

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DENEYSEL MULTİPLE SKLEROZ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA FARKLI BİYOTİN FORMLARININ miR-21,
miR-107 VE miR-122 İLE PI3K/AKT SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beşir ER

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Moleküler Biyoloji

HAZİRAN 2022

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**DENEYSEL MULTİPLE SKLEROZ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
FARKLI BİYOTİN FORMLARININ miR-21, miR-107 VE miR-122
İLE PI3K/AKT SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Tez Yazarı
Beşir ER

Danışman
Doç. Dr. Mehmet TUZCU

HAZİRAN 2022
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Başlığı: Deneysel Multiple Skleroz Oluşturulan Sıçanlarda Farklı Biyotin Formlarının miR-21, miR-107 ve miR-122 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Yazarı: Beşir ER

İlk Teslim Tarihi: 09.05.2022

Savunma Tarihi: 08.06.2022

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Mehmet TUZCU Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Prof. Dr. Kazım ŞAHİN Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza
Prof. Dr. Kürşat Esat ALYAMAÇ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Deneysel Multiple Skleroz Oluşturulan Sıçanlarda Farklı Biyotin Formlarının miR-21, miR-107 ve miR-122 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin Araştırılması” Başlıklı Doktora Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

08.06.2022

Beşir ER



ÖNSÖZ

Multiple skleroz (MS) genel olarak üretim çağında olan genç yetişkinleri olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca hastalığın tedavisinin olmaması ile birlikte hem tedavi için harcanan maddi kayıplara hem de iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda MS hastalığı ülke ekonomilerine büyük oranda zarar vermektedir. Bu çalışma, farklı biyotin formlarının, sıçanların hipokampus bölgesinde lokal demiyelinizasyon oluşturularak yapılan deneysel MS modelinin moleküler mekanizması üzerinde yapacağı potansiyel etkilerinin araştırılması için yapılmıştır.

Doktora öğrenimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim ve tez sürecim boyunca her türlü desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yol gösterici olan ve aynı zamanda maddi ve manevi desteklerini daima hissettiğim Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Kazim ŞAHİN ve Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN'e, çalışmalarım esnasında yardımlarını ve tecrübesini esirgemeyen Prof. Dr. Cemal G. ORHAN ve Doç. Dr. Hasan GENÇOĞLU'na, çalışma arkadaşlarım arasında öz olmasa da kardeşim olarak gördüğüm sayın Dr. Öğr. Üyesi Füsün ERTEN'e, ayrıca Dr. Arş Gör. Emre ŞAHİN, Doktorantlar Arş Gör. Bayram AKOĞLAN, Ramazan ÖZMEN ve Muhammed TOKMAK'a ve ayrıca tez çalışmamda destekleri ve akademik hayatımda emeği olduğu halde ismi geçmeyen tüm hocalarım ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımda fiziki yardımını aldığım, ani vefatıyla bizleri üzen FÜDAM personeli merhum Suat DOĞAN'ı da saygıyla anıyorum.

Beni yetiştirip, bu günlere gelmemde çok emekleri olan ve hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, hayatımın en değerli varlıkları olan biricik ailem olan babam Ahmet ER ve annem Fatma ER'e, değerli kardeşlerim Emine, Latif, Gülbanu ve Akif'e bana olan inançlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasında, her türlü laboratuvar desteğini sağlayan kıymetli Hocam Prof. Dr. Kazim ŞAHİN'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Beşir ER
ELAZIĞ, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	5
1.2. Multiple Skleroz	7
1.3. Magnezyum	11
1.4. Biyotin	12
1.5. Magnezyum Biyotinat	13
1.6. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Sinyal Yoluğı	13
1.6.1. Fosfatidilinositol 3-Kinaz: Akış Yukarısındaki Anahtar Bileşen	14
1.6.2. Serin/Treonin Protein Kinaz: Çekirdek Bölgesi	14
1.6.3. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Aktivasyonu	15
1.6.4. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Negatif Regölasyonu.....	15
1.6.5. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Aşğı Akış Düzenlemesi	16
1.7. Nükleer Faktör Eritroid-2 ile İlişkili Faktör 2	16
1.7.1. Beyin Metabolizmasında Nükleer Faktör Eritroid-2 İle İlişkili Faktör 2 Sinyali	18
1.8. Hem-Oksijenaz 1	19
1.9. Nükleer Faktör Kappa B	23
1.10. Nörodejeneratif Hastalıklarda Apoptoz	25
1.10.1. B Hücreli Lenfoma 2 Ailesi Proteinleri.....	26
1.10.2. B Hücreli Lenfoma 2 ile İlişkili X Proteinini	27
1.10.3. B Hücreli Lenfoma 2 ile İlişkili X Proteinini Aktivasyon Mekanizması	28
1.10.4. B Hücreli Lenfoma 2	29
1.10.5. Kaspaz-3.....	31
1.11. MikroRNA Biyosentezi ve İşlevi	31
1.11.1. MikroRNA-21	33
1.11.2. MikroRNA -107	34
1.11.3. MikroRNA -122	34
2. MATERYAL VE METOT	36
2.1. Hayvan Materyali	36
2.1.1. Araştırma Grupları	36
2.2. Laboratuar Analizleri.....	37
2.2.1. RNA ekstraksiyonu	37
2.2.2. cDNA Sentezi Protokolü	38
2.2.3. RT-PCR Örnek Tüplerinin Hazırlanması	39
2.2.4. Western Blot Analizi	40
2.2.5. Beyin Dokusu Örneklerinin Homojenizasyonu.....	41

2.2.6. SDS-PAGE Analizleri.....	41
2.2.7. Western Blot Protokolü.....	42
2.3. İstatistiksel Analizler	43
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	44
4. SONUÇLAR.....	65
ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

Deneyisel Multiple Skleroz Oluşturulan Sıçanlarda Farklı Biotin Formlarının miR-21, miR-107 ve miR-122 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Beşir ER

Doktora Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2022, Sayfa: xii + 85

Bağıışıklık sistemi hücrelerinin miyelin kılıfına ve merkezi sinir sistemi yapılarına zarar vermesi sonucu gelişen Multiple Skleroz (MS), en sık görülen nörolojik hastalıktır. Biotin takviyesi MS hastalığının ilerlemesini geciktirerek bireylerin yaşam kalitesini arttırmaktadır. Magnezyum (Mg) sinir hücrelerinde iletimi sağlayan nörotransmitter maddelerin alınımlarını ve salınımlarının kontrolünde rol oynar. Ancak, Mg ve Biotinin kombine kullanımı ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, sıçanlarda lizolesitin (LPC) ile oluşturulan demiyelinizasyon sonrası deneyisel MS modelinde Biotin ve Magnezyum Biotinatın (MgB) etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, toplam 42 adet Wistar albino sıçan 6 gruba ayrıldı. i: Kontrol; tek doz % 0.9 fizyolojik serum verilen sıçanlar. ii: LPC; tek doz % 0.9 fizyolojik serum içerisinde % 1 oranında hazırlanmış LPC verilen sıçanlar. iii: LPC+BI: LPC ve 0.9 mg D-biotin verilen sıçanlar. iv: LPC+BII: LPC ve 9 mg D-biotin verilen sıçanlar. v: LPC+MgBI: LPC ve 0.9 mg biotin (MgB) verilen sıçanlar. vi: LPC+MgBII: LPC ve 9 mg biotin (MgB) verilen sıçanlar. D-biotin ve MgB, 7 hafta süreyle günlük oral gavaj olarak uygulandı. miR-21 ekspresyonu kontrol ve tedavi gruplarına göre LPC grubunda belirgin bir şekilde artarken, miR-107 ve miR-122 ekspresyonları ise belirgin bir şekilde düşmüştür ($p<0.0001$). PI3K, Akt1, Nrf2, HO-1 ve Bcl-2 protein düzeylerinde kontrol ve tedavi gruplarına göre LPC gruplarının düzeyleri düşerken NF- κ B, Bax ve Kaspaz-3 protein düzeylerinde ise protein seviyeleri artmıştır ($p<0.0001$). Sonuç olarak, sıçanlarda LPC ile indüklenen MS hastalığında, MgB takviyesinin miR-21, miR-107 ve miR-122 ile NF- κ B, Nrf2/HO-1 ve apoptotik sinyal yollarını regüle ederek MS hastalığının ilerlemesini geciktirebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nörodejenerasyon, Demiyelinizasyon, Multiple Skleroz, Magnezyum-Biotinat, Biotin

