ciddi oranlarda bitkisel ve alternatif ürünlere yöneldiklerini ve kullandıklarını göstermektedir (Shinto ve diğ. 2005; Leong ve diğ. 2009; Yadav ve diğ. 2010; Bowling, 2011). Bu çalışmalardan derlenen ve MS hastalığında alternatif ürünler olarak kullanılan ajanlar Tablo 1.3 'de verilmektedir.

Tablo 1.3: MS hastalarının tedavi amaçlı kullandıkları alternatif ürünler (alfabetik verilmiştir).

Bitki/Bitkisel	Mineraller	Vitaminler	Esansiyel Yağ	Diğerleri
Bazı çiçek karışımları	Ca	Folik asit	Alfa lipoik asit	Arı Sokması
Berberin	Fe	Multivitamin	Balık Yağı	Glikobesinler
Bioflavonoidler	Mg	Vitamin A	Morina k. yağı	Karnitin
Curcumin	Se	Vitamin B1		Koenzim Q10
Çam kabuğu ekstresi	Zn	Vitamin B1		Kondroitin
Gecesevası yağı		Vitamin B2		Makrobiyotik
Ginkgo biloba		Vitamin B6		Melatonin
Kannabinoidler		Vitamin C		Serebrosid
Meyan kökü		Vitamin D		
Sarı kantaron otu		Vitamin E		
Üfol				
Yeşil çay				

Almanya’da yapılan bir araştırmada hastaların yaklaşık %62 oranında tamamlayıcı ve alternatif ürünlere yöneldiği gösterilmiştir (Apel ve diğ. 2005). Bu ürünlerden özellikle berberin (Ma ve diğ. 2010) kannabinoid (Zajicek ve Apostu, 2011) ve üfol (Dutra ve diğ. 2012) için MS semptomlarını azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Bunlardan da özellikle kannabinoid üzerine detaylı çalışmalar gerçekleştirilmiş ve ümit verici olduğu bildirilmiştir (Lakhan ve Rowland, 2009). Yapılan literatür taramasında halk arasında MS hastalığının tedavisi için kullanılan *Capparis* cinsi ile ilgili herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

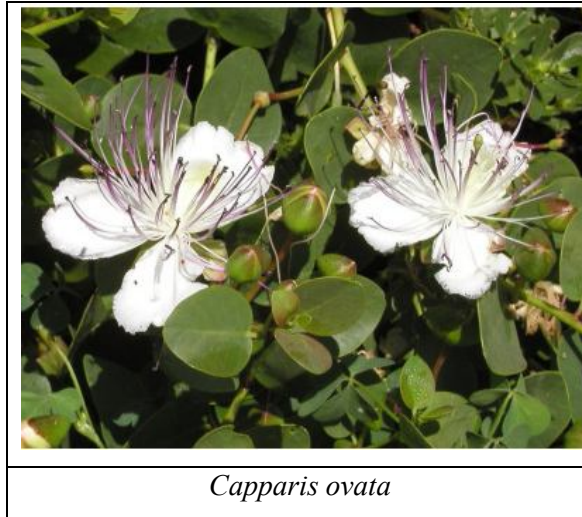
1.4. Deneysel Materyal: Kapari

Kapari, Capparidaceae familyasının en geniş iki cinsinden biri olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de *Capparis ovata* (Şekil 1.8) ve *Capparis spinosa* türleri bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bu bitki bilinmektedir. Aristo ve Hipokrat zamanlarında da (M.Ö. 384-322, M.Ö. 400), bu bitkiden söz edilmektedir. İşlenmiş kaparinin 100 gramının içeriği Tablo 1. 4’te verilmiştir (Freedman, 1998).

Tablo 1.4: Kapari bitkisinin içeriği (% de değerler olarak verilmiştir).

İşlenmiş 100 gram kapari
Protein: % 29,3
Yağ: % 0,7
Lif: % 2,7
Nişasta: %39,7
Sükroz: :% 4,3
Glikoz: % 0,2
Früktoz: % 0,7
Çinko: % 0,4
Diğer: % 22
Diğer: % 22

Kapari Akdeniz mutfağının mevsimsel malzemelerinden olup özellikle İspanya, Fas ve İtalya tarafından ihraç edilmektedir. Son yıllarda Türkiye'den de Avrupa ülkelerine kapari ürünlerinin ihracatı başlamıştır. Halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan kapari bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek, 1998).



Şekil 1.8: Capparis ovata (www. Ağaçlar.net)

Kaparinin tomurcuklarında lipid, alkaloid, bazı glukozinolatlar ve antioksidan özelliği bulunan flavonoid ve diğer polifenoller bulunur. Rutin ise en sık rastlanan flavonoiddir. Ayrıca yapılan çalışmalarda metanolik ekstratlarının de antioksidan özellikleri gösterilmiştir (Tesoriere ve diğ. 2007). Kapari ile yapılan çalışmalarda yan etki olarak epikondilit nedeni ile cilt üzerine *Capparis spinosa* solüsyonundan ıslak kompres yapan bir kadında allerjik kontakt dermatit oluştuğunu bildiren bir olgu

sunumunun haricinde herhangi bir yan etki veya toksisiteye rastlanmamıştır (Ghule ve diğ. 2006; Angelini ve diğ. 1991).

Yapılan çalışmalarda kapari ekstrelerinin hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca metanolik ekstraların demir oto-oksidasyonunu artırarak ferröz demiri ferrik hale dönüştürerek hidroksil radikal oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve antioksidan özelliğinin içerdiği fenollere bağlı olduğu düşünülmektedir (Germano ve diğ. 2002). Ayrıca Kapari ekstresinin anti-inflamatuar özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Agel ve diğ. 1986; Al Said ve diğ. 1988).

1.5. Çalışmanın Amacı

MS hastalığı ülkemizde 35.000-50.000 kişiyi Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaklaşık olarak 2.5 milyon kişiyi etkileyen (Hauser ve Oksenberg, 2006) önemli bir sinir sistemi hastalığıdır. Bu otoimmün kökenli demiyelinize hastalığın (Victor ve Ropper, 2001) etyolojisi henüz çok iyi bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığına inanılmaktadır. Hastalığın henüz bilinen kesin tedavisi yoktur. İnterferon β (Bergh ve diğ. 2004), glatiramer asetat (Vieira ve diğ. 2003) gibi bazı ilaçlar hastalığın etkilerini azaltmak için MS hastaları tarafından kullanılmaktadır. Ülkemizde, *Capparis ovata* bitkisi bu hastalığın tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılması için çok fazla kullanılmaktadır. Fakat bu bitkinin iyileştirici etkisinin olup olmadığı ve varsa nasıl bu etkiyi gösterdiği hakkında bilimsel literatürde bir bilgi yoktur. Tüm bunların ışığında, bu çalışmanın amacı; halk arasında sıklıkla kullanılan ve bu hastalığın tedavisi için umut vaat edebilecek *Capparis ovata* ekstresinin deneysel Multipl Skleroz hayvan modelinde etkisinin moleküler mekanizmalarının araştırılmasıdır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarımız sırasında; Bitki ekstraksiyon cihazı (Gerharth), Liyofilizatör (Freeze dry sistem, Labconco), Etüv (Binder BD 115), Santrifüj (Sigma 1-14), Otoklav (Nuve OT 4060), (Hiclave HVE-50), PZR Cihazı (Techne TC-3000, Bioneer 96 Thermal Block), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC320), UV Jel Görüntüleme Kabini (DNR LB 0605), Vorteks (Dragon Lab MX-F), Isı bloğu (Biosan Dry Bloc Heating Thermostat TDB-100), Spektrofotometre (UV-1700 Shimadzu), Terazi (Precisa XB 220A), (Mettler Toledo AB 265S), (Mettler Toledo PB 602-L), Mikrodalga Fırın (SHOV M7017-P), Güç Kaynağı (Thermo, EC-250-90) kullanılmıştır.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

100 bç DNA ladder (Fermentas, SM0323), 6X DNA izleme boyası (10mM Tris-HCL, %0,03 Bromfenol Blue, %0,03 Ksilen siyanol FF, % 60 gliserol, 60 mM EDTA ile 10 ml olacak şekilde hazırlandı), Agaroz (Sigma, A9539), Asetik asit (Sigma, 27225), Bromfenol Mavisi (Sigma, B6131), DEPC (Sigma, D5758), EDTA (Sigma, 03620), Etanol (Riedel, 071029) (% 70 konsantrasyonunda etanol kullanılmıştır), Etidyum bromür (Sigma, E8751), Freund's adjuvant complete (Sigma, F5881), Gliserol (Sigma, G2289), Ketamin, Kloroform (Sigma, C2432), Ksilazin, Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco), Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Fragment 35-55 Rat, Mouse (Anaspec, 60130-5), Pertussis toxin from Bordetella pertussis (Sigma, P7208), Trizma Base (Sigma, A2264), Ksilen siyanol FF (Sigma, X4126).

2.1.3. Çalışmada kullanılan kitler

Easy Script Plus cDNA sentez kiti (Abm, G236), RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 78804).

2.1.4. Hayvan temini

Bu çalışmada Saki YENİLLİ Denev Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilen 6-8 haftalık C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. Hayvanların bakımı Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Biriminde yapılmıştır. Hayvan deneyleri için gerekli olan etik kurul onayı Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Birimi'nden alınmıştır (PAUHDEK-1010/020).

2.1.5. Kapari ekstresi

Projede kullanılmış olan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. ve İhr. Ltd. tarafından sağlanmıştır.

2.1.6. Primerler

MS ile ilişkili genlerin deney grupları arasındaki ekspresyon farklarının karşılaştırılabilmesi için GenBank/EMBL veri bankaları taranarak fareler için uygun primer dizileri saptandı ve bu primerler Metabolian International AG firmasına 0,2 µM skalada sentezlettirilip -20°C'de saklanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1: Primerler ve özellikleri

Gen	İleri Primer ve Geri Primer (5'→3')	Yapışma Sıcaklığı (°C)
2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz	TTC TGG AGA TGA ACC CAA GG	61
	TCT CTT CAC CAC CTC CTG CT	
Matriks metalloproteinaz-2	CCC CGA TCT ACA CCT ACA CCA AGA AC	60
	CAT TCC AGG AGT CTG CGA TGA GC	
Miyelin temel proteini	CCA AGT TCA CCC CTA CTC CA	61
	TAA GTC CCC GTT TCC TGT TG	
Miyelin ilişkili glikoprotein	ACC TCC AGG AAC CTC TAT GG	61
	CAG GAC ATG AGG GTT GTC TC	
Nükleer faktör kappa B p50	TCC GCT ATG TGT GTG AAG G	61
	GTG ACC AAC TGA ACG ATA ACC	
Nükleer faktör kappa B p65	CAG ACC GCA GTA TCC ATA GC	63
	CGT GAA AGG GGT TAT TGT TGG	
Periferel miyelin protein	GAG TTT GTG CCT GAG GCT A	60
	ACA GCA ATC CCC ACT CAA C	
Proteolipit protein	CAG GCT CCT GCT AGA AAT GG	60
	TCC GTT CTG CTC TCC TCA GT	
Tümör nekrozis faktör alfa	CGT CAG CCG ATT TGC TAT CT	60
	CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG	
Beta aktin	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	60
	GCT GTG GTG GTG AAG CTG TA	

2.2. Metotlar

2.2.1. Kapari sulu ekstresinin hazırlanması

Deneyleerde kullanılan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. ve İhr. Ltd. tarafından sağlanmıştır. Bu bitkisel ürünler Mayıs ayı başlangıcından Eylül ayı sonuna kadar ki süreçte hem doğal ortamlardan hem de bitkinin tarımı yapılan arazilerden toplanmıştır. Kapari sulu ekstresinin hazırlanması için MS hastalarının bir günde tükettiği miktar olan kapari karpuzu, çiçeği ve kapari tomurcuğu karışımı blendarda çekilerek toz haline getirildi. Hazırlanan bu karışımdan 10 gr alınıp ekstraksiyon kartuşu içine konuldu karışımın üzerine 10 ml Kapari sosu ve 110 ml distile su eklendi ve sulu özüt hazırlama işlemi Gerhardt ekstraksiyon cihazı kullanılarak 130°C’de gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işleminden sonra ekstre doğrudan Labconco Freze Dryer (liyofilizatör) kullanılarak liyofilize edilmiş ve kapari ekstresi elde edilmiştir. Elde edilen ekstre suda kolay çözünen granüler formda oluşturuldu.

2.2.2 MS modeli (Deneysel Alerjik Ensefalomyelit) oluşturulması

Çalışmamızda 6-8 haftalık dişi C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. Bu hayvanlarda DAE’ye sebep olmak için belirlenen metod kullanılmıştır (Zheng ve diğ. 2008). Bunun için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* (ısı inaktive edilmiş) ve Freund Adjuvan kullanılmıştır. Freund adjuvant ile emülsifiye edilmiş 225 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* karışımı, daha önce ketamin (80 mg/kg)/ksilazin (8 mg/kg) karışımı ile anestezi yapılan her hayvanın deri altına enjekte edilmiştir. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng *pertussis toksin* karın boşluğuna enjekte edilmiştir. 14 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edilmiş ve sıçanların gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlenmiş ve video ile kayıt edilmiştir. Kullanılan ölçek Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.2: MS takibinde kullanılan skorlama tablosu (Zheng ve diğ. 2008).

Skor	Gözlenen etki
0	Herhangi bir etki yok
1	Kuyruk zayıflığı
2	Arka uzuvlarda zayıflık ve anormal yürüme
3	Arka uzuvlardan 1 ya da 2 tanesinin tamamen felci
4	Ön ve arka uzuvların felci; 4 uzuvda da felç durumu
5	Can çekişme-ölüm

2.2.3 Kapari ekstresinin verilmesi

Deney hayvanları deneysel alerjik ensefalomyelit induksiyonu gerçekleştirilenler ve kontrol grupları olarak toplamda 5 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar aşağıdaki gibidir.

Grup I (Kontrol): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir deneysel işlem yapılmamıştır.

Grup II (Kapari kontrol): Bu grupta farelere 500mg/kg olacak şekilde kapari ekstresi intragastrik gavaj ile 28 gün boyunca verilmiştir.

Grup III (Deneysel alerjik ensefalomyelit): Bu gruptaki hayvanlarda deneysel alerjik ensefalomyelit oluşturulmuş; hayvanlar deneysel işlemlerin başlangıcından itibaren 6 hafta (42 gün) süreyle takibe alınmış ve izlenmiştir.

Grup IV (Kapari tedavi): Bu gruptaki hayvanlarda deneysel alerjik ensefalomyelit için enjeksiyon yapıldıktan 2 hafta sonra kapari ekstresi intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 500 mg/kg ağırlık olacak şekilde verilmiştir.

Grup V (Kapari+MOG aynı anda): Bu grup kapari ekstresinin MS hastalığına karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi için oluşturulmuş; hayvanlara enjeksiyondan 2 saat sonra kapari ekstresi verilmeye başlanmış ve 21 gün boyunca kapari ekstresi verilmiştir.

Tüm bu işlemler Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Veteriner kontrolünde ve gözleminde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler için gerekli

olan Etik Kurul izni Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulundan alınmıştır.

2.2.4. Dokuların temini

Deneysel işlemleri süreci sonunda anestezi ile ötanazi edilmiş olan farelerden beyin dokusunun yanısıra karaciğer, böbrek, akciğer ve kan dokuları steril bir şekilde alınmıştır. Alınan doku örnekleri moleküler etki belirleme çalışmaları için kullanılmıştır. Dokular önce steril 2 ml'lik eppendorf tüplere alınıp etiketlenmiş ve sıvı azotta dondurulmuştur. Ardından Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyokimya ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırılmıştır. Kanlar ise 10.000 rpm 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek serumları elde edilmiş ve serumlar -20°C'ye kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

2.2.5. Total RNA izolasyonu

Kapari ekstrelerinin MS oluşumunda rol aldığı düşünülen genlerin ifade düzeylerine etkilerini saptamak için doku örneklerinden ayrı ayrı total RNA izolasyonları yapıldı. Bunun için ilk olarak Trizol kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonu yapıldı ancak elde edilen RNA'larda kırıklar ve DNA kontaminasyonu problemi ile karşılaşıldı. İkinci olarak "Macherey-Nagel Nucleospin RNA II" kiti ile RNA izolasyonu denendi ancak iyi kalite RNA'lar bu yöntemle de elde edilemedi. Bu yöntemlerin beyin dokusu yağlı bir doku olduğundan bu dokudan RNA izolasyonu için uygun olmadığına karar verildi. Total RNA izolasyonu için yağlı dokulardan RNA izolasyonu için geliştirilmiş "Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.

-80°C'de bulunan fare beyin dokuları DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütüldü. 2 ml'lik eppendorf tüplere 1 ml Qiazol Lysis Solüsyonundan eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 50 mg olacak şekilde öğütülen beyin dokusu tartıldı ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi ve iyice karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınıp yeni 2 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve alınan üst fazın üzerine eşit miktarda %70 etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım RNeasy mini spin kolona

eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 700 µl kitin içinde bulunan yıkama tamponu (RW1) eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine kitin içinde bulunan RPE tamponundan 500 µl eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi, alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 2 dakika 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü. Kolon yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA'lardan bekletilmeden cDNA sentezi yapıldı.

2.2.5. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi

İzole edilen RNA' lar %1' lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1' lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapılmıştır. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutularak üzerine 1 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez tankına, kuyucuklar RNA'nın '- den +' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA' yı yürütmek için 1X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. 3 µL RNA örneği, 5 µL steril su ve 2µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, maksimum 500 mA de 45 dk süresince yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

2.2.6. cDNA sentezi

cDNA sentezi Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligo d(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 2.3'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50 °C'de 1 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -80 °C muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.3: cDNA sentez karışımı

	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2 µg
Oligo(dT) Primer	1 µl	0,5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl	500 µM
5X RT tamponu	4 µl	1X
Easyscript plus RTase (200U/µL)	1 µl	200 ünite
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
Son hacim	20 µl	-

2.2.8. Yarı Kantite Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RTPZR)

Literatür ve veri bankaları taranarak MS ile ilişkili olduğu bilinen 9 tane gen belirlenmiş; GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen 9 adet gen için uygun primer dizileri saptanmıştır. Bu primerlerin nükleotid dizileri ve yapışma sıcaklıkları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Kapari ekstrelerinin MS ile ilişkilendirilen genlerin ifade düzeylerine etkisini saptamak için deneysel alerjik ensefalomyelit kontrol (hasta kontrol), kapari tedavi, kapari kontrol ve kontrol grubu bireylerden izole edilen RNA’lardan sentezlenen cDNA’ lar kullanılarak bu bireylerin mRNA düzeyleri RT-PCR yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla belirlenen genler için ayrı ayrı polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık, döngü ve zamanları optimize edildi. Tüm genler için kopya sayısı döngü sayısı ilişkisinin doğrusal olması için döngü sayısı 28 olarak belirlendi. PZR koşulları Tablo 2.4’de, sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 2.5’de verilmiştir.

PCR ürünlerinin 10 µl’si % 1’lik agaroz jelde 90 Volt, maksimum 500 mA de 45 dk süresince yürütüldü ve yürütme bitince jel UV transilluminatörde EtBr boyamayla bantlar gözlemlenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı. Bantların densitometrik analizi Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlendi. Her bandın densitometrik analizi house-keeping gen olan beta aktinin densitometrik analizi ile karşılaştırılarak CNP, MAG, MBP, MMP-2, NF-κB p50, NF-κB p65, PLP, PMP ve TNF-α mRNA düzeylerinin değişimi belirlendi.

Tablo 2.4: Çalışılan genlerin PZR koşulları

GEN	10X PZR Tamponu	MgCl ₂ (25mM)	dNTP (10mM)	İleri primer (10 pmol)	Geri primer (10 pmol)	cDNA	Taq DNA polimeraz (5u/μl)	Steril ultra saf su
CNP	2,0 μl	3,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
MAG	2,0 μl	3,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
MBP	2,0 μl	3,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
MMP-2	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
NF KB p50	2,0 μl	3,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
NF KB p65	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
PLP	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	3,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
PMP	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	3,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
TNF-α	2,0 μl	3,0 μl	0,5 μl	3,0 μl	3,0 μl	4,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar
β Aktin	2,0 μl	2,0 μl	0,5 μl	1 μl	1 μl	2,0 μl	0,5 μl	20 μl'ye tamamlayana kadar

Tablo 2.5: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

GEN	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama	Döngü sayısı
CNP	94°C 5 dk	94°C 1 dk	61°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 5 dk	28 Döngü
MAG	94°C 5 dk	94°C 1 dk	61°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
MBP	94°C 5 dk	94°C 1 dk	61°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
MMP-2	94°C 5 dk	94°C 1 dk	60°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
NF KB p50	94°C 5 dk	94°C 1 dk	61°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
NF KB p65	94°C 5 dk	94°C 1 dk	63°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
PLP	94°C 5 dk	94°C 1 dk	60°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
PMP	94°C 5 dk	94°C 1 dk	60°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
TNF-α	94°C 5 dk	94°C 1 dk	60°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü
β Aktin	94°C 5 dk	94°C 1 dk	60°C 1 dk	72°C 1 dk	72°C 1 dk	28 Döngü

2.2.9. İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçlara farklı gruplar arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için “Student T Test”, uygulanmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

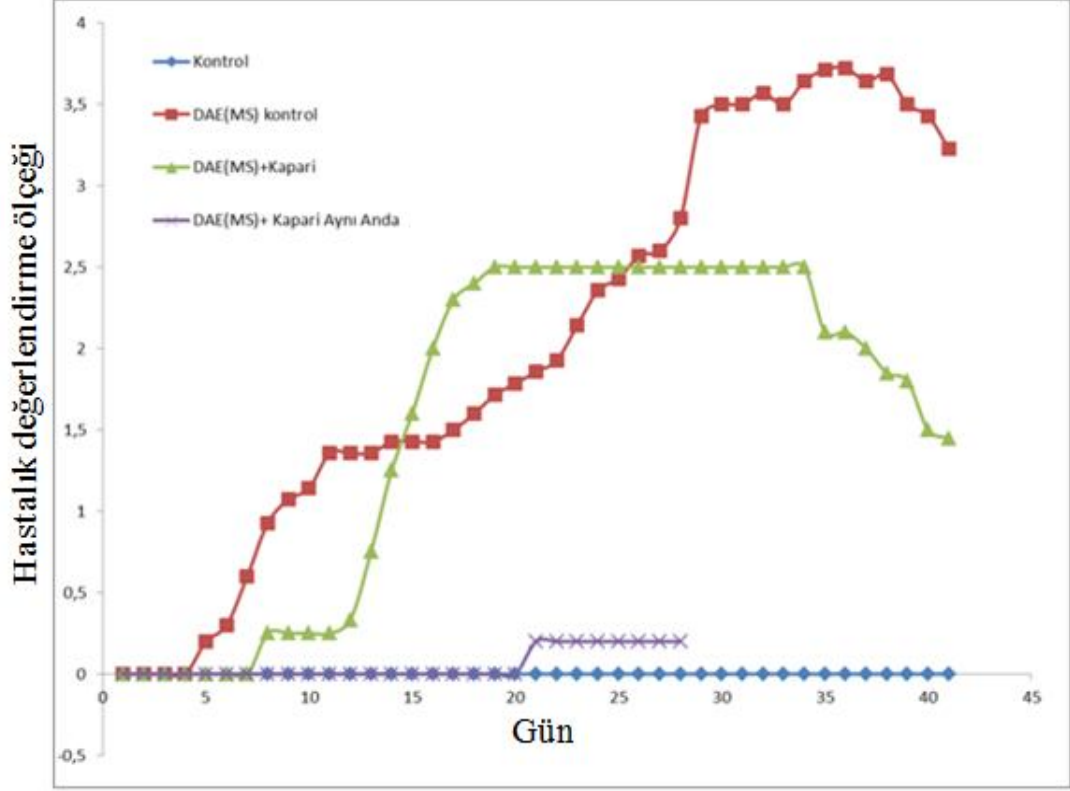
3. BULGULAR

3.1. Deneysel alerjik ensefalomyelit indüksiyonu

Hayvanlarda deneysel alerjik ensefalomyelit indüksiyonu için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* (ısı inaktive edilmiş) ve Freund Adjuvan kullanılmıştır. 14 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edilmiş ve farelerin gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlenmiştir. DAE oluşturulan hayvanlar üç gruba ayrılmış; ilk gruptaki fareler aynı şartlar altında tutularak herhangi bir uygulama yapılmamıştır (MS Kontrol grubu), ikinci gruba enjeksiyondan 2 hafta sonra 21 gün boyunca intragastrik gavaj ile hayvan başına 500 mg/kg ağırlık olacak şekilde kapari ekstresi verilmiş, üçüncü gruba ise kapari ekstresinin MS hastalığına karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi için enjeksiyondan 2 saat sonra kapari ekstresi vermeye başlanmış ve 21 gün boyunca kapari ekstresi verilmiştir. Kontrol deneklerle birlikte hayvanlar bu süreçte yine her gün kontrol edilmiş ve gösterdikleri davranışlar skorlanmıştır. Ayrıca 1 grup kontrol ve 1 grup kapari kontrol grubu oluşturulmuştur (DAE oluşturulmamış kapari ekstresi verilmiştir). MS hastalarının günlük kullandığı kapari dozundan yola çıkılarak oranlarını saptadığımız kapari karpuzu (meyvesi), kapari tomurcuğu salamurası ve kapari çiçeği kullanarak geliştirdiğimiz sulu ekstre ile yaptığımız çalışmalarda DAE oluşturulmuş C57BL/6 farelerde ciddi düzeyde istatistiksel olarak anlamlı koruyucu ve iyileştirici etkiler saptandı (Şekil 3.1).

Yapılan çalışmada DAE oluşturmak için uygulanan antijen ve toksin enjeksiyonlarından 2 saat sonra gastrik gavaj ile kapari ekstresi verilen hayvanların hiç birisinde alerjik ensefalomyelit olgusu gözlenmedi. Ayrıca, öncelikle DAE modeli oluşturulan ve klinik bulgular gözlenen hayvanların %60'ında kapari ekstresi verilmesi ile klinik bulguların kaybolduğu, geri dönüşümlerin olduğu da tespit edildi.

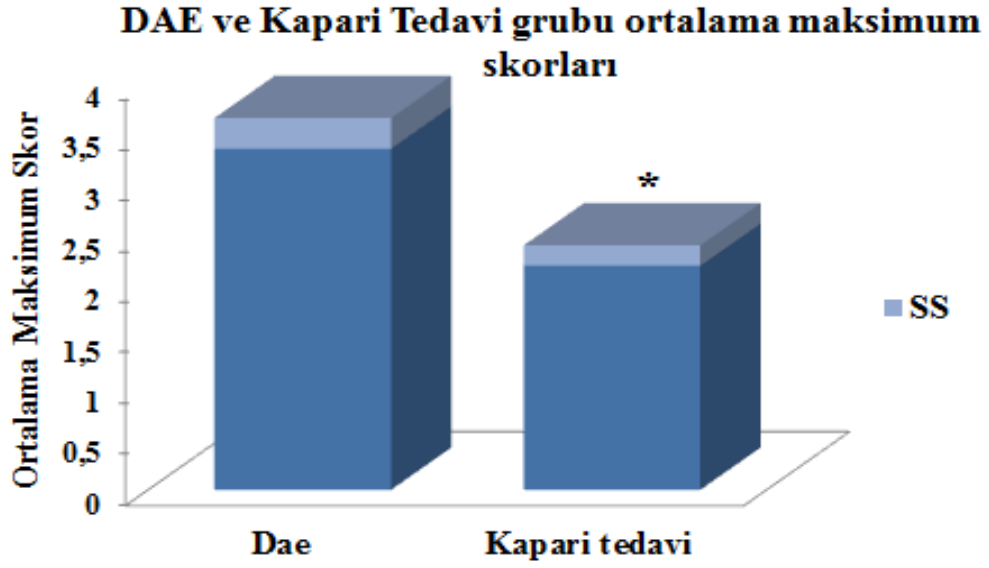
Ayrıca bu grupta klinik skorlar hiçbir şekilde yüksek değerlere ulaşmadı. Tüm bu verilerimiz kapari ekstresinin MS üzerinde hem koruyucu ve hem de iyileştirici etkileri olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 3.1: Kontrol, Deneysel MS (DAE), Deneysel MS (DAE)+kapari ekstresi ve Deneysel MS (DAE)+kapari ekstresi (paralel) farelerde gözlenen klinik skorlar.

Şekilde de görüldüğü gibi DAE oluşturmak için yapılan antijen ve toksin enjeksiyonundan 2 saat sonra gastrik gavaj ile kapari ekstresi verilen hayvanların hiç birisinde alerjik ensefalomyelit olgusu gözlenmedi. Ayrıca, öncelikle DAE modeli oluşturulan ve klinik bulgular gözlenen hayvanların yaklaşık olarak % 60'ında kapari özütü verilmesi ile klinik bulguların kaybolduğu, geri dönüşümlerin olduğu da tespit edilmiştir. Ayrıca bu grupta klinik skorlar hiçbir şekilde yüksek değerlere ulaşmadı.

Ortalama maksimum skorlar DAE grubu ve kapari tedavi grubunda karşılaştırıldığında DAE grubunda ortalama maksimum skor $3,35 \pm 0,71$ iken kapari tedavi grubunda bu skor $2,2 \pm 0,49$ olarak görülmektedir (Şekil 3.2).