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Different Biotin Forms on miR-21, miR-107 and miR-122 and PI3K/Akt Signaling Pathway in Experimental Multiple Sclerosis Induced Rats

Beşir ER

Ph.D. Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

June 2022, Pages: xii + 85

The most common neurological disease Multiple Sclerosis (MS), is caused by myelin sheath damage to immune system and central nervous system structures. Biotin supplementation delays the progression of MS and improves the life quality of individuals. Magnesium (Mg) plays a role in the uptake and release of neurotransmitter substances transmitted in nerve cells. Yet, no studies found in the literature on combining Biotin and Mg. In this study, the effects of Biotin and Magnesium-Biotinate (MgB) were investigated, after lysolecithin (LPC) induced demyelination in the experimental MS model. Total 42 Wistar albino rats were divided into 6 groups. i:Control; rats given a single dose of 0.9% saline. ii:LPC; given a single dose of 1% prepared LPC in 0.9% saline. iii:LPC+BI; rats given LPC and 0.9 mg d-biotin. iv:LPC+BII; rats given LPC and 9 mg of d-biotin. v:LPC+MgBI; rats given LPC and 0.9 mg of MgB. vi:LPC+MgBII; rats given LPC and 9 mg of MgB. Biotins were given orally daily for 7 weeks. The expression of miR-21 increased in the LPC group compared to the control and treatment groups, while expression of miR-107 and miR-122 decreased ($p<0.0001$). While the levels of LPC groups decreased in PI3K, Akt1, Nrf2, HO-1 and Bcl-2 protein levels compared to the control and treatment groups, the protein levels increased in NF- κ B, Bax and Caspase-3 protein levels ($p<0.0001$). Eventually, MgB supplementation is anticipated to prevent the progression of MS in rats with LPC-induced MS disease through modulating miR-21, miR-107, and miR-122, NF- κ B, Nrf2/HO-1, and apoptotic signaling pathways.

Keywords: Neurodegeneration, Demyelination, Multiple Sclerosis, Magnesium-biotinate, Biotin

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Yaygın nörodejeneratif bozuklukların şematik görünümü	5
Şekil 1.2. Küresel nörodejeneratif hastalıklar ilaç pazarı büyüklüğü	6
Şekil 1.3. Hastalık göstergesine göre küresel nörodejeneratif hastalıklar pazar payı	6
Şekil 1.4. Sağlıklı sinir hücresi ve multiple skleroz hastası sinir hücresi	7
Şekil 1.5. Multiple Sklerozun neden olduğu hasar tipleri	10
Şekil 1.6. Nrf2 translokasyonunun gösteren şematik gösterimi	17
Şekil 1.7. HO-1 ve hem katabolizması	20
Şekil 1.8. HO-1 ekspresyonunun düzenlenmesi	21
Şekil 1.9. HO-1 tarafından immünoregülasyonu	22
Şekil 1.10. NF- κ B 'nin sinir sisteminin hücresel bağlamındaki rolü	24
Şekil 1.11. NF- κ B sinyalleşme kaskadı, klasik ve alternatif yollar görsel şeması	25
Şekil 1.12. Bcl-2 aile üyeleri apoptozu düzenler	27
Şekil 1.13. Anti-apoptotik Bcl-2 alt ailesi içindeki roller	30
Şekil 1.14. miRNA biyosentez süreci	33
Şekil 3.1. Farklı Biyotin formlarında miR-21 ekspresyonu	44
Şekil 3.2. Farklı Biyotin formlarının miR-107 ekspresyonu	45
Şekil 3.3. Farklı Biyotin formlarının miR-122 ekspresyonu	46
Şekil 3.4. miR-21, miR-107 ve miR-122 ekspresyonun gruplara göre ısı haritası	47
Şekil 3.5. Farklı Biyotin formlarının PI3K üzerine etkileri	48
Şekil 3.6. Farklı Biyotin formlarının AKT1 üzerine etkileri	49
Şekil 3.7. Farklı Biyotin formlarının Nrf2 üzerine etkileri	50
Şekil 3.8. Farklı Biyotin formlarının HO-1 üzerine etkileri	51
Şekil 3.9. Farklı Biyotin formlarının NF- κ B üzerine etkileri	52
Şekil 3.10. Farklı Biyotin formlarının Bax üzerine etkileri	53
Şekil 3.11. Farklı Biyotin formlarının Bcl-2 üzerine etkileri	54
Şekil 3.12. Farklı Biyotin formlarının kaspaz-3 üzerine etkileri	55

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. cDNA sentezi içeriği.....	38
Tablo 2.2. miRNA sekans ve genID	39
Tablo 2.3. Termal döngü protokolü	39
Tablo 2.4. miRNA reaksiyon miksi RT-PCR için stok şeklinde hazırlanması	40
Tablo 2.5. RT-PCR cihazının kurulması.....	40
Tablo 3.1. Hedef protein düzeyleri arasındaki ilişki	56



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
$\Delta\Delta Ct$	: Delta Delta Eşik Döngüsü
Fe^{2+}	: Ferröz
Ca^{2+}	: Kalsiyum
Mg^{2+}	: Magnezyum
K^+	: Potasyum

Kısaltmalar

ACC	: Asetil-CoA Karboksilaz
AMPK	: Aktive Olan Protein Kinaz
ARE	: Antioksidan Yanıt Elemanı
BBB	: Kan-beyin bariyeri
BIM	: bcl-2 Benzeri Protein 11
BVR	: Biliverdin Redüktaz
CIS	: Klinik İzole Sendrom
CO	: Karbon Monoksit
CUL3	: Cullin 3
DNA-PK	: DNA'ya Bağımlı Protein Kinaz
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FoxO1	: Forkhead Box O1
FPN1	: Ferroportin 1
GPCR	: G protein-bağı reseptörler
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz-3
GSK-3 β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 beta
HO-1	: Hemoksijenaz 1
HSP	: Isı Şoku Proteinlerini
IKK	: I κ B kinaz
IL-10	: İnterlökin 10
ILK	: İntegrin Bağlantılı Kinaz
IRS	: İnsülin Reseptör Substratı
JAK	: Janus kinaz
LPC	: lizolesitin
Maf	: Muskuloaponevrotik Fibrosarkom
Mg	: Magnezyum
MgB	: Magnezyum biyotinat
miRNA	: MikroRNA
MS	: Multiple Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MSIF	: Multiple Skleroz Uluslararası Federasyonu:
mTORC2	: Memeli Rapamisin Hedef Kompleksi 2
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2-ilşkili faktör