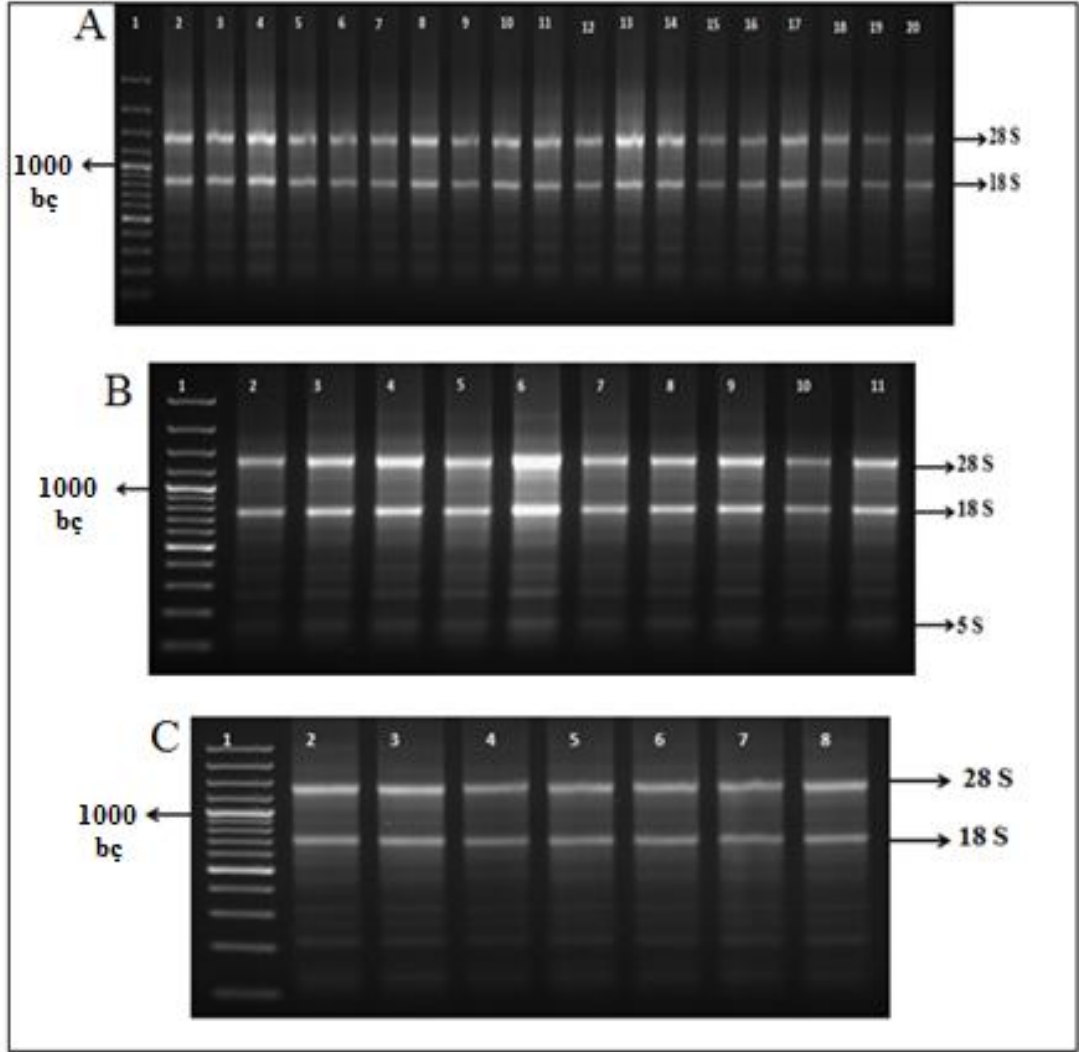


Şekil 3.2: DAE ve tedavi grubu hayvanların ulaştığı ortalama maksimum skorlar. *, İki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmektedir ($P<0.05$).

3.2. Hayvan Beyin Dokularından Total RNA İzolasyonu

Hayvan beyin dokularından total RNA izolasyonu Qiagen Lipid Tissue Mini Kit kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar (3 μ l) %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Elde edilen görüntülerden de anlaşıldığı gibi RNA kırılmadan izole edildi (Şekil 3.3). İzole edilen RNA'larda DNA kontaminasyonu sorunu yaşanmadı. Elde edilen RNA'ların 260/280 nm ölçümü ile miktarları belirlendi. RNA'ların 260/280 oranları 1,8-2 arasında bulundu. Bu oran bize izole edilen RNA kalitelerinin iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.3: Deney hayvanlarının beyin dokularından izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi. A- Hat 1: GeneRuler™ 100 bç DNA Marker; Hat 2: tedavi 3, Hat 3: tedavi 4, Hat 4: tedavi 5, Hat 5: tedavi 6, Hat 6: tedavi 7, Hat 7: tedavi 8, Hat 8: tedavi 9, Hat 9: kontrol 1, Hat 10: kontrol 2, Hat 11: kontrol 3, Hat 12: kontrol 4, Hat 13: kontrol 5, Hat 14: kontrol 6, Hat 15: kapari kontrol 6, Hat 16: DAE 6, Hat 17: DAE 7, Hat 18: DAE 8, Hat 19: DAE 9, Hat 20: DAE 10. B- Hat 1: GeneRuler™ 100 bç DNA Marker; Hat 2: kapari kontrol 1; Hat 3: kapari kontrol 2; Hat 4: kapari kontrol 3; Hat 5: kapari kontrol 4; Hat 6: kapari kontrol 5; Hat 7: DAE 1; Hat 8: DAE 2; Hat 9: DAE 3; Hat 10: DAE 4; Hat 11: DAE 5. C- Hat 1: GeneRuler™ 100 bç DNA Marker; Hat 2: kontrol 7, Hat 3: kontrol 8, Hat 4: kontrol 9, Hat 5: kontrol 10, Hat 6: kontrol 11, Hat 7: tedavi 1, Hat 8: tedavi 2.

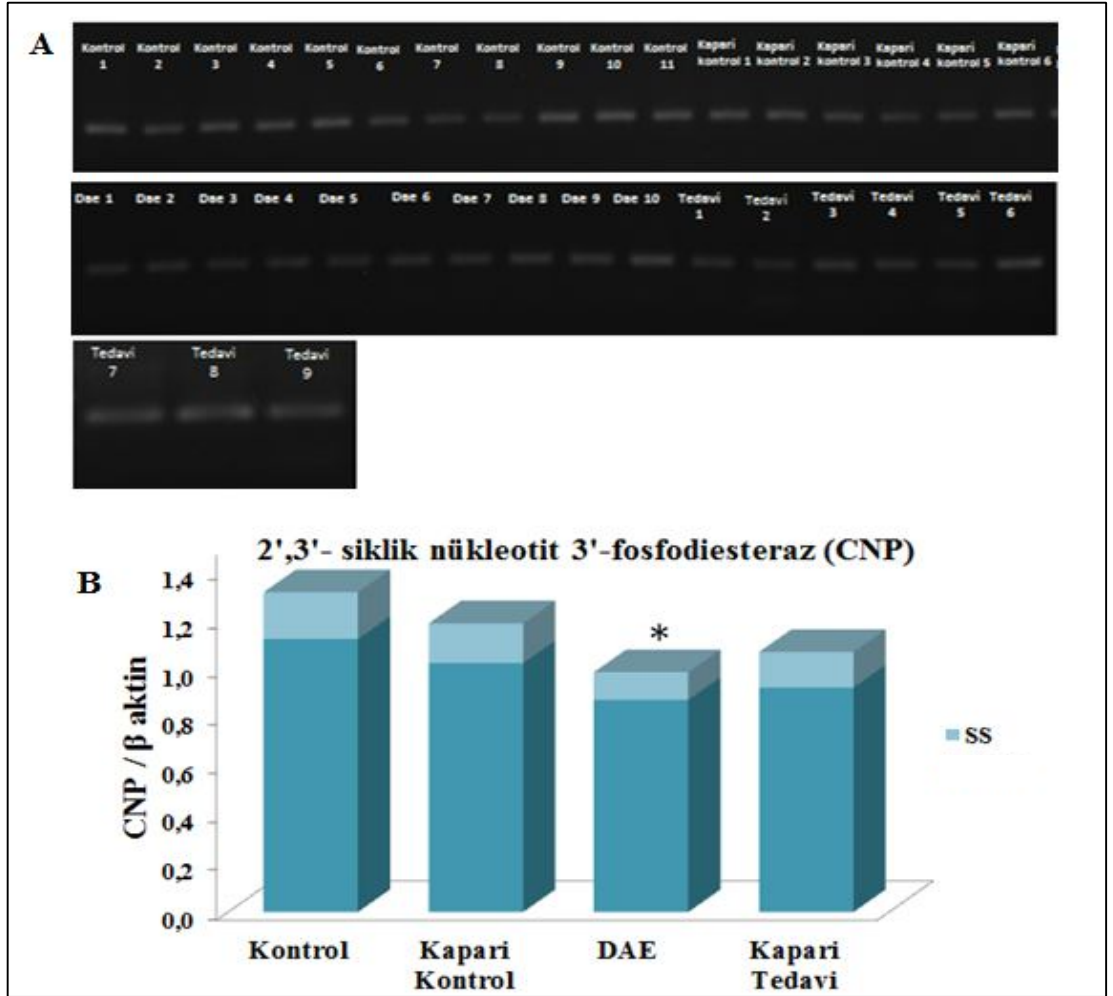
3.3. MS İle İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Tayini

Konsantrasyonları 260/280 nm ölçümü ile belirlenen RNA'lardan 2µg olacak şekilde hesaplanarak seçilen genlerin mRNA seviyelerindeki ekspresyon düzeyleri farklılıkları RT-PZR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikli olarak seçilen

genlere uygun sentezlenen primerler için yapışma sıcaklıkları ve döngü sayısı optimizasyonları yapıldı.

3.3.1. 2',3'- siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz (CNP)

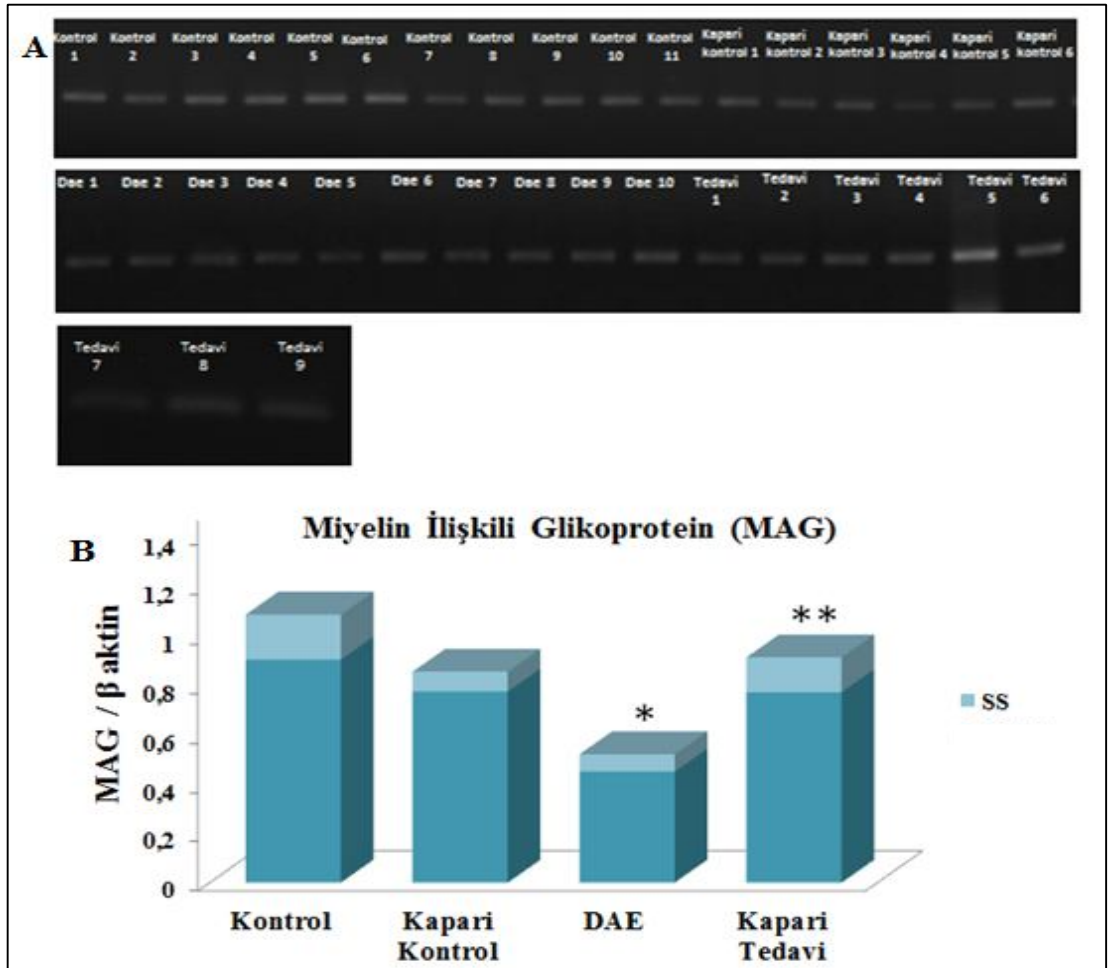
Kapari ekstresinin 2',3'- siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde CNP için 28 döngü ve 61°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. CNP için ürün büyüklüğü 151 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde CNP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %22 azalma gözlenmiştir. CNP mRNA ekspresyon düzeyinde Kapari uygulanması sonucunda bu genin ifade düzeyinde DAE grubu ile karşılaştırıldığında artış olmuştur. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.4: Kapari ekstresinin CNP mRNA seviyesine olan etkisi. A-Deney hayvanlarının CNP PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

3.3.2. Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG)

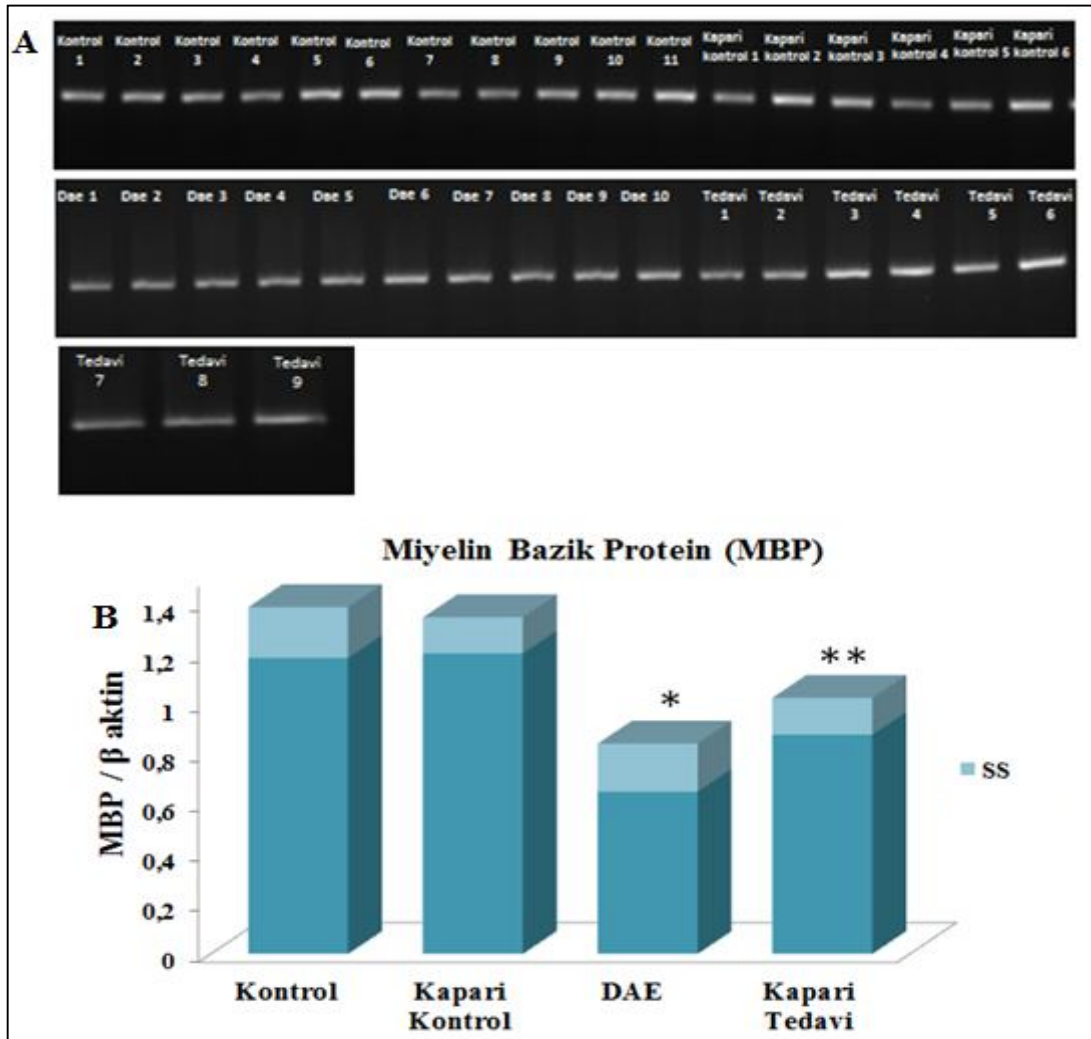
Kapari ekstresinin miyelin proteinlerinden olan miyelin ilişkili glikoproteininin gen ifadesi düzeyine etkilerini saptamak için mRNA düzeyleri kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. Bu bağlamda MAG için 28 döngü ve 61°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. MAG için ürün büyüklüğü 207 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde kontrole göre MAG mRNA ekspresyon düzeyinde %50 azalma gözlenmiştir. Kapari tedavisi uygulanan grupta DAE induksiyonu ile MAG mRNA düzeyinde meydana gelen etkinin %70'i ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar DAE oluşturulan hayvanlarda azalan MAG seviyesinin kapari ekstresi ile uygulanan tedavi sayesinde tekrar yükseldiğini göstermektedir.