NF- κ B	: Nükleer Faktör kappa B
OXPHOS	: Anti-İnflamatuar Bağışıklık Hücrelerinde Oksidatif Fosforilasyonu
PDGF	: Trombosit Bağı Büyüme Faktörü
PDK1	: Fosfatidilinositole Bağımlı Protein Kinaz 1
PI3K/AKT	: Fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B
PP2A	: Protein Fosfataz 2 A
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RRMS	: Tekrarlayan ve Düzelen Multiple Skleroz
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SH3	: Src Homoloji 3
SPMS	: İkincil İlerleyici Multiple Skleroz
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
TCA	: Trikarboksilik Asit
TH17	: T yardımcı 17 hücreleri
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü α
VPS34	: Vakuolar Protein Sınıfı 34
β -TrCP	: β -Transdusin Tekrar İçeren Protein

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, spesifik fonksiyonel anatomik bölgelerdeki nöronların çeşitli alt gruplarını etkileyen heterojen klinik ve patolojik özelliklere sahip çok yönlü nörolojik bozukluklar dizisidir. Alzheimer, parkinson, multiple skleroz (MS), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve huntington gibi hastalıklar, işleyen nöronların ilerleyici veya seçici kaybı ile karakterize edilen bazı nörodejeneratif süreçlerin bir sonucudur [1]. MS; inflamasyon, demiyelinizasyon ve dejeneratif değişiklikler ile karakterize olan merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik bir inflamatuvar demiyelinizan hastalığıdır [2]. Genellikle genç yetişkinlik döneminde başlayan ve daha çok kadınlarda görülen MS, otoimmün inflamatuvar demiyelinizan merkezi sinir sistemi bozukluğu olarak da bilinmektedir [3]. MS vakalarında ilk demiyelinizan klinik atak %2 ila %5 arasında değişen bir dilimde ve 18 yaşından önce ortaya çıkabilmektedir [4]. Yetişkinlerde görülen MS ile karşılaştırıldığında, pediatrik başlangıçlı MS hastaları tipik olarak daha aktif bir inflamasyon seyrine sahiptir. Bu durum daha sık nöksler görülmesine neden olur, ancak uzun vadede zihinsel ve fiziksel sakatlık oluşumu daha yavaştır [5]. Kesin olarak patogenezi bilinmemekle birlikte, önde gelen teoriye göre bu durumun bağışıklık sistemindeki düzensizliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir [6]. Genler, cinsiyet, D vitamini eksikliği, bağırsak mikrobiyotası, Epstein-Barr viral enfeksiyonu, sigara ve obezite, hastalığın gelişimi üzerindeki en önemli risk faktörlerinden bazılarıdır [7]. MS hastalığının ilerlemesi sonucunda ise tedavi edilemeyen nöksler ve nörolojik arazlar ortaya çıkabilmektedir; bunun yanı sıra, MS hastalığının teşhisinin konulduğu bireylerin yaklaşık %10'unda başlangıçtan itibaren ilerleyen bir hastalık seyri bulunabildiği bildirilmiştir [8]. Çoğu MS hastasında, hastalık başlangıçta geri dönüşümlü nörolojik ataklar ile karakterizedir ve bunu zamanla ilerleyici nörolojik bozulmalar izlemektedir [9]. Eylül 2019 ile Mart 2020 arasında Multiple Skleroz Uluslararası Federasyonu (MSIF) tarafından derlenen MS Atlasına göre dünya çapında toplam 2,8 milyon insanın (100.000 nüfus başına 35.9) MS ile yaşadığı tahmin edilmektedir [10]. Bu epidemiyolojik veriler dünya nüfusunun %87'sini temsil eden 115 ülkeden toplanmıştır. MS hastalığının prevalansı dünyanın her bölgesinde artmaktadır 2013'te 75 ülkeden alınan verilere göre insidans oranı 2,1/100.000 kişi/yıl ve ortalama tanı yaşı 32 olarak rapor edilmiştir, özetle her 5 dakikada bir MS teşhisi konduğu tahmin edilmektedir [10]. MS için onaylanan ve uzun süreli tedavilerde kullanılan ilaçların, MS ataklarını azaltabildiği, ancak hastalığın ilerlemesini büyük ölçüde durduramadığı bilinmektedir. Bu nedenle nöroaksonal hasara bağlı olarak kalıcı fiziksel sakatlık meydana gelmeye devam etmektedir [11]. MS hastalığının patogenezi karmaşık bir yapıda olup tam olarak anlaşılmamaktadır, ancak hastalığın altında yatan enflamasyon ve nörodejenerasyon gibi başlıca faktörlerin patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir. Önceki sınıflandırma şeması ya altta yatan tekrarlayan yapıdaki inflamatuvar ya da ilerleyici yapıdaki nörodejeneratif hastalığın baskın olduğu farklı fenotiplerin varlığı fikrine

dayanmaktadır [12]. Bu sebeptendir ki yapılan araştırmalar, aksonal ve nöronal kaybın aslında hastalık sürecinin erken evrelerinde başladığını ve bunun bilişsel bozulma ve diğerk erken dönem sakatlıklarla sonuēlandığını göstermiştir [13]. Bilişsel bozukluk, MS hastalarını etkileyen ve sık görülen komplikasyonlardan biridir [7]. MS hastalarında, hastalığın ilerlemesi sonucu oluşan bilişsel bozukluk yaklaşık olarak hastaların % 42-73'ünü olumsuz etkilemektedir ve hastalığın erken evrelerinde dahi ortaya çıkabilmektedir. Bilişsel açığı olan MS hastalarının % 40'ından fazlasında bellek bozuklukları bulunmaktadır [14]. Bilişsel işlev bozukluğunun ortak etkileri arasında; dikkat dağınıklığı, bilgi işleme ve yürüme işlevlerinde aksaklık, uzun süreli bellek ve görsel öğrenme zorlukları gibi problemler gözlenmektedir. Hastaların hepsinde sinirler zarar görmekte ancak ortaya çıkan belirtiler, bireysel farklılıktan dolayı her kişide farklı olarak seyretmektedir [15].

Multiple Sklerozdaki biyobelirteçler, erken teşhis ve önleyici tedaviyi kolaylaştırarak, hastalık riski taşıyan kişileri tararken teşhiste önemli bir rol oynayabilmektedir [1]. Kan-beyin bariyeri (BBB), yabancı maddelerin (ilaçlar dâhil) beyne girmesine karşı büyük direnç gösterdiğinden, beyne ilaç verilmesinde büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Sağlıklı bireylerde bu bariyer, beyin için koruyucu olup, kanda bulunan zararlı maddelerin beyne ulaşmasını engellerken, küçük moleküllerin difüzyon yoluyla beyne geçişini sağlamaktadır. Bununla birlikte, akut iskemik inme ve intraserebral kanama dâhil olmak üzere serebrovasküler hastalıklar ve MS, Alzheimer, Parkinson ve kanserler dâhil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklarla karakterize hastalıklarda, BBB bozulmaktadır [16]. MS hastaları için mevcut ilaç donanımındaki en önemli terapötik eksiklik, hastalığın ilerleyen fazları için etkili bir tedavinin olmamasıdır [17]. Hastalığı modifiye edici ilaçlar, hastalığın şiddetini azaltabilse de, hastalık giderek kötüleşmeye devam edebilmektedir. Hem genetik hem de çevresel faktörlerin hastalık gelişimine katkıda bulunduğu ortaya konulmasına rağmen, kesin mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir [18]. D vitamininin immünomodülatör yeteneği geniş çapta ortaya konmuş olsa da, eksikliğinin MS ile olan ilişkisi sıklıkla tartışılan bir dış faktördür [19]. MS'de D vitamini alımının faydalı bir etkisi olduğunu öne süren çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, takviyenin terapötik olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusu hala belirsizdir [20].

Vitaminler, normal fizyolojik işlev için gerekli olan ancak vücut tarafından endojen olarak sentezlenmeyen ve bu nedenle diyetle birlikte düşük oranda alınması gereken bir grup organik bileşiklerdir [21]. Toplamda, insanlara 13 farklı vitamin gerekmekte olup, bunların dördü yağda çözünen vitaminler (A, D, E, K), dokuzu ise suda çözünen vitaminler [C vitamini ve sekiz tür B vitamini (tiamin, riboflavin, niasin, pantotenik asit, piridoksin, folat, biyotin ve kobalamin)]'den oluşmaktadır [21]. B grubu vitaminleri; beyin gelişimi, onarımı ve işleyişinde hayati rollere sahip olup, eksikliğinde ciddi şekilde artan psikolojik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir [22]. B grubu vitaminlerin çoklu etkileri arasında; enerji üretiminin artışına yardımcı oluşu, DNA/RNA sentezi

veya onarımı, genomik ve genomik olmayan metilasyon ve çok sayıda nörokimyasal ve sinyal molekülünün sentezi gibi beyin fonksiyonunun çeşitli yönlerindeki özelliklere olan tesiridir. Bununla birlikte, insan epidemiyolojik ve kontrollü deney araştırmaları sürecinde ortaya çıkan bilimsel yorumlar, yalnızca küçük vitamin alt gruplarına odaklanmıştır. Bunlar homosistein metabolizmasında yer alan en belirgin ancak özel olmayan B vitaminleridir [21]. B-kompleks vitamini olan biyotin, MS'li hastaların beyin omurilik sıvısında azalmaktadır [23] ve yüksek dozlarda biyotin ilerleyici MS hastalarının çok az bir kısmında, bozulan fonksiyon kaybını yavaşlattığını ortaya koymaktadır [24].

Bazı makro elementler, MS ile ilişkili farklı patofizyolojik mekanizmalarda yer almaktadır [25]. Sadece miyelin sentezi ve stabilitesi için değil, aynı zamanda MSS' nin normal çalışmasında da gereklidirler [26]. Ayrıca sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini azaltarak sinir sistemi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan magnezyum (Mg), otonom ganglionların inhibitör etkisini artırmakta ve uyarıcı etkisini azaltabilmektedir [27]. Mg eksikliği, MS etiyojisinde rol oynaması muhtemel olan lenfositlerde veya sinir hücrelerinde işlev bozukluğuna neden olmaktadır [28]. Magnezyum biyotinat (MgB), d-Biyotin'den 40 kat daha fazla çözünür olan yeni bir biyotin tuzudur. Klinik öncesi modeller, MgB'nin, d-Biyotine kıyasla dokuda üstün absorpsiyona ve daha fazla alıma sahip olan biyoyararlanımı yüksek bir biyotin formu olduğunu göstermiştir [29].

Fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/Akt) sinyal yolunun MSS' de önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır [30]. PI3K/Akt sinyal yolu, sinyal iletimini ve hücre proliferasyonunu, apoptoz ve metabolizma gibi biyolojik süreçleri düzenlemektedir. Bazı doğal ürünlerin PI3K/Akt yolunu aktive ederek nöroprotektif bir rol oynayabileceği ve potansiyel terapötik ilaçların keşfi için etkili bir kaynak sağlayabileceğini göstermektedir [31].

Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (Nrf2) ve transkripsiyon faktörü/Hemoksijenaz 1 (HO-1), beyindeki temel sitoprotektif yanıtların birincil düzenleyicisidirler. Anti-oksidan, anti-inflamatuar ve detoksifiye edici proteinleri kodlayan çeşitli nöro-koruyucu genlerin ekspresyonunu aktive eder. Down regülasyon (aşağı regülasyon), bir hücrenin, bir dış uyarana yanıt olarak RNA veya protein gibi hücrel bir bileşenin miktarını azaltma süreci olarak tanımlanmakta, bu tür bileşenlerin artışı içeren tamamlayıcı süreç ise up-regülasyon (yukarı regülasyon) olarak adlandırılmaktadır. Nrf2/HO-1 anti-oksidan sinyalizasyonunun aşağı regülasyonu, öncelikle MS ve diğer nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinden sorumludur. Nitekim MS benzeri nörokomplikasyonlarla ilişkili oksidatif stres, nöroinflamasyon, immün düzensizlik, oligodendrosit kaybı ve demiyelinizasyonu önemli ölçüde artırmaktadır [32].

Transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B), inflamasyon ve hücre canlılığının düzenlenmesi yoluyla inflamatuvar hastalıklarda önemli roller oynamaktadır. NF- κ B'nin MS hastalarının MSS'nde T hücreleri, mikroglia/makrofajlar, astrositler, oligodendrositler ve nöronlar dâhil olmak üzere birçok hücre tipinde aktive olduğu gösterilmektedir [33]. Bazı deneysel

otoimmün ensefalomyelit çalışmalarından elde edilen veriler, bu bireysel hücre tiplerinde NF- κ B aktivasyonunun MS gelişimi üzerinde belirgin etkileri olduğunu öne sürmektedir [33]. Nöronlarda NF- κ B aktivasyonunun, nöronların morfolojisini ve plastisitesini düzenlemesinin yanı sıra öğrenme ve hafıza ile ilgili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [34,35].