Şekil 3.5: Kapari ekstresinin MAG mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneysel hayvanların MAG PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). **: DAE grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.3.3. Miyelin Temel Protein (MBP)

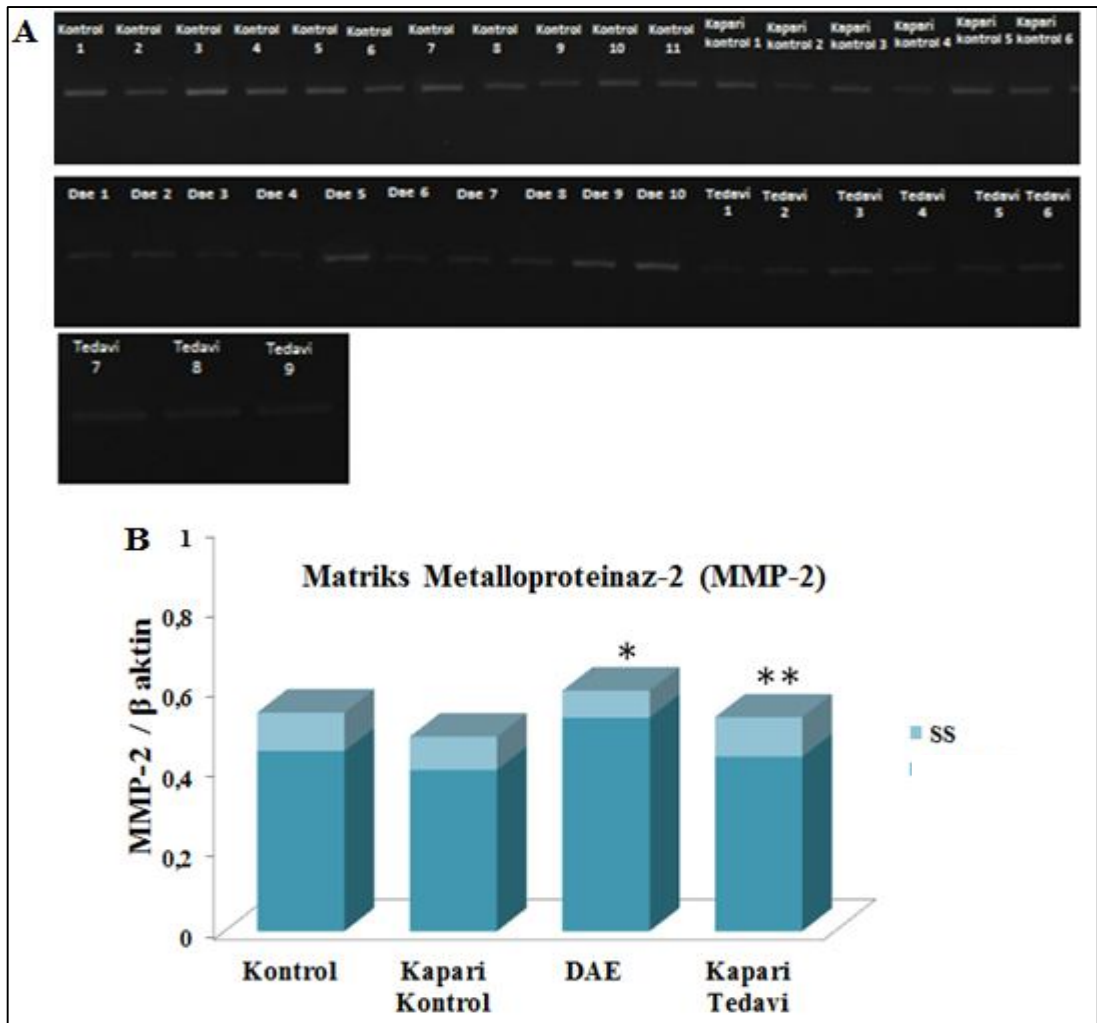
Kapari ekstresinin miyelin temel protein mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde MBP için 28 döngü ve 61°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. MBP için ürün büyüklüğü 389 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde MBP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %45 azalma gözlemlendi. Kapari uygulanan grupta %35 oranında kontrol değerlerine dönüşüm sağlanmıştır. Bu sonuçlar; DAE bireylerde mRNA ekspresyonu azalan MBP düzeyinin kapari uygulanan grupta arttığını göstermektedir.



Şekil 3.6: Kapari ekstresinin MBP mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneysel hayvanların MBP PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). **: DAE grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.3.4. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2)

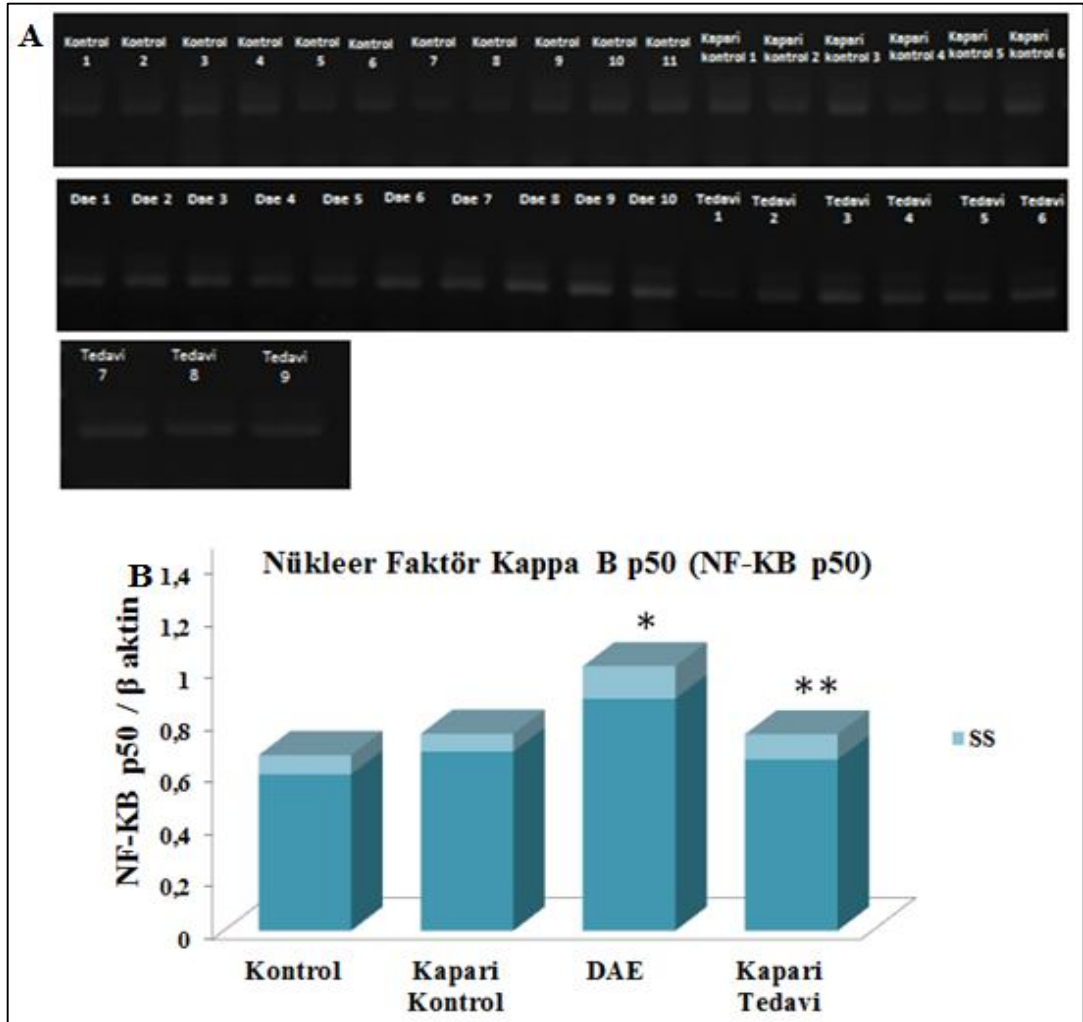
Kapari ekstresinin kan beyin bariyeri yıkımında etkili olan matriks metalloproteinaz 2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde MMP-2 için 28 döngü ve 60°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. MMP-2 için ürün büyüklüğü 577 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %20 artış gözlenmiştir. Kapari uygulanan grupta bu yükselmenin %110 oranında kontrol değerlerine döndüğü görülmüştür.



Şekil 3.7: Kapari ekstresinin MMP-2 mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deney hayvanlarının MMP-2 PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05). **: DAE grubundan farklı (p<0.05).

3.3.5. Nükleer Faktör Kappa B p50 (NF-κB p50)

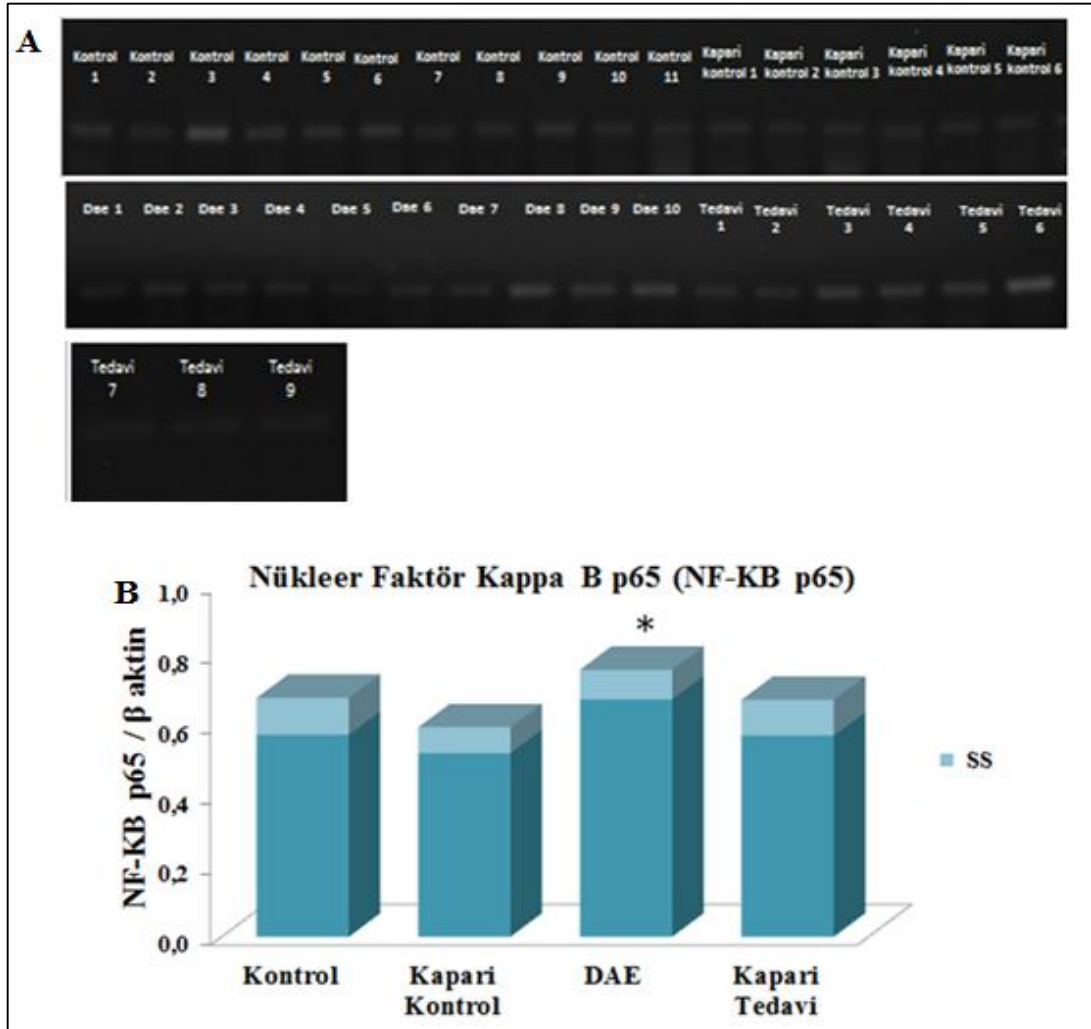
Önemli bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa B p50 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, kapari kontrol, DAE ve kapari tedavi grubu bireylerde bu transkripsiyon faktörünün MS hastalığı üzerine değişiminin gösterilebilmesi için RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde NF-κB p50 için 28 döngü ve 61°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. NF-κB p50 için ürün büyüklüğü 153 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde NF-κB p50 mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %48 artış gözlenmiştir. Kapari uygulanan grupta NF-κB p50 mRNA ekspresyon düzeyinde oluşan bu etkinin %81'i bertaraf edilmiştir.



Şekil 3.8: Kapari ekstresinin NF-κB p50 mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneysel hayvanların NF-κB p50 PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05). **: DAE grubundan farklı (p<0.05).