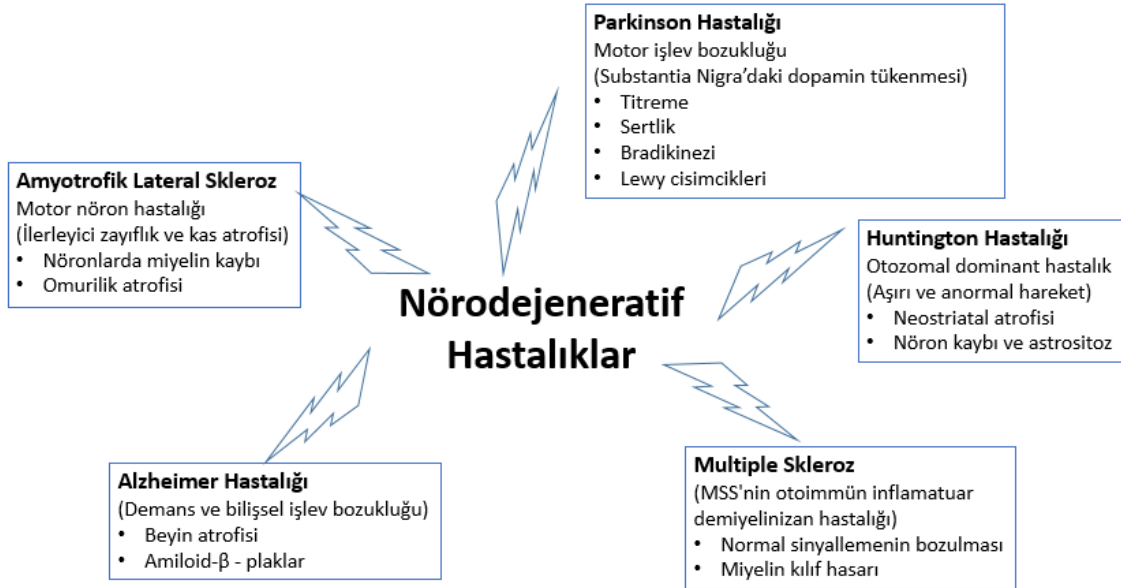
Apoptoz, çeşitli biyolojik olaylarda yer alan hücrelerin seçici olarak elimine edilmesi için gerekli bir fizyolojik süreçtir. Apoptotik hücre ölümünde rol oynayan Bcl proteinleri ve kaspazlar bir sistein proteaz sınıfına aittir [36]. Bcl-2 ailesi, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde yer alan, anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşan en iyi karakterize edilmiş protein ailesidir. Bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2, gelişmekte olan beyindeki nöron ölümünü bloke edebilen 25 kDa membrana bağlı bir protein iken, Bax proteini ise, Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturarak ve onun anti-apoptotik etkilerini bloke ederek hücre ölümünü destekleyen 21 kDa'lık bir proteindir [37]. Kaspazlar normalde birçok memeli hücresinde aktif olmayan öncüller olarak ifade edilmektedir ve aktif hale gelmesi için proteinin parçalanması gerekmektedir. Aktif kaspazlar, ölmekte olan bir hücreden kromozomal DNA'nın ayrılması ve elimine edilen parçalara ayrılma sürecini başlatmaktadır [38]. Tanımlanan kaspazlar arasında özellikle kaspaz-3, sinir sistemi gelişimi sırasında ve belirli patolojik koşullar altında nöronal ölümün güçlü bir efektörüdür [39].

MikroRNA'lar (miRNA), temel olarak transkripsiyon ve translasyonun inhibisyonu yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan kodlanmayan kısa tek iplikli moleküllerden oluşmaktadır. miRNA'lar çekirdekdeki anahtar düzenleyici moleküller olarak vücutta çeşitli hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptoza katılmasına etkilidirler. Bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda, miRNA'ların, esas olarak glial hücreleri ve periferik bağışıklık hücrelerini etkileyen MS patogenezinde yer aldığı bulunmuştur [40]. MS etiyolojisinde miR-21'in gen düzenlemesindeki rolüne ilişkin önceki bulgulara dayanarak, MS'de miR-21 aday biyobelirteç olarak seçilmiştir [41].

Bu tez çalışmasında, farklı biyotin formlarının, sıçanların beyin dokularında deneysel olarak hipokampus lokal demiyelinizasyonu ile oluşturulan Multiple Skleroz modeli üzerindeki moleküler mekanizmalarda; miR-21, miR-107 ve miR-122 ile PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkilerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

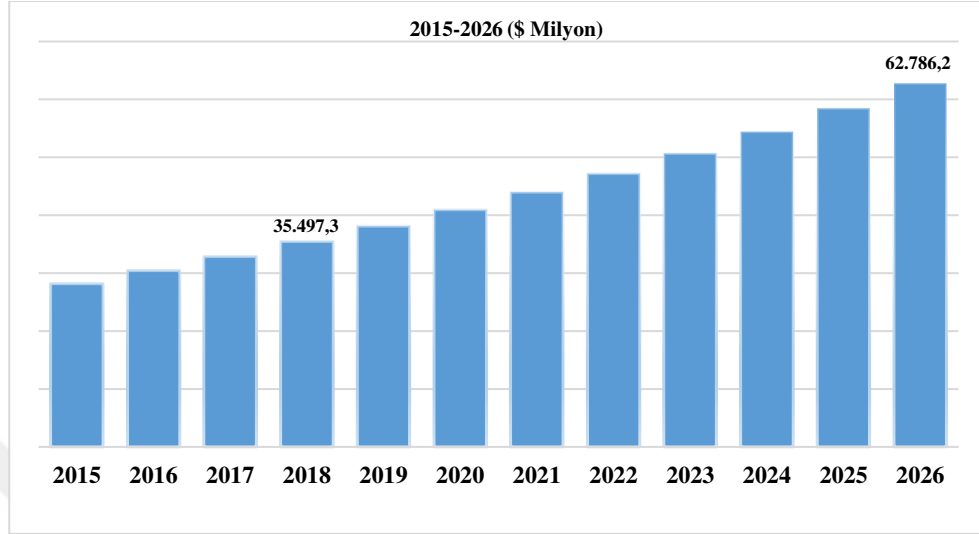
Merkezi sinir sistemindeki nöron kaybı sonucunda ilerleyici işlev bozukluğu olarak bilinen nörodejenerasyon, bilişsel ve motor işlev bozukluğunun da başlıca nedenidir [42]. Nöronal hasar, alzheimer, parkinson, amiyotrofik lateral skleroz, huntington, spinoserebellar ataksi ve MS hastalıklarının patolojik bir özelliğidir, ancak bu tür hasarlar nörotropik viral enfeksiyonlar, felç, genetik beyaz cevher hastalıkları ve paraneoplastik bozuklukların ardından da gözlemlenmektedir [43]. Mikroglia'nın kontrolsüz veya anormal aktivasyonu, proinflatuar maddelerin aşırı üretimi yoluyla alzheimer, septik şok, parkinson ve MS hastalığı dâhil olmak üzere ciddi nöronal bozukluklara neden olabilir. Bu koşullar, nöronal hasarı ve ardından nöronların ilerleyici ölümüyle sonuçlanan inflamasyonu başlatan oksidatif strese yol açan reaktif azot türlerini (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) biriktirir. Nörodejenerasyon, bu nedenle nöronlarda hem yapı hem de fonksiyon kaybı olarak bilinmektedir. Çok sayıdaki nörodejeneratif hastalık, nöronların hasar görmesi ile ilişkilendirilmiştir. [44]. Aşağıdaki Şekil 1.1'de yaygın nörodejeneratif bozuklukların şematik görünümü verilmiştir.