3.3.6. Nükleer Faktör Kappa B p65 (NF-κB p65)

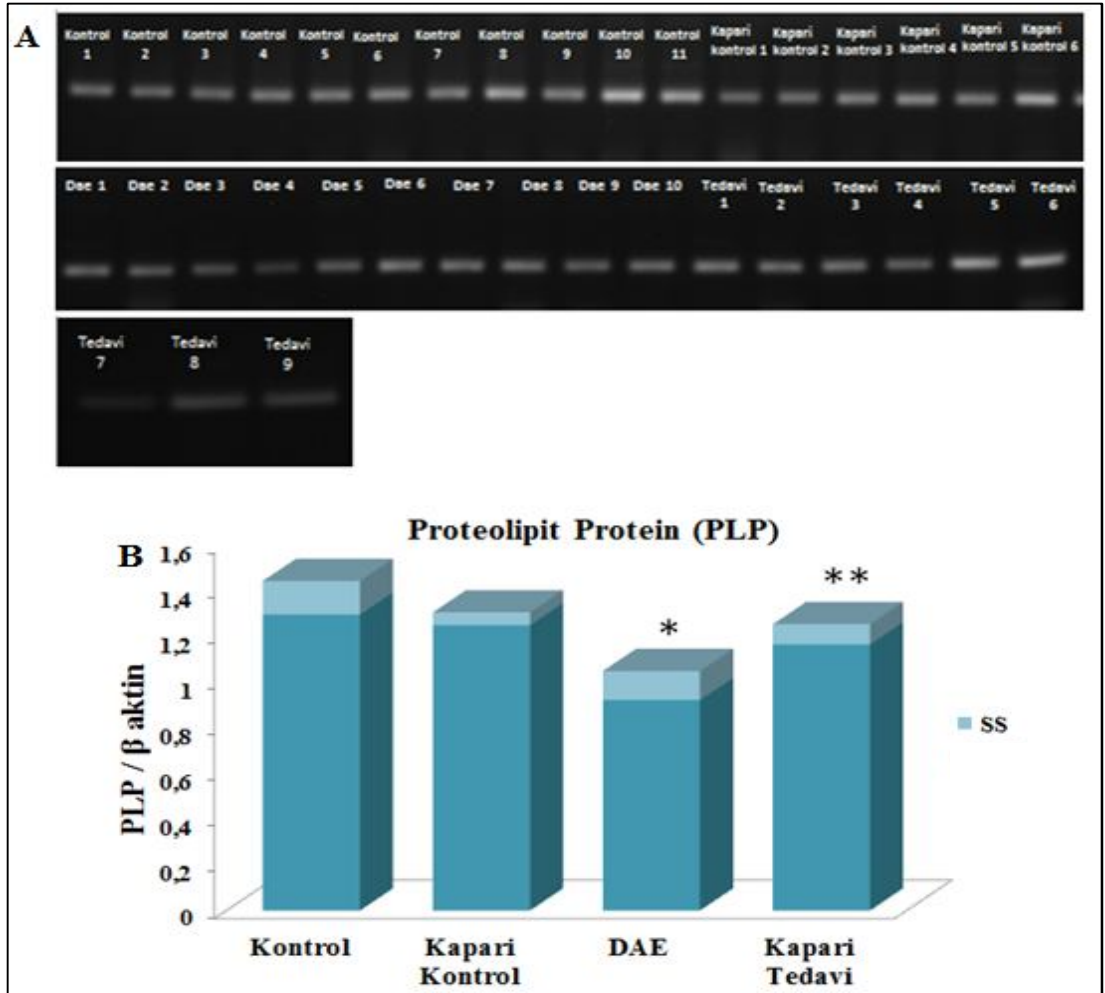
Kapari ekstresinin Nükleer Faktör Kappa B p65 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve kapari tedavi grubu bireylerde bu transkripsiyon faktörünün MS hastalığı üzerine değişiminin gösterilebilmesi için RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde NF-κB p65 için 28 döngü ve 63°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. NF-κB p65 için ürün büyüklüğü 111 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde NF-κB p65 mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %17 artış gözlenmiştir. Kapari tedavi grubunda ise ekspresyon düzeyinde bir azalış olmuştur. Ancak bu azalış istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir.



Şekil 3.9: Kapari ekstresinin NF-κB p65 mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deney hayvanlarının NF-κB p65 PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

3.3.7. Proteolipid Protein (PLP)

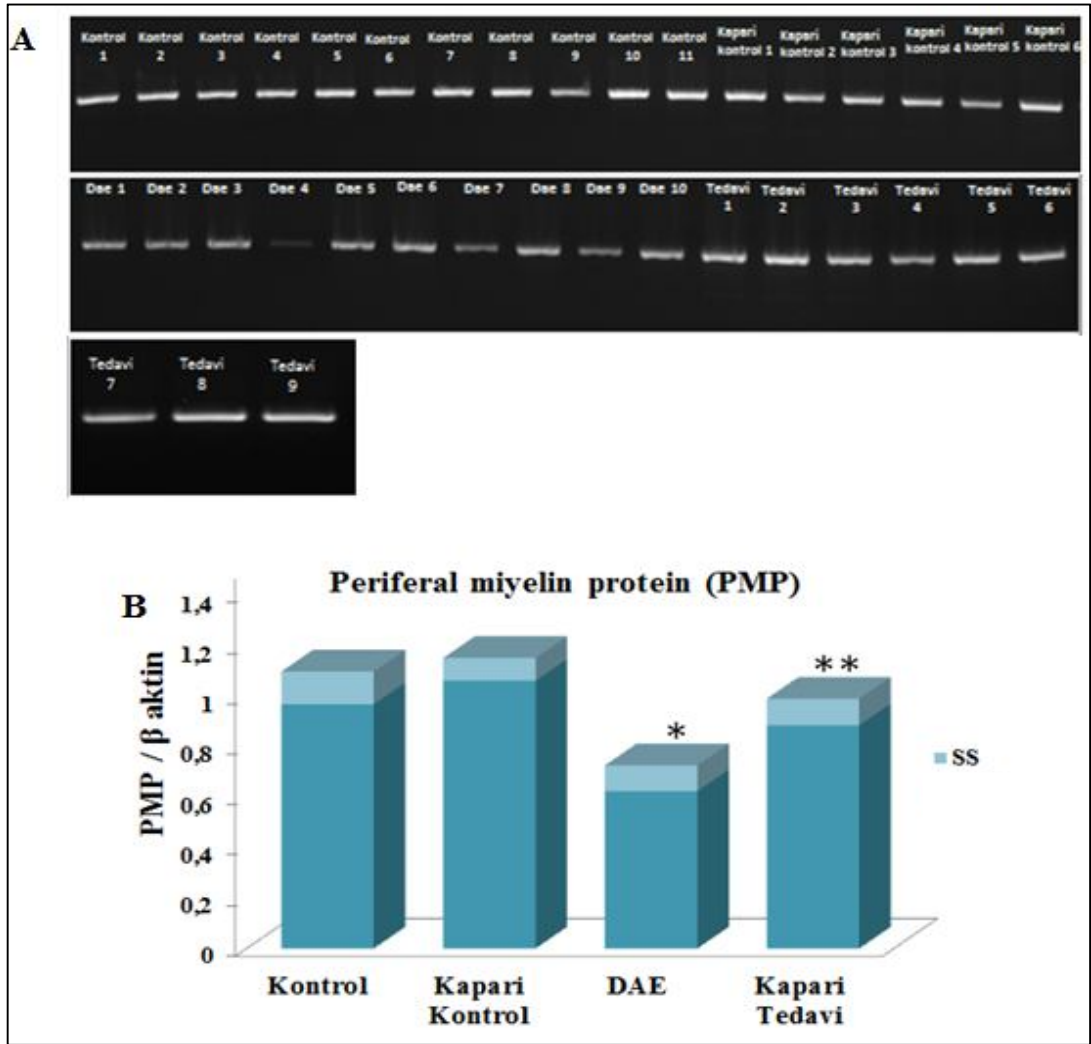
Kapari ekstresinin proteolipid protein mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde PLP için 28 döngü ve 60°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. PLP için ürün büyüklüğü 157 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde PLP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %30 azalma gözlenmiştir. Kapari tedavi grubu ile DAE grubu karşılaştırıldığında kapari DAE grubunda meydana gelen azalmanın %62'sini ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar; DAE bireylerde mRNA ekspresyonu azalan, PLP düzeyinin kapari uygulanması ile kontrol değerlerine yaklaştığını göstermektedir.



Şekil 3.10: Kapari ekstresinin PLP mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneş hayvanlarının PLP PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). **: DAE grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.3.8 Periferel Miyelin Protein (PMP)

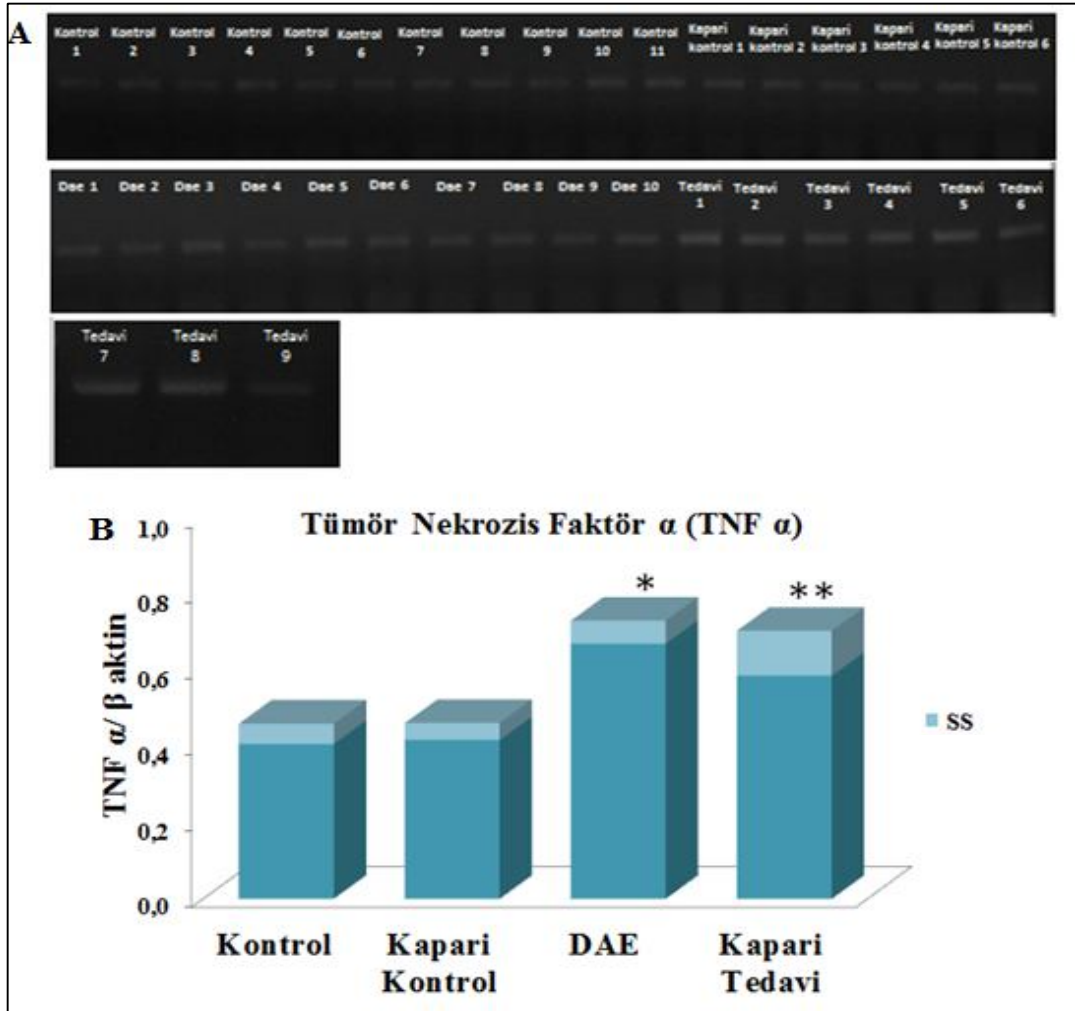
Periferel miyelin protein mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde farklılıkları RT-PZR yöntemi ile belirlendi. RT-PZR işleminde PMP için 28 döngü ve 60°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. PMP için ürün büyüklüğü 745 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde PMP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %35 azalma gözlenmiştir. Kapari tedavi grubunda ise, %74 oranında bu genin mRNA seviyesinde kontrol değerlerine dönüşüm sağlanmıştır.



Şekil 3.11: Kapari ekstresinin PMP mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneysel hayvanların PMP PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). **: DAE grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.3.9 Tümör Nekrozis Faktör α (TNF- α)

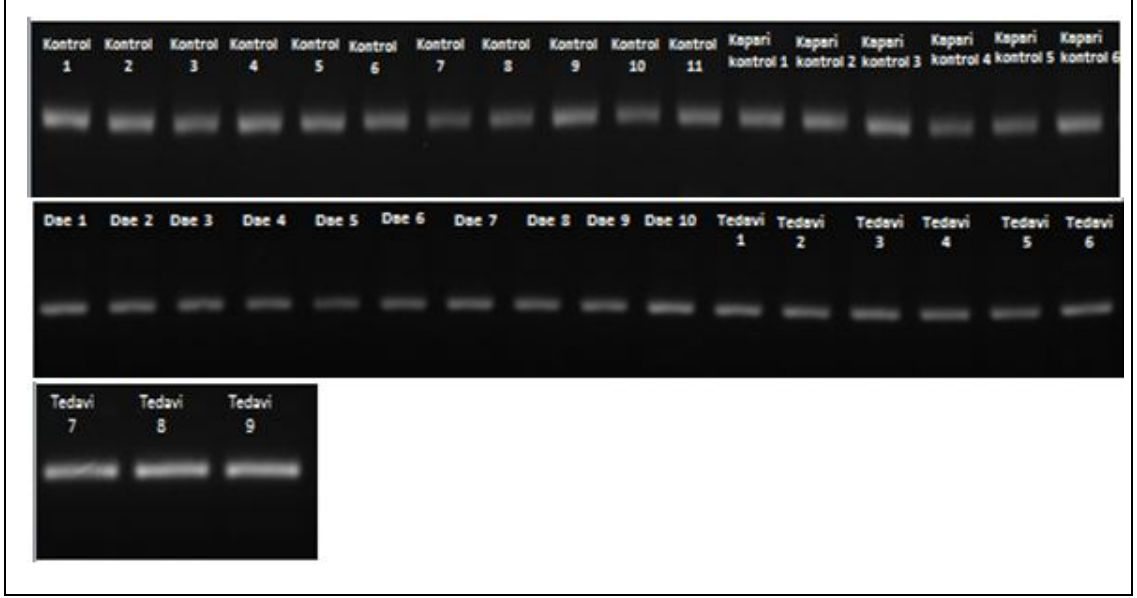
Kapari ekstresinin önemli bir sitokin olan tümör nekrozis faktör α mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi kontrol, kapari kontrol, DAE ve tedavi grubu bireylerde RT-PZR yöntemi ile tayin edildi. RT-PZR işleminde TNF- α için 28 döngü ve 60°C yapışma sıcaklığı kullanıldı. TNF- α için ürün büyüklüğü 206 bp'dir. Bantların densitometrik analizleri sonucunda DAE grubu bireylerde TNF- α mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre %65 artış gözlenmiştir. Kapari uygulaması ile DAE grubunda meydana gelen bu etkinin %32'si ortadan kalkmıştır. DAE grubunda artan TNF- α mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlam ifade eden düzeyde kapari tedavi grubunda azalmıştır.