Şekil 1.1. Yaygın nörodejeneratif bozuklukların şematik görünümü

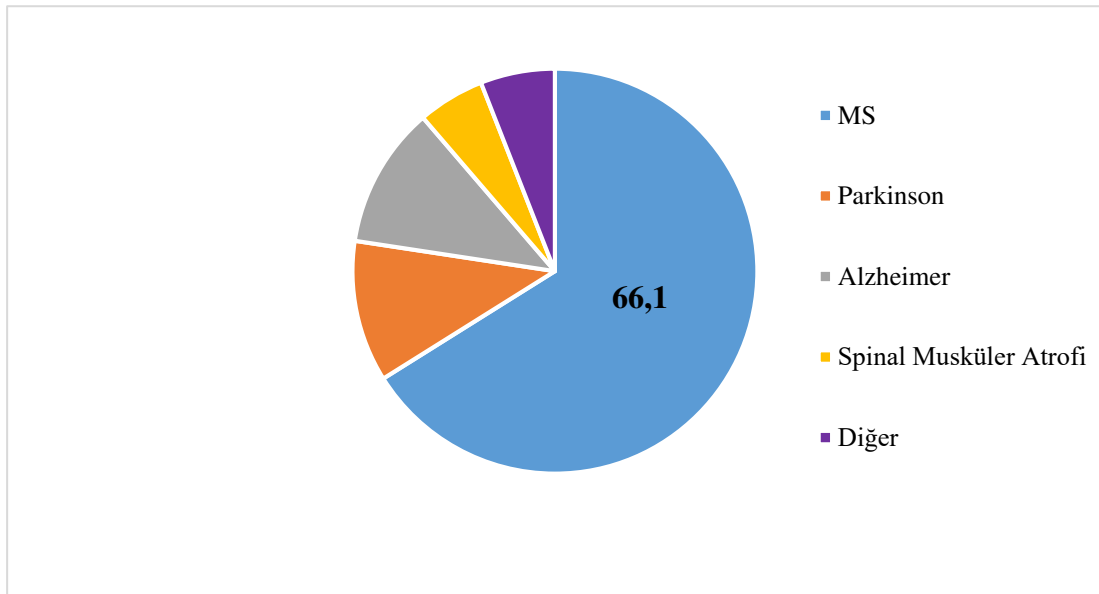
Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanan demans demografisi, nörodejeneratif hastalıkların 2030'da 70 milyonun üzerine ve 2050'de ise 106 milyon civarına ulaşacağını öngörmektedir [42]. Fortune Business Insights araştırma şirketinin 2018 yılında yaptığı araştırmaya göre; 35 milyon dolar değerinde olan küresel nörodejeneratif hastalıklar ilaç pazarı büyüklüğünün, %7.2'lik yıllık artış sergileyerek, 2026 yılı sonunda 62 milyon dolar civarına ulaşması

öngörülmektedir. Aşağıdaki Şekil 1.2’de küresel nörodejeneratif hastalıklar ilaç pazarı büyüklüğü verilmiştir [45].



Şekil 1.2. Küresel nörodejeneratif hastalıklar ilaç pazarı büyüklüğü

Nörodejeneratif hastalıklar arasında, MS hastalığının 2018'de %61 ile en büyük pazar payına sahip olduğu görülmektedir. Hastalığın, tahmin yapılan dönem boyunca da piyasaya hâkim olacağı öngörülmektedir. MS hastalığının pazar büyüklüğündeki başlıca nedenler arasında; ilaçların yüksek fiyatlı olması, hükümetler tarafından teşvik edilmesi, yeni ürünlerin geliştirilmesi ve uzun süreli ilaca bağımlılık gelmektedir. Aşağıdaki Şekil 1.3’de hastalık göstergesine göre küresel nörodejeneratif hastalıklar pazar payı temsili olarak şekli yer almaktadır [45].



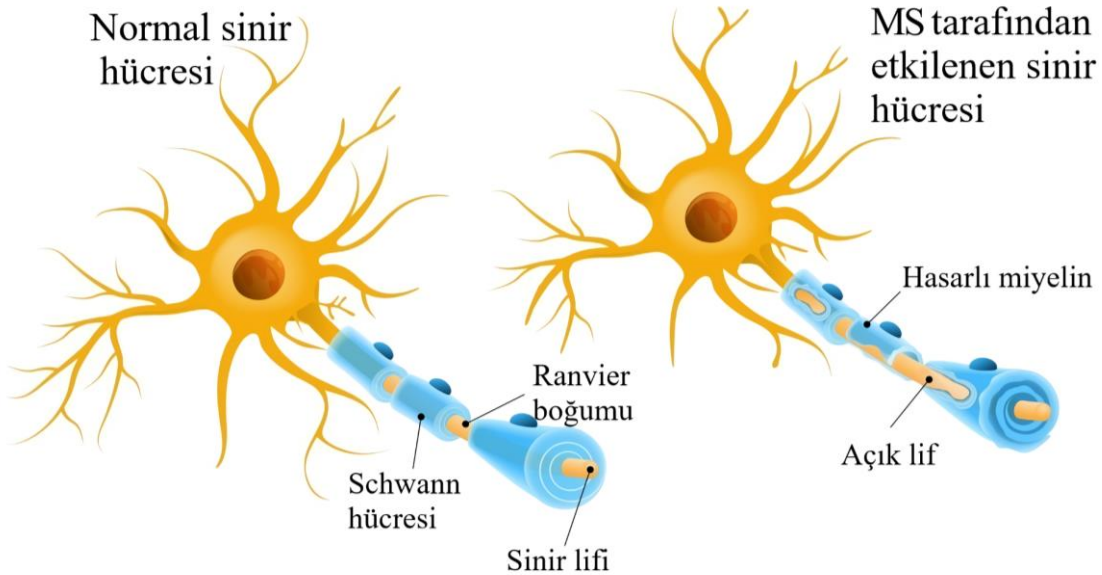
Şekil 1.3. Hastalık göstergesine göre küresel nörodejeneratif hastalıklar pazar payı

Günümüzde nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde kullanılan ilaçlar, öncelikle nörotransmitter salınımının modülasyonu yoluyla nöronal fizyolojiyi düzenleyerek veya nöronal reseptörleri kontrol ederek etkilerini göstermektedirler [46].

1.2. Multiple Skleroz

Multiple Skleroz, vücudun kendi bağışıklık sistemi aracılığı ile beyin ve omurilikteki dokuları yok ettiği, tedavisi olmayan kronik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [47]. Nörodejeneratif olaylar ve otoimmün hastalıklar ile karakterize inflamatuvar bir hastalık olan MS, MSS üzerinde farklı derecelerde tekrarlayan veya ilerleyici nörolojik bozukluklarda miyeline karşı saldırırlar [48]. Sinir hücrelerini çevreleyen miyelin kılıfın otoimmün demiyelinizan sonucu hasar görmesiyle meydana gelen MS'de, ağrı ve yorgunluk semptomları ile birlikte duyuşal, motor ve bilişsel işlev bozuklukları karakterizedir [49].

Hastalığın ilk bilimsel tanımı, 1868'de Charcot tarafından yapılmıştır ve dünya çapındaki doktorlar, MS hastalığını, sonrasındaki birkaç on yıl içinde kademeli olarak farklılaşan ve çok yönlü bir hastalık olarak kabul etmişlerdir [50]. Yirminci yüzyılın başlarında kontrast maddelerin keşfinden sonra, şimdi plak patolojisi olarak tanımlanan, beyindeki kan damarlarının etrafındaki iltihaplanma ve miyelin hasarı olarak tanımlanmıştır [51]. Aşağıda verilen Şekil 1.4'de sağlıklı sinir hücresi ve multiple skleroz hastası sinir hücrelerinin temsili olarak şekli yer almaktadır [52].

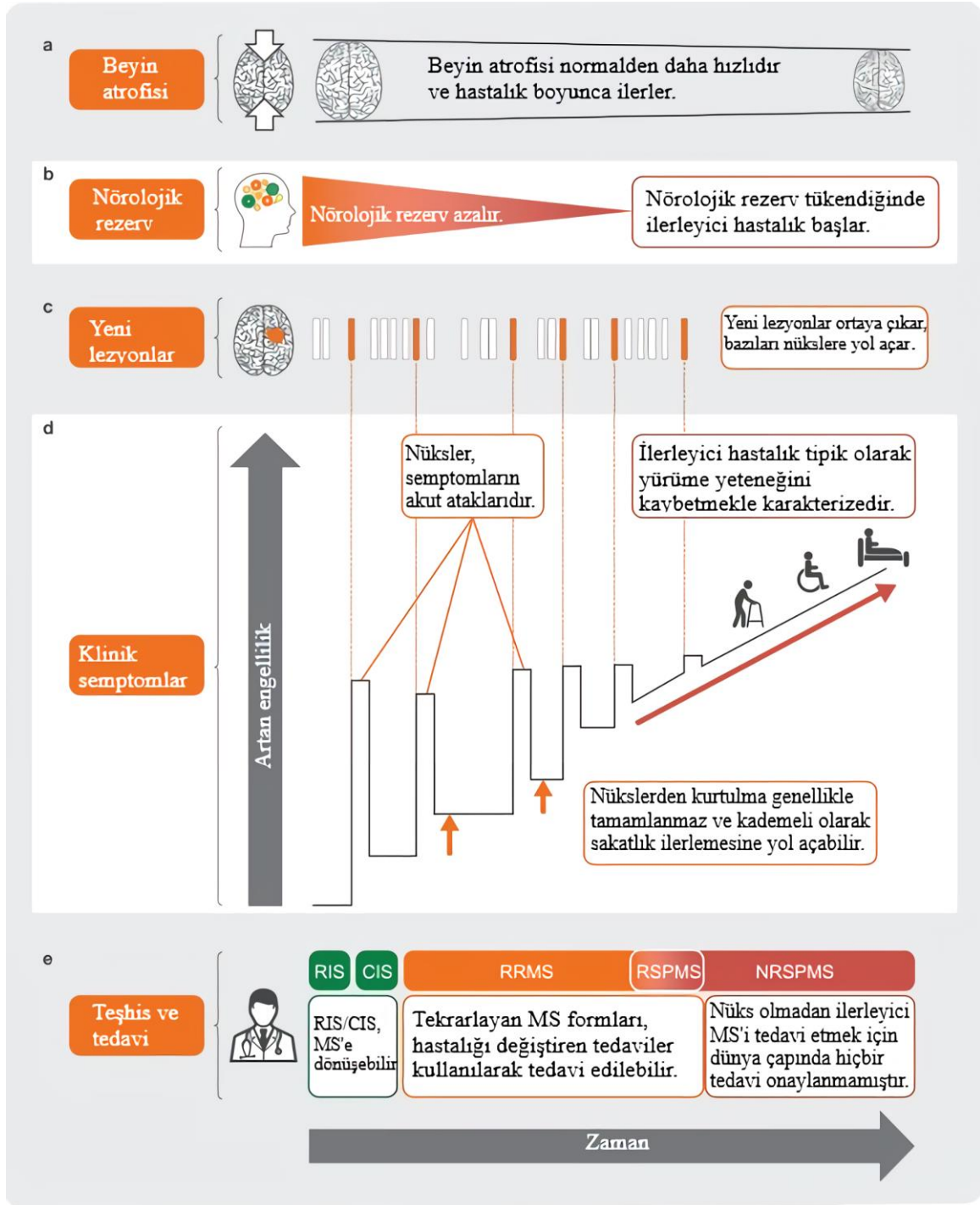


Şekil 1.4. Sağlıklı sinir hücresi ve multiple skleroz hastası sinir hücresi

Multiple Skleroz, tipik olarak genç yetişkinlik döneminin ilk yıllarını etkileyen, fiziksel ve zihinsel engellere neden olan, geri dönüşü olmayan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Birçok

gelişmiş ülkede genç ve orta yaşlı insanlar arasında travmatik olmayan fiziksel ve zihinsel engelliliğin önde gelen nedenidir [47]. Multiple Sklerozda üç ana klinik seyir bulunmaktadır: i) Akut tekrarlayan atakları takiben değişken derecede iyileşmeden oluşan tekrarlayan-düzelen MS (RRMS). ii) Başlangıçtaki tekrarlayan-düzeltlen bir seyir izleyen ve geri dönüşü olmayan bir ilerleme ve ciddi sakatlık birikimi ile karakterize olan ikincil ilerleyici MS (SPMS). iii) Hastalığın başlangıcından itibaren kesintisiz bir ilerleme ile karakterize olan, birincil ilerleyici MS (PPMS). MS, tüm yaş gruplarında felç veya omurilik yaralanmasının ardından üçüncü sıradaki sakatlık nedenidir ve 18-64 yaşları arasında tekerlekli sandalye kullanımının en yaygın sebeplerinden biridir [47]. Ortalama tanı yaşı 32'dir (20-40) ve kadınların MS'e yakalanma olasılığı erkeklere göre iki kattan daha fazla olarak bildirilmektedir [53]. MS hastalarında beyin nöronlarında miyelin kaybı, aksonal transeksiyonlar, nöron kaybı, mikroglial aktivasyon ve oligodendrosit kaybı gözlenmektedir. Efektör hücrelerin post-kılcal venüllerden göç ederek beyne sızması hastalığın ayırt edici özelliği olan plakları oluşturmaktadır. Enflamasyon veya daha az anlaşılan diğer faktörler tarafından tetiklenen nöronları ve aksonları etkileyen dejeneratif bir süreç, doğrudan enflamatuvar hücrelerin neden olduğu demiyelinizasyon ve aksonal kayıp birikimi ile birlikte sakatlığın daha da ilerlemesini sağlamaktadır. Bu hasar görme durumu; yürüme, denge, üst ekstremité işlevi ve bilişsel gerilemeyi etkileyen engelliliğe neden olmaktadır. Bütün MS semptomları arasında bilişsel bozukluk en çok engelleyici olan faktörlerden biridir [7]. MS'in patolojik özellikleri arasında demiyelinizasyon, gliosis ve nöroaksonal dejenerasyon yer alır. Bunlar, risk altındaki kan-beyin bariyeri (BBB) bağışıklık hücresi infiltrasyonundan ve MSS iltihaplanmalarından kaynaklanır. Homeostazın kaybı ve glial hücrelerin aktivasyonu, demiyelinizasyon ve nöronal/aksonal hasarın ilerlemesinde önemli roller oynar. Glial hücreler arasındaki etkileşimler, özellikle oligodendrosit progenitör hücreler ve oligodendrositler üzerindeki etkileri, demiyelinizasyon-remiyelinizasyon sürecini karmaşık yanıtlar ve sinyaller dizisi ile etkiler [54]. Genler, cinsiyet, D vitamini eksikliği, bağırsak mikrobiyotası, Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu, sigara ve obezite, hastalığın gelişiminde en iyi anlaşılan risk faktörlerinden bazılarıdır [7]. MS, MSS iltihabı, demiyelinizasyon, gliosis ve aksonal hasar ile karakterize kronik inflamatuvar ve nörodejeneratif bir hastalık olmasından dolayı en sık görülen semptomlar; yürüme bozukluğu ve ataksi, koordinasyon kaybı, hiperrefleksi, spastisite, görme bozukluğu, duyu kaybı, üriner semptomlar, yorgunluk ve bilişsel bozulma ile birlikte motor engelliliktir [55]. MS gelişiminin ana etyopatogenetik etkisi; T ve B lenfositlerinin nöronların miyelinlerini yok ettiği anormal bir otoimmün yanıtı tanınmasıdır [56]. Bu ayrıca MSS'de inflamatuvar lezyonlara neden olmakta ve oligodendroglia kaybına ve aksonal dejenerasyona da yol açmaktadır [57]. MS hastaları, diğer hücrelerin yanı sıra dendritik hücreleri, T hücrelerini ve bunların etkileşimini etkileyen doğuştan gelen ve adaptif bir immün yanıt düzensizliği sergilemektedir [53].