Şekil 3.12: Kapari ekstresinin TNF- α mRNA seviyesine olan etkisi. A- Deneysel hayvanların TNF- α PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi. B- PZR bantlarının yoğunlukları densitometrik analiz ile belirlendi ve β aktin ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). **: DAE grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.3.10 Beta Aktin (β Aktin)

Çalışmamızda beta aktin iç kontrol gen olarak seçilmiş ve çalışılan genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri sonuçları beta aktin ile normalize edilmiştir. Beta aktin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13: Beta aktin PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi.

4. TARTIŞMA

Multipl skleroz (MS) merkezi sinir sisteminde (MSS) alevlenmelerle seyreden kronik, inflamatuvar, demiyelizan bir sinir sistemi hastalığıdır (Noseworthy ve diğ. 2000). Dünyada pek çok kişiyi etkileyen bu hastalığın halen bilinen kesin bir tedavisi yoktur. Bu nedenle hastalığın tedavisinde bitkilere dayalı alternatif tedaviler halk arasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye’de MS hastalarının tedavisi için sıklıkla kullandığı *Capparis ovata*’nın iyileştirici etkileri fare MS modeli olan deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) kullanılarak açığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. DAE MSS’nde görülen ve insanları etkileyen en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Multiple Skleroz (MS) için bir hayvan modeli teşkil etmektedir (Martin ve McFarland, 1995).

Literatürde yapılan çalışmalarda miyelin proteinleri olan MBP, MOG ve PLP kullanılarak DAE indüksiyonu gerçekleştirilmiş, PLP uygulanan çalışma gruplarında hayvan ölüm oranı diğer gruplardan daha fazla olmuştur. Bununla birlikte en yüksek kemokin seviyesine PLP grubunda ulaşılmıştır (Sanchez ve del Pozo 1999). MOG MSS miyelin tabakasında bulunan tip I transmembran proteindir. Ekstraselüler alanda 1 tane Ig domain içerdiğinden otoantikorlar için kolay ulaşılabilir bir proteindir (Gardinier ve diğ. 1992; Kroepfl ve diğ. 1996). Bu özelliğinden dolayı DAE indüklenmesi için diğer kullanılan proteinlere oranla daha çok tercih edilmektedir.

Yaptığımız çalışmada, Kapari ekstresinin C57BL/6 farelerde oluşturulmuş DAE üzerinde iyileştirici etkilerini test etmek için hayvanlara DAE indüksiyonu için MOG 35-55 enjeksiyonu yapılmış ve indüksiyon bu peptit ile sağlanmıştır.

Bu çalışmada ilk denemelerde ve öncü çalışmalarımızda her hayvana 150 µg MOG ve 200ng pertussis toksin enjekte edilmiş ve 28 hayvanda ulaşılan maksimum ortalama skor $1,78 \pm 0,32$ olmuş yani hayvanlarda tam anlamıyla DAE oluşturulamamıştır. Bunun nedeninin düşük miktarda MOG 35 55 enjeksiyonuna

bağlı olduğuna karar verilmiş bundan yola çıkarak DAE oluşumu için 225 µg MOG ve 400 ng pertussis toksin enjeksiyonu yapılmış ve ortalama maksimum skor $3,35 \pm 0,71$ olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar şiddetli bir DAE modeli oluşturulduğunun bir göstergesidir. Ancak bu enjeksiyonda DAE grubundan 14 hayvandan 9 hayvan çalışmayı tamamlayabilmiştir. Bu ölümlerin nedeni MOG miktarının artırılmasından çok MOG ile birlikte enjekte edilen 400ng pertussis toksine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda MS hastalarının günlük kullandıkları kapari miktarlarından yola çıkılarak oranlarını saptadığımız kapari karpuzu (meyvesi), kapari tomurcuğu ve kapari çiçeği kullanarak hazırladığımız sulu kapari ekstresi ile tedavi uyguladığımız DAE oluşturulmuş CL57BL/6 farelerde ciddi düzeyde koruyucu ve iyileştirici etkiler saptandı. Ayrıca kaparinin MS hastalığı üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması için dizayn edilen grupta 8 tane hayvana DAE oluşturmak için uygulanan antijen ve toksin enjeksiyonlarından 2 saat sonra gastrik gavaj ile kapari ekstresi verilmeye başlandı ve bu işlem 21 gün devam etti. Bu hayvanların hiç birisinde alerjik ensefalomyelit olgusu gözlenmedi. Ayrıca, öncelikle DAE modeli oluşturulan ve klinik bulgular gözlenen hayvanların %60'ında kapari ekstresi verilmesi ile klinik bulgular kaybolmuş, geri dönüşümlerin olduğu da tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu grupta klinik skorlar hiçbir şekilde yüksek değerlere ulaşmamıştır. Elde ettiğimiz bu veriler kapari ekstresinin MS üzerinde hem koruyucu ve hem de iyileştirici etkileri olduğunu kanıtlamaktadır.

Klinik bulgular düzeyinde gözlenen etkileri moleküler düzeyde saptamak için MS ile ilişkili olduğu kabul edilen genlerin deney gruplarında ifade düzeylerini araştırdık. Elde edilen sonuçların genel bir değerlendirmesi Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası farklılıkları

	Kontrol	Kapari Kontrol	DAE	Kapari Tedavi	Kapari uygulaması ile %'de değişim
CNP	100	91	78	82	18
MAG	100	86	50	85	70
MBP	100	101	55	74	35
PLP	100	96	71	89	62
PMP	100	109	65	91	74
MMP 2	100	90	119	98	100
NF κB p50	100	114	148	109	81
NF κB p65	100	91	117	97	100
TNF-α	100	102	165	144	32

Proteolipit protein (PLP) MSS miyelinde en bol bulunan proteindir. PLP miyelin yapısının kompakt halinde, oligodendrosit olgunlaşmasında, oligodendrosit akson interaksyonunda ve aksonların hayatta kalmasında rol alır (Campagnoni ve Skoff, 2001). MSS miyelininin bu temel bileşeni, multipl skleroz ve akut dissemine ensefalomyelit gibi demiyelizan hastalıklarda otoimmün saldırı için aday antijenlerdendir. PLP baskılanmış farelerde MSS miyelinde bozulmalar gözlenmiştir (Klugmann ve diğ. 1997; Griffiths ve diğ. 1998). Literatürde DAE modelinde azaldığı gösterilen PLP mRNA seviyesi (Yao ve diğ. 1995), benzer olarak bizim çalışmamızda kontrole göre DAE grubunda %30 azalmıştır. DAE oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca kapari verilen deney grubunda %62 oranında kontrol değerlere dönüşüm sağlanmıştır.

PLP'nin miyelin tabakasının temel bir bileşeni olduğu göz önüne alındığında kapari ekstresinin MS oluşumunda bozulan miyelin kılıfın rejenere edilmesini sağladığı söylemini kuvvetle desteklemektedir.

Miyelin Temel Proteini (MBP), MSS'nde bulunan sinirlerin miyelinizasyonunda önemli olduğu düşünülen bir diğer protein tipidir. Ayrıca MBP önemli bir MS tanı proteindir (Berger ve Reindl, 2006). Hayvan modellerinde de kanıtlanmış T-hücrelerinin oto-reaktivasyonunun MBP'nin tanınması sonucu tetiklenebileceği anlaşılmıştır (Seven ve Aslan, 2007). Çalışmamızda DAE MBP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre % 45 azalma gözlenmiş; kapari tedavi grubunda bu azalmanın %35'i ortadan kaldırılmıştır. Bu sonuçlar bize kapari

ekstresinin T hücre reaktivitesini ve bağıl enflamasyonu azalttığını buna bağlı olarak tedavi grubunda kontrol seviyelerine geri dönüşün söz konusu olduğunu göstermektedir.

Diğer önemli bir miyelin proteini Miyelin ilişkili glikoprotein (MAG)'dir. İn vitro olarak ifade düzeyi arttırılmış MAG transfekte edilmiş Schwann hücrelerde hızlandırılmış miyelinizasyon gösterilmiştir (Owens ve diğ. 1990). Fletcher ve diğ. 2011'de yaptığı çalışma MAG gen ekspresyonundaki düşüşün erken nöron kaybının bir göstergesi olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda DAE oluşturulan grupta MAG mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole oranla meydana gelen %51 oranındaki ciddi bir azalma söz konusudur. Bu azalma hastalık patojenezinde demiyelinizasyonda MAG'in etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu azalma kapari ekstresi uygulanan grupta %70 oranında ortadan kalkmıştır.

PLP, MBP ve MAG genleri ile elde edilen sonuçlar ile birlikte DAE grubunda gözlenen demiyelinizasyon bulguları, kapari tedavi uygulanan grupta ciddi düzeylerde miyelin oluşumu ve tekrar sentezi tetiklendiğini göstermektedir.

CNP ve PMP miyelin tabakasında bulunan diğer 2 proteindir. Bu iki protein MSS proteinlerinin küçük bir kısmını temsil eder. Naef ve Suter tarafından 1998'de yapılan çalışmada PMP'nin miyelin hasarı söz konusu olduğunda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda CNP ve PMP mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole karşılaştırıldığında DAE oluşturulan grupta sırayla %23 ve %36 oranında düşüş gözlenmiştir. CNP mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tedavi grubunda gözlenirken; PMP mRNA ekspresyon düzeyinde %74 oranında kontrol değerlerine dönüşüm sağlanmıştır.

Oligodendrosit farklılaşmasında ve miyelin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinen, fosfodiester bağlarının hidrolizini katalizleyen CNP aktivitesinin kapari ile anlamlı olmamakla birlikte artırılması miyelin sentezinin arttığının bir başka önemli göstergesidir.

Miyelin proteinlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri, DAE ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında; Sospedra ve Martin 'in 2005'te yaptığı çalışmada ortaya koyduğu gibi MS hastalarında, miyelin temel proteini, (MBP), proteolipid proteinleri (PLP), periferel miyelin protein (PMP), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) ve 2',3'siklik nükleotit 3'-fosfodisteraz (CNP) da dahil olmak üzere çeşitli

miyelin proteinlerine karşı T hücresi reaktifliğini destekler niteliktedir. Bununla birlikte miyelin proteinlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinin kapari ile tedavi edilen grupta, DAE grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar söz konusudur.

Metalloproteinazlar (MMP) geniş bir proteaz ailesidir. Bu enzimler proenzim olarak üretilir ve aktifleştğinde birçok fizyolojik ve patolojik süreci düzenler. Bu süreçler arasında önemli olanlardan bir tanesi MMP'ların Multipl skleroz da nöroinflamatuvar tepki olarak kan beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğini arttırması sayılabilir (Cunningham ve diğ. 2005). MMP'lar ekstraselüler matrikse, bazal laminaya, endotel hücrelerdeki sıkı bağlantılara saldırıp KBB geçirgenliğini arttırarak nöroinflamatuvar hasara neden olurlar. Akut MS oluşumunda MMP-2'nin beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyon artışının önemli bir rolü vardır (Gijbels ve diğ. 1992).

MS'da MMP'lar inflamatuvar mononükleer hücrelerin MSS içerisine geçişinden sorumludur. Leocani ve diğ. 2006'da yaptığı çalışmada MMP seviyelerinin MS'li hastalarda arttığını göstermiştir. Ayrıca Rosenberg'in 2009'da yaptığı çalışmada MS hastalarında MMP'nin, MBP'ini parçaladığı ve immünojenik peptitlerini oluşturduğu bu oluşan immünreaktif MBP parçalarının MS'li hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) görüldüğünü ortaya koymuştur. MMP-2 ve 9 MSS'ine T hücre göçünde ve KBB yıkımında rol oynar. Yapılan bir çalışmada sıçanlarda beyne direk enjekte edilen MMP KBB yıkımına ve miyelin kaybına neden olmuştur; bunlar her ikisinde MS hastalığının tipik özellikleridir (Anthony ve diğ. 1998). Gijbels ve diğ. 1994'te yaptığı çalışmada MMP inhibitörü olan GM-6001 ile tedavi edilen farelerde klinik deneysel alerjik ensefalomyelit gelişimi baskılamış; bu sayede hastalık skorlarında düşmeler gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da beyin dokusunda MMP 2 DAE mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole oranla %20 artış gözlenmiş; kapari tedavisi ile bu artış %100 kontrol seviyesine geri düşmüştür. Bu durumda kapari ekstresinin potansiyel bir MMP inhibitörü barındırdığı söylenebilir.

NF- κ B klinik olarak viral enfeksiyonlar, immüno-enflamatuvar hastalıklar, kanser ve lösemiler gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır ve bu özelliğinden dolayı pek çok çalışmaya konu olmuştur (Hiscott ve diğ. 2006; Horie,

2007). NF- κ B kronik inflamasyondaki önemli rolünü TNF- α , interlökin-1, 2, 12 gibi sitokinlerin transkripsiyonunu artırarak yerine getirmektedir (Atreya ve diğ. 2008).

Pahan ve Schmid'in 2000 yılında yaptığı çalışmada; NF- κ B aktivasyonunun bir inhibitörü olan pirolidin ditikarbomat (PDTTC) DAE geliştirilen farelerin omuriliklerindeki vücut içi NF- κ B aktivasyonunu önemli derecede inhibe etmiş ve DAE'nin klinik belirtilerini önemli derecede azaltmıştır. Bu çalışma NF- κ B aktivasyonunun, DAE'nin patojenitesinde önemli bir rol oynadığını ve NF- κ B aktivasyonunun inhibitörlerinin, MS tedavisi için önem arz edebildiğinin önemli bir göstergesidir. Yine aynı çalışmada NF- κ B / Rel alt birimlerine karşı antikor kullanılarak yapılan analizlerde RelA/p65 ve p50 alt birimlerinin, DAE oluşturulan farelerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada NF- κ B p50 ve p65 alt birimlerinin beyin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, DAE, kapari tedavi ve kapari kontrol grubunda karşılaştırılmıştır. p50 mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole karşılaştırıldığında DAE oluşturulan farelerde %48 artış gözlenmiştir. Bu artış kapari uygulanması ile %81 oranında ortadan kaldırılmıştır. p65 mRNA ekspresyon düzeyi DAE grubunda kontrole oranla %17 artmıştır. Bu sonuçların kapari uygulanan hayvanlarda DAE skorlarında meydana gelen gerilemeye katkı sağladığını göstermektedir.

NF- κ B'nin enflamatuvar aktivasyonda önemli rol oynadığı ve çok sayıda sitokin aktivasyonunu gerçekleştirdiği göz önüne alındığında kapari ekstresi uygulanması ile DAE indüklenen hayvanlarda NF- κ B baskılanmasının enflamatuvar yanıtı azalttığı ve önemli ölçüde durdurduğunun çok önemli bir dayanağıdır.

TNF- α , enflamasyon işlemine karışan bir sitokin olup akut faz tepkimesini uyaran sitokin grubunun da bir üyesidir. TNF- α 'nın ana işlevi, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesidir. TNF- α potansiyel bir bağışıklık aracısıdır ve bir pro-enflamatuvar sitokindir. MS'in hastalık seyrinde hastalar, beyin-omurilik sıvısında yüksek TNF seviyeleri ile ilişkilendirilmektedirler (Braun ve diğ. 1996). TNF- α gibi pro enflamatuvar sitokinlerin NF- κ B'nin bloklanması yolu ile indüksiyonunun engellenmesi ile DAE baskılanması bu transkripsiyon faktörü ile TNF- α 'nın hastalığıdaki rolünü göstermektedir (Pahan ve diğ. 1997). Ayrıca MS'in aktif fazı süresince hem TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12 gibi sitokin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Laman ve diğ. 1998; Sorensen ve diğ. 1999). Bizim çalışmamızda

TNF- α mRNA ekspresyon düzeyi DAE oluşturulmuş deney grubunda kontrolle karşılaştırıldığında %36 artış görülmektedir. Kapari ekstresi verilen grupta ise, DAE indüksiyonu ile meydana gelen bu artışın %32 oranında kontrol değerlerine dönüşümü sağlanmıştır. Bu sonuçlar NF- κ B sonuçları ile korelasyon göstermektedir. Bizim sonuçlarımız Pahan ve diğ. 1997'de ortaya koyduğu NF- κ B bloklanması yolu ile TNF α indüksiyonunun engellenmesi ile DAE baskılandığının çok kuvvetli delilleridir. Ayrıca NF- κ B ve TNF α düzeylerinde MS modelinde baskılanmış olmasında kaparinin güçlü antienflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve miyelin sentezini arttırması ile birlikte MS tedavisi için çok önemli bir ajan olabileceği fikrini destekler niteliktedir.

MS tedavisi ile ilgili gelişmeler 20. yy sonlarına dayanmaktadır. İnterferonlar (IFN) ve glatiramer asetat (GA), immün modülatuar ajanlar olarak 'United States Food and Drug Administration' (FDA) tarafından onaylanarak, relaps ile seyreden MS hastalarının kullanımına sunulmuştur. IFN β -1a, IFN β -1b ve GA'nın MS'de relaps oranlarını, özürülük gelişme hızını ve hastalık progresyonunu yavaşlattığı, plasebo-kontrollü çalışmalarda gösterilmiştir (Jacobs ve diğ. 1995; The Multiple Sclerosis Study Group, 1993). GA ve MBP'nin aminoasit yapısındaki benzerlik nedeniyle çapraz-reaktif immün mekanizmalar araştırılmaya başlanmıştır. GA'ın MBP ile çapraz-reaksiyon gösterdiği, lenfosit proliferasyonu ve gecikmiş hipersensitivite teknikleri kullanılarak hem hücresel hem de hümorale düzeyde gösterilmiştir (Teitelbaum, 1991). Ancak bu tedavi sadece alevli dönemlerin rahat geçmesini sağlamaktan daha öteye gidememiş hastalığın etkilerini tamamen ortadan kaldıran bir tedavi ortaya koyulamamıştır. Ayrıca bu tedavide karşılaşılan pek çok yan etki vardır. Enfeksiyon, ağrı, bulantı, anksiyete, depresyon, ateş, kas ağrısı bunlardan sadece birkaç tanesidir (Edgar ve diğ. 2004). Ayrıca bu tedavinin yıllık maliyeti 15.000 Euro'yu bulmaktadır.

Tüm sonuçlarımız değerlendirildiğinde Kapari ekstresinin miyelin proteinlerinin mRNA ekspresyonunu arttırdığı, MMP-2, TNF- α ve NF- κ B mRNA ekspresyonunu azalttığı göz önüne alınarak bu bitkinin MS tedavisinde potansiyel bir tedavi ajanı olabileceğini düşündürmektedir. Bunların yanı sıra kapari kontrol grubu oluşturulmuş ve bu bireylere de 500 mg/kg kapari ekstresi verilmiş, bu bitkinin ilaç-diyet etkileşimi hakkında bilgi edinebilmek için kapari kontrol grubu bireylerin karaciğer dokularından RNA izolasyonu yapılmış ve sitokrom P450 (CYP450)

enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda kontrol ve kapari grubu bireyler karşılaştırıldığında CYP1A1, 1A2, 2C37, 2D9, 2E1, 2F2, 3A11 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında herhangi anlamlı bir fark görülmemiştir (Ozgun ve diğ. 2012). Buda kapari ekstresinin ilaç etkileşim potansiyelinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Bu bulgularda çok önemlidir; çünkü kapari ekstresinin rahatlıkla kullanılabilceğini desteklemektedir.

Kapari ekstresi halen kesin tedavisi bulunmayan MS hastalığı için hem düşük maaliyeti hem de yan etkilerinin olmaması ve aynı zamanda kolay kullanılabilir olması göz önüne alındığında bu hastalığın tedavisi için yüksek potansiyelli olarak umut vaad etmektedir.

5. SONUÇ

Dünyada 2,5 milyon kişiyi etkileyen multipl skleroz hastalığının halen bilinen kesin tedavisi yoktur. Piyasadaki ilaçlar semptomları azaltıcı ve alevli dönemleri rahat geçirmek için hastalar tarafından kullanılmaktadır.

Sonuçlar göstermektedir ki; bu çalışmamızda DAE oluşturmak için yapılan antijen ve toksin enjeksiyonlarından 2 saat sonra gastrik gavaj ile kapari ekstresi verilen hayvanların hiç birisinde alerjik ensefalomyelit olgusu gözlenmemiştir. Ayrıca, öncelikle DAE modeli oluşturulan ve klinik bulgular gözlenen hayvanların %60'ında kapari özütü verilmesi ile klinik bulguların kaybolduğu, geri dönüşümlerin olduğu da tespit edildi. Ayrıca bu grupta klinik skorlar hiçbir şekilde yüksek değerlere ulaşmadı.

Hastalık ile ilişkilendirilen genlerin mRNA ekspresyonları beyin dokularında gruplar arasında karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar bu bitkinin MS hastalığının tedavisi için umut vaad ettiğini ortaya koyar niteliktedir. Tüm bu veriler göz önüne alındığında, kapari ekstresinin MS hastalığı üzerinde hem koruyucu, hem de iyileştirici etkileri saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Agel, M., Parmar, N. S., Mossa, J. S., Al-Yahya, M. A., Al-Said M. S. and Tariq, M.,** 1986. Anti-inflammatory activity of some Saudi Arabian medicinal plants. *J Inflammation Res*; **17**: 383-384.
- Al Said, M. S., Abdelsattar, E. A., Khalifa, S. I. and el Feraly, F. S.,**1988. Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*. *Pharmazie*, **43**: 640-641.
- Angelini, G., Vena, G. A., Filotico, R., Foti, C. and Grandolfo, M.,** 1991. Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses. *Contact dermatitis*, **24**: 382-383.
- Anthony, D. C., Miller, K. M., Fearn, S., Townsend, M. J. and Opdenakker, G.,** 1998. Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol*, **87**: 62-72.
- Apel, A., Greim, B. and Zettl, U. K.,** 2005. How frequently do patients with multiple sclerosis use complementary and alternative medicine?, *Complement Therapy Medicine*, **13**, 4, 258-63.
- Atreya, I., Atreya, R. and Neurath, M. F.,** 2008. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, **263**, 591- 6.
- Bacon, K. B. and Harrison, J. K,** 2000. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol* **104**: 92-97.
- Bağcı, C. and Şimşek, S.,** 1999. *Capparis ovata* desf. Farelere karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi: *Genel Tıp Dergisi*; **9**: 123-125.
- Balkwill, F. R.,** 1989. Tumour necrosis factor. *Br Med Bull*, **45**:389-400.
- Batoulis, H., Recks, M. S., Addicks, K. and Kuerten, S.,** 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis-achievements and prospective advances, *APMIS*, **119**, 12, 819-30.
- Berger, T. and Reindl, M.,** 2007. Multiple sclerosis: Disease biomarkers as indicated by pathophysiology. *Journal of the Neurological Sciences*, **259**, 21-26.
- Bergh, F.T., Dayyani, F. and Ziegler-Heitbrock, L.,** 2004. Impact of type-I interferon on monocyte subsets and their differentiation to dendritic cells. *J. Neuroimmunol*, **146**, 176-188.
- Beutler, B.,** 1995. TNF, immunity and inflammatory disease:lessons of the past decade. *J Invest Med*, **43**:227-235.

- Bowling, A. C.**, 2011. Complementary and alternative medicine and multiple sclerosis, *Neurologic Clinics*, **29**, 2, 465-80.
- Brasier, A. R.**, 2006. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovascular Toxicology*, **6**, 111- 30.
- Braun, N., Michel, U., Ernst, B.P., Metzner, R., Bitsch, A., Weber, F. And Rieckmann, P.**, 1996. Gene polymorphism at position-308 of the tumor-necrosis-factoralpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci. Lett.* **215**, 75–78.
- Brew, K., Dinakarpanian, D. and Nagase, H.**, 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*; **1477**: 267–83.
- Campagnoni, A.T. and Skoff, R.P.**, 2001. The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the *MBP* and *PLP* genes, *Brain Pathol.* **11** (1):74–91.
- Canellas, A. R., Gols A. R., Izquierdo, J. R., Subirana M. T. and Gairin, X. M.**, 2007. Idiopathic inflammatory-demyelinating diseases of the Central Nervous System. *Neuroradiology*, **49**:393-409.
- Chang, T. T., Jabs, C., Sobel, R. A., Kuchroo, V. K. and Sharpe, A. H.**, 1999. Studies in B7- deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **190**: 733–740.
- Charcot, J.**, 1868. Histologie de la sclérose en plaque, *Gazette des Hôpitaux*, **41**, 554–566.
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q. and Ghosh, G.**, 1998. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*, **391**, 410- 3.
- Cunningham, L. A., Wetzel, M. and Rosenberg, G. A.**, 2005. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* **50**: 329–39.
- Dangond F.**, 2002. Molecular basis of myelination; Disorders of myelin in the central and peripheral nervous system. Woburn MA, Butterworth Heinemann 0-7506-7253-6, 49-56.
- Derfuss, T., Linington, C., Hohlfeld, R. and Meinl, E.**, 2010. Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury, *Journal of Molecular Medicine*, **88**, 753–76.
- Dutra, R.C., de Souza, P. R. D. Bento, A.F., Marcon, R., Bicca, M.A., Pianowski, L.F. and Calixto, J. B.**, 2012. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms, *Biochemical Pharmacology*, **83**, 531-542.
- Dyment, D. A., Steckley, J. L., Morrison, K., Willer, C. J., Cader, M. Z., DeLuca, G. C., Sadovnick, A. D., Risch, N. and Ebers, G. C.**, 2004. TCR β polymorphisms and multiple sclerosis, *Genes and Immunity*, **5**, 337–342.

- Edgar, M., Brunet D. G., Fenton P., McBride, E. V. and Can, P. G.,** 2004. Lipoatrophy in Patients with Multiple Sclerosis on Glatiramer Acetate Catherine J. Neurol. Sci. **31**: 58-63.
- El-Ghorab, A., Shibamoto, T. and Özcan, M.,** 2007. Chemical Composition and Antioxidant Activities of Buds and Leaves of Capers (*Capparis ovata* Desf. var. *canescens*) Cultivated in Turkey. *J Essent Oil Res*, **19**: 72-77.
- Ethell, I. M. and Ethel, D. W.,** 2007. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions. *J Neurosci Res*.
- Finco, T. S. and Baldwin, A. S.,** 1995. Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity*, **3**, 263-72.
- Fletcher, J. L., Kondagari, G. S., Wright, A. L., Thomson, P. C., Williamson, P. and Taylor, R. M.,** 2011. Myelin genes are downregulated in canine fucosidosis. *Biochim Biophys Acta.*, **1812**(11):1418-26.
- Freedman, R.,** Famine foods Capparidaceae. www.hort.purdue.edu/newcrop/Faminefoods/ff_indices/ff_family_cd.html-7k_cappariciadeae.html
- Gardinier, M.V., Amiguet, P., Linington, C. and Matthieu, J. M.,** 1992. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* **33**:177-87.
- Germano, M. P., Pasquale, R. D., Angelo, V., Catania, S., Silvani, V. and Costa, C.,** 2002. Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source. *J. Agric. Food Chem*, **50**: 1168-1171.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T. and Grumont, R.,** 1999. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene*, **18**, 6888-95.
- Ghule, B.V, Muruganathan, G., Nakhat, P. D., Yeole, P. G.,** 2006. Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. Leaves. *J Ethnopharmacol*, **108**: 311-315.
- Gijbels, K., Galardy, R. E. and Steinman, L.,** 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest*; **94**: 2177-82.
- Gijbels, K., Masure, S., Carton, H. and Opdenakker, G.,** 1992. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* ; **41**: 29-34.
- Givogri, M. I., Bongarzone, E. R., Schonmann, V. and Campagnoni, A. T.,** 2001. Expression and regulation of golli products of myelin basic protein gene during *in vitro* development of oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **66**, 679-690.
- Glabinski, A. R. and Ransohoff, R.M.,** 1999. Sentries at the gate: chemokines and the blood-brain barrier. *J Neurovirol* **5**: 623-634.
- Godessart, N. and Kunkel, S. L.,** 2001. Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, **13**: 670-675.

- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H.,** 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, **129**:1953–1971.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D. and Thomson, C.,** 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280**:1610–13.
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G. and Ramagopalan, S. V.,** 2010. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis, *Plos one*, **5**, 9, e12496.
- Harauz, G., Ishiyama, N., Hill, C. M., Bates, I. R., Libich, D. S. and Farès, C.** 2004. Myelin basic protein – diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron*, **35**, 503–542.
- Hauser, S. and Oksenberg, J. R.,** 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*, **52**:61–76.
- Hawkins, S. A. and McDonnell, G. V.,** 1999. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **67**(2):148-52.
- Hemmer, B., Archelos, J. J., and Hartung, H. P.,** 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 291-301.
- Hiscott, J., Nguyen, T. L., Arguello, M., Nakhaei, P. and Paz, S.** 2006. Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*, **25**, 6844- 67.
- Ho, S.Y., Catalanotto, F. A., Lisak, R. P., and Dore-Duffy P.,** 1986. Zinc in multiple sclerosis. II. Correlation with disease activity and elevated plasma membrane-bound zinc in erythrocytes from patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **20**: 712-715.
- Hofstetter, H. H., Shive, C. L. and Forsthuber, T. G.,** 2002. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund’s adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presencet of high frequencies of Th2 cells, *The Journal of Immunology*, **169**, 117–125.
- Horie, R.,** 2007. NF-kappaB in pathogenesis and treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *International Reviews of Immunology*, **26**, 269- 81.
- Huttner, H. B., Schellinger, P. D., Struffert, T., Richter, G., Engelhorn, T., Bassemir, T., Mäurer, M., Garcia, M., Schwab, S., Köhrmann, M. and Doerfler, A.,** 2009. MRI criteria in MS patients with negative and positive oligoclonal bands: equal fulfillment of Barkhof’s criteria but different lesion patterns. *J Neurol.* Jul; **256**(7):1121-5.

- Jacobs, L. D. and Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG).**, 1995. A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-relapsing multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. *Mult Scler* **1**: 118–135.
- Klugmann, M., Schwab, M. H., Puhlhofer, A., Schneider, A. and Zimmermann, F.**, 1997. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* **18**:59–70.
- Kroepfl, J. F., Viise, L. R., Charron, A. J., Linington, C. and Gardinier, M. V.**, 1996. Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* **67**:2219–22.
- Lakhan, S. E. and Rowland, M.**, 2009. Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in multiple sclerosis: a systematic review, *BMC Neurology*, **9**, 59.
- Laman, J. D., Thompson, E. J. and Kappos, L.**, 1998. Balancing the Th1/Th2 concept in multiple sclerosis. *Immunol Today* **19**: 489–490.
- Leco, K. J., Khokha, R., Pavloff, N., Hawkes, S. P. and Edwards, D. R.**, 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem*; **269**: 9352–60.
- Leocani, L., Rovaris, M., Boneschi, F. M., Medaglini, S., Rossi, P., Martinelli, V., Amadio, S. and Comi G.**, 2006. Multimodal evoked potentials to assess the evolution of multiple sclerosis: a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **77**(9): 1030–1035.
- Leong, E. M., Semple, S. J., Angley, M., Siebert, W., Petkov, J. and McKinnon, R. A.**, 2009. Complementary and alternative medicines and dietary interventions in multiple sclerosis: what is being used in South Australia and why?, *Complementary Therapies in Medicine*, **17**, 4, 216-223.
- Li, C., Tropak, M.B., Gerlai, R., Clapoff, S., Newerly, W. A., Trapp, B., Peterson, A. and Roder, J.**, 1994. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* **369**, 747 – 750.
- Liuzzi, G. M., Trojano, M. and Fanelli, M.**, 2002. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Mult Scler*; **8**: 222–28.
- Lucchinetti, C., Brück, W. and Parisi, J.**, 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, **47**:707–717.
- Ma, X., Jiang, Y., Wu, A., Chen, X., Pi, R., Liu, M. and Liu Y.** 2010. Berberine attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice, *Plos One*, **5**, 10, e13489.
- Maeda, S. and Omata, M.**, 2008. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Science*, **99**, 836- 42.

- Mahad, D. J., Howell, S. J. L. and Woodroffe, M. N.,** 2002. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **72**: 498–502.
- Marconi, S., Acler, M. and Lovato, L.,** 2006. Anti-GD2-like IgM autoreactivity in multiple sclerosis. *Mult Scler*, **12**:302–308.
- Martin, R. and McFarland, H.F.,** 1995. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **32**:121-182.
- Martini, R., Mohajeri, M. H., Kasper, S., Giese, K. P. and Schachner, M.,** 1995. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin *J Neurosci*; **15**:4488-95.
- Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., Al-Hayani, A., Davies, S. N., Rasband, M. N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Mehl, E. and Linington C.,** 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *The Journal of Experimental Medicine*, 204, 10, 2363-2372.
- Mclaughlin, K.A. and Wucherpfennig, K.W.,** 2008. B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases, *Advances in Immunology*, **98**, 121-149.
- Merrill, J.E. and Benveniste, E.N.,** 1996. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful, *Trends Neurosci.*, **19** 331-338.
- Mi, S., Hu, B., Hahm, K. M., Luo, Y., Hui, E. S. K., Yuan, Q. J., Wong, W. M., Wang, L., Su, H. X., Chu, T. H., Guo, J. S., Zhang, W. M., So, K. F., Pepinsky, B., Shao, Z. H., Graff, C., Garber, E., Jung, V., Wu, E. X. and Wu, W. L.,** 2007. 1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nature Medicine*, **13**, 1228-1233.
- Milo, R. and Kahana, E.,** 2010. Multiple sclerosis: Geoeidemiology, genetics and the environment, *Autoimmunity Reviews*, 9, 5, A387-A394. MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* ; **50**: 329–39.
- Moscarello, M. A.,** 1997. Myelin basic protein, the ‘executive’ molecule of the myelin membrane. In: *Cell Biology and Pathology of Myelin: Evolving Biological Concepts and Therapeutic Approaches* (Juurlink, B. H. J., Devon, R. M., Doucette, J. R., Nazari, A. J., Schreyer, D. J. and Verge, V. M. K. Eds.), pp. 13–25, Plenum, New York.
- Multiple Sclerosis Encyclopaedia, 2003.** *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, <http://www.multiple-sclerosis.org/experimental-autoimmune-encephalomyelitis.html>, Retrieved on 23.05.2007. Multiple sclerosis. *Immunol Today* **19**: 489–490.
- Murray, T. J.,** 2009. 'The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries, *Journal of the Neurological Sciences*, **277**, 3-8.

- Naef, R. and Suter, U.**, 1998. Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease. *Microsc Res Tech.* **41**:359–371.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. and Weinshenker, B. G.**, 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**: 938–952.
- Noseworthy, J.H.**, 1999. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* **399**, A40–A47 (Suppl).
- Okamoto, T.**, 2006. NF-kappaB and rheumatic diseases. *Endocrine Metabolic Immune Disorders Drug Targets*, **6**, 359-72.
- O'Shea, J. J. and Murray, P. J.**, 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, **28**, 477-87.
- Ozgun O., Arslan S., Sen A.**, 2012. Low potential drug interaction of *Capparis ovata* water extract. 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations 12th European Regional ISSX Meeting. p97.
- Pahan, K. and Schmid, M.**, 2000. Activation of nuclear factor-kB in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis *Neuroscience Letters*, **287**: 17-20.
- Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M.S. and Singh, I.**, 1997. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages, *J. Clin. Invest.*, **100**:2671-2679.
- Pender, M. P., Csurhes, P. A. and Greer, J. M.**, 2000. Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J Immunol*, **165**:5322–5331.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A. and Salani, G.**, 2003. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* **422**: 688–694.
- Prryse, W.P. and Costello, F.**, 2001. The epidemiology of multiple sclerosis. In: Cook SD (ed). *Handbook of Multiple Sclerosis*. New York: Marcel Dekker, 15-32.
- Raine, C. S., Cannella, B., Hauser, S. L. and Genain, C. P.**, 1999. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol*, **46**:144–160.
- Raine, C.S.**, 1997. The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion, *J. Neuroimmunol.*, **77**; 135-152.
- Reindl, M., Khantane, S., Ehling, R., Schanda, K., Lutterotti, A. and Brinkhoff, C.**, 2003. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders, *Journal of Neuroimmunology*, **14**, 139-147.
- Rieckmann, P. and Albrecht, M.**, 1995. Tumor necrosis factor- α messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol*; **37**: 82-88.

- Rosati, G.**, 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*; **22**:117–39.
- Rosenberg G. A.**, 2009. Matrix metalloproteinase and their multiple roles in neurodegenerative disease. *Lancet Neuro*, **8**; 205-16.
- Rosenberg, G. A., Dencoff, J. E., Correa, N., Reiners, M. and Ford, C. C.**, 1996. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology*; **46**: 1626–32.
- Sanchez, M. F. and del Pozo, M. A.**, 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* **18**: 501–511.
- Saud, A. and Miller, J. R.**, 1995. Multiple Sclerosis. In: Rowland Lp, ed. *Merritt's Textbook of Neurology*. 804-824.
- Schwab, M. E.**, 2004. Nogo and axon regeneration, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**, 118–124.
- Sekine, A. Y, Hama, E., Watanabe, K., Tsubaki, S., Kanal, A. M. and Kanai, Y.**, 2001. Matrix metalloproteinase system in brain: Identification and characterization of brain specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J. Neurosci*; **13**(5):935-48.
- Sela, M., Arnon, R. and Teitelbaum, D.**, 1990. Suppressive activity of Cop-1 in EAE and its relevance to multiple sclerosis, *Bull Institut Pasteur*, **88**, 303-314.
- Serafini, B., Rosicarelli, B. and Magliozzi, R.**, 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* **14**:164–174.
- Seven, A. and Aslan, M.**, 2007. Biochemical and immunological markers of multiple sclerosis, *Turkish Journal of Biochemistry*, **32** (3) ; 112–119. 52 53.
- Shinto, L., Yadav, V., Morris, C., Lapidus, J. A., Senders, A. and Bourdette, D.**, 2005. The perceived benefit and satisfaction from conventional and complementary and alternative medicine (CAM) in people with multiple sclerosis, *Complementary Therapies in Medicine*, **13**, 4, 264-272.
- Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D. L. and Cheresh, D. A.**, 2001. Disruption of matrix metalloproteinases 2 binding to integrin alpha v beta 3 by an inorganic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**:119-124.
- Sorensen, T. L, Ransohoff, R. M., Strieter, R. M. and Sellebjerg, F.**, 2004. Chemokine CCL2 and Chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, **11**: 445–449.
- Sorensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R. M., Frederiksen, J. L. and Ransohoff, R. M.**, 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* **103**: 807–815.
- Sospedra, M. and Martin, R.**, 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, **23**:683–747.

- Stauffer, M.**, 2006. Understanding Multiple sclerosis, (Ph D), The University Press of Mississippi is a member of the Association of American University Presses.
- Taylor, B. V.**, 2011. The major cause of multiple sclerosis is environmental: genetics has a minor role – Yes, *Multiple Sclerosis Journal*, **17**, 10, 1171-1173.
- Teitelbaum, D., Aharoni, R., Sela, M. and Arnon, R.**, 1991. Cross-reactions and specificities of monoclonal antibodies against myelin basic protein and against the synthetic copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9528-9532.
- Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C. and Livrae, M. A.**, 2007. Bioactive Components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion. *J Agric Food Chem* ; **55**: 8465-8471.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group** 1993. Interferon β -1b is effective in relapsing/remitting multiple sclerosis: 1. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* **43**: 655–661.
- Tong, X., Yin, L., Washington, R., Rosenberg, D. W. And Giardina, C.**, 2004. The p50-p50 NF-kappaB complex as a stimulus-specific repressor of gene activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **265**, 171-83.
- Trinh, D. V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J. and Huxford, T.**, 2008. The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *Journal of Molecular Biology*, **379**, 122- 35.
- Trisolini, M., Honeycutt, A., Wiener, J. and Lesesne. S.**, 2010. 'Global economic impact of multiple sclerosis', International MS Federation.
- Tsunoda, I. and Fujinami, R. S.**, 2010. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **5**, 355–369.
- Valen, G., Yan, Z. And Hansson G. K.**, 2001. Nuclear Factor Kappa-B and the Heart. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. **38**, 2.
- Victor, M. and Ropper, H. A.**, 2001. Adams and Victor's Principles of Neurology. 7. Edition, Mc Graw-Hill, New York,. 954-979.
- Vieira, P.L., Heystek, H.C., Wormmeester, J., Wierenga, E.A. and Kapsenberg, M.L.**, 2003. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J. Immunol* **170**, 4483–4488.
- Weinshenker, B.G.**,1996. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol. Clin.* **14**:291–308.

- Yao, D., Liu X., Hudson, L. D. And Webster H. D., 1995.** Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis (oligodendroglia/myelin basic protein/proteolipid protein/myelin regeneration/multiple sclerosis) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **92**, pp. 6190-6194, June 1995 *Neurobiology*.
- Yednock, T. A., Canon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L. and Karin, N., 1992.** Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin, *Nature*, **356**, 63-66.
- Yong, V. W., 2005.** Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci*; **6**:931-44.
- Yong, V. W., Zabad, R. K., Agrawal, S., Goncalves, D. A. and Metz, L. M., 2007.** Elevation of Matrix metalloproteinases (MMPs) in Multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J Neurol Sci*.
- Zajicek, J. P. and Apostu, V. I., 2011.** Role of cannabinoids in multiple sclerosis, *CNS Drugs*, **25**, 3, 187-201.
- Zheng, X. P., Hu, X.Q., Zhou, G. Y., Lu, Z.Q., Qiu, W., Bao, J. and Dai, Y.Q., 2008.** Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response, *Journal of Neuroimmunology*, **194**, 107–114.
- Zhou, D., Srivastava, R. and Nessler, S., 2006.** Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:19057–19062.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Özden ÖZGÜN
Doğum Tarihi ve Yeri : 11.03.1986/Denizli
Medeni Durum : Bekar
Uyruk : Türkiye
Cep Tel : 0 507 697 3165
E-posta : ozdenozgun86@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Biyoloji A.B.D. Fen Bilimleri Enstitüsü Pamukkale Üniversitesi 2009-
Lisans	Biyoloji Bölümü Pamukkale Üniversitesi 2005-2009
Lise	Acıpayam Anadolu Lisesi 2001-2004

YAYINLAR

Uluslararası Makale (SCI)

- *Arslan, S., **Ozgun, O.**, Celik, G., Semiz, A., Dusen, O., Mammadov, R., and Sen, A. (2011) Effects of *Cyclamen trochopteranthum* on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 63(3), 545-555.
- * Sen A, **Ozgun O**, Arinç E, Arslan S. (2012). Diverse action of acrylamide on cytochrome P450 and glutathione S-transferase isozyme activities, mRNA levels and protein levels in human hepatocarcinoma cells. *Cell Biology Toxicology*, 28(3), 175-86.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- ***Ozgun O**, Arslan S, Semiz A, Kapdag M, Oztas M, Mammadov R, **Sen A** (2009). Cyclamen as an ethnomedicine: is it safe? *FEBS Journal* 276: Suppl. 1, pp. 333.
- *Kaptag M, Arslan S, **Ozgun O**, Oztas M, Ural M, Dusen O, **Sen A** (2009). Possible implications of *Cyclamen trochopterantum* on human therapeutics. *FEBS Journal* 276: Suppl. 1, pp. 315.
- *Arslan S., **Ozgun O.**, Sen A. Differential Effects of Cyclamen Extract on P450 Gene Expression (2010). ISSX Journal, P261, p131.
- *Arslan S, **Ozgun O** and Sen A. (2011). Modulatory Effects of *Cyclamen Trochopteranthum* on Drug and Carcinogen Metabolism in HELA Cells. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 194.
- ***Ozgun O.**, Arslan S. and Sen A. (2011). Differential Effects of Cyclamen Extract on P450 Gene Expression in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 225.
- *Urhan R., Terzioglu G., Gul A. O., Atmaca P., **Ozgun O.**, Cetin S., Arslan S. and Sen A. (2011). Anti-Cancer Effect of Bee Venom in Cervical Cancer Cells. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 230.
- *Terzioglu G., Gul A. O., Atmaca P., **Ozgun O.**, Cetin S., Arslan S. and Sen A. (2011). Bee Venom Induced Apoptosis in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 234 .
- *Arslan S., Atmaca P., Terzioglu G., Gul A. O., Cetin S., Semiz A., **Ozgun O.** and Sen A. (2011). Caspase and MAPKs Mediated Apoptosis by Bee Venom in Caco-2 Cell Line. ICBB Congress.
- ***Ozgun O.**, Arslan S. and Sen A. (2012). Low Potential for Drug Interaction of *Capparis ovata* Water Extract. 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations 12th European Regional ISSX Meeting. p97.

*Arslan S., Atmaca P., Terzioglu G., **Ozgun O.**, Celik G. and Sen A. (2012). Drug Interaction and Carcinogen Activating Potential of o-Coumaric Acid. 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations 12th European Regional ISSX Meeting. p99.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

***Özgün Ö.**, Çelik G., Şen A., Arslan Ş. Akrilamidin insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) Sitokrom P4502E1, 1A1 ve 3A4 mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkisi (2010). 20. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Denizli, S. 217.

*Gürbüz H., Koç T., **Özgün Ö.**, Arslan Ş., Şen A. Yakıotu (*Epilobium hirsutum*) ve Ökseotu (*Viscum album*)’ndan elde edilen ekstratlar ile Ellajik Asit ve Sınnamik Asidin muhtemel HMG-KoA inhibitör etkileri (2010). 20. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Denizli, S. 232.