Multiple Sklerozda bağışıklık sistemi, MSS üyeleri olan beyin, omurilik ve optik sinir dokularına toplu bir şekilde saldırmakta ve hasar vermektedir. Beyin görüntülenmesi veya ölüm sonrası muayenede görülebilen lezyonlara (akut yaralanma bölgeleri) ve gözlemlenmesi daha zor olan hasarlara neden olmaktadır [58]. Onarım mekanizmaları MSS'de çalışsa da genellikle yetersiz kalmakta ve bazı sinir dokuları geri döndürülemez bir şekilde tahrip olarak MS'den etkilenmeyen kişilere göre beyin daha hızlı bir şekilde atrofiye uğramaktadır [59–61], (Şekil 5a). Beyinde sınırlı bir kapasitede nörolojik rezervin olduğu düşünülmektedir. Bu rezerv sinir hücreleri ve sinir liflerinin kaybı ile atrofisini telafi ederek işlevini sürdürmektedir. Bu işlem kısmen hasarsız alanlar üzerinden sinyalleri yeniden yönlendirerek veya hasarsız alanlara yeni işlevler üstlenecek şekilde uyarlanarak yapılmaktadır [62,63]. MSS'deki fiziksel hasarı azaltmak için mevcut mekanizmalara ek olarak çalışan nörolojik rezerv ve onarım mekanizmaları; MS ile ilişkili beyin hasarındaki hastalığın erken evrede neden fark edilemediğini ve dolayısıyla MS'in neden uzun süre teşhis ve tedavi edilemediğini açıklamaktadır. MS'te klinik semptomların görülmesinin daha öncesinde, insanların önemli bir kısmında bilişsel bozulmanın mevcut olduğuna dair kanıtların olduğu savunulmaktadır [64], (Şekil 5b). Genellikle, klinik semptomlar görülmeye başladığında, MSS'deki hasar veya hasarlar ilk olarak tespit edilmektedir. Çoğu lezyon bulunduğu yere göre doğrudan ataklara yol açmasa da (~%90), sinir fonksiyonunu belirgin şekilde bozan bir yerde bir lezyon geliştiği takdirde semptomlar bir atak (nüks veya nöbet) şeklinde kendisini göstermektedir [65, 66], (Şekil 5c ve d). Beyin lezyonları olan ama bu süreçte herhangi bir klinik semptomu olmayan kişilere radyolojik izole sendromlu (RIS) denilmektedir. RIS'li hastaların yaklaşık üçte biri, 5 yıl içinde en az bir klinik semptom atağı yaşamaktadır [67]. Semptomların ilk atağı, klinik izole sendrom (CIS) olarak bilinir. CIS'li birçok kişide (yaklaşık %30-70), başlangıçta hastalığın tanı kriterlerini karşılamasa bile MS hastalığı gelişecektir [68]. MS hastalığı olan kişilerin yaklaşık %80-90'ı başlangıçta tekrarlayan ve düzelen MS formuna (RRMS) sahiptir [66, 69]. RRMS'li hastalar akut (ani) semptom atakları yaşamaktadır. Genellikle, semptom şiddetinin stabil hale gelmesinden birkaç gün önce bir atak gelişir ve takip eden birkaç hafta veya ay içinde atak şiddeti hafifleyerek geçer [70], (Şekil 5d ve e). Nörolojik rezerv ve onarım mekanizmaları tükendiği takdirde artık hasar telafi edilemez duruma gelerek, ikincil ilerleyici MS (SPMS) adı verilen ilerleyici bir sakatlık aşaması başlar [71]. SPMS aşamasında ataklar olsun veya olmasın özellikle yeteneğini indirgeyen sakatlık durumları giderek kötüleşmektedir [66,72,73]. Tipik olarak, tekrarlamaların meydana geldiği (tekrarlayan SPMS, RSPMS) bir çakışma aşaması vardır, ardından tekrarlamadan ilerleme (tekrar etmeyen SPMS, NRSPMS) aşamasına geçilmektedir (Şekil 5d ve e). RRMS'li hastalar tedavi edilmediği takdirde, %50-60'ında SPMS aşaması 15-20 yıl içinde gelişmektedir ve hastaların yardım almadan 100 metre kadar yürüyememe durumuna gelmesi ortalama olarak sadece 14 yıl kadar sürmektedir [74]. Aşağıdaki Şekil 1.5'te MS hastalığının neden olduğu hasar tipleri sembolik olarak resmedilmiştir [47].



Şekil 1.5. Multiple Sklerozun neden olduğu hasar tipleri

Dünya çapında 2,5 milyon üzerindeki insan, MS ile yaşamaktadır [54]. MS hastalığının prevalansı Asya ve Afrika'dakilere göre Kuzey Avrupa, Amerika ve Güney Avustralya'da daha yüksektir ve bu oran Asya ve Afrika'da, düşük olsada dünyanın diğer bölgelerinde MS prevalansında bir artış bulunmaktadır. Prevalanstaki varyasyonun çeşitli coğrafi, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir [75]. MS hastalığının oluşumu coğrafi olarak enlemlere göre değişmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da hastalık prevalansı 140/100.000 ila

108/100.000 iken, Sahra altı Afrika ve Doğu Asya'da bu oranlar 2.1/100.000 ila 2.2/100.000'e düşmektedir. Aynı prevalans kayıtlarında en yüksek oran 189/100.000 ile İsveç'te bulunurken, Arnavutluk'ta 22/100.000'dir. MS, iklimin ılıman ve gelir oranlarının yüksek olduğu kuzey yarımkürede en yüksek prevalans ve insidans oranları ile dünya genelinde dikkat çekici derecede eşit olmayan bir dağılıma sahiptir. Buna karşılık, ekvator ve tropik ülkelerde, özellikle düşük gelir oranlarına sahip olanlar arasında MS yaygın değildir. Ek olarak, çevresel etkiler bağlamında, MS hastalığı prevalansındaki değişikliğin, endüstriyel gelişmeden sonra nüfusun kırsal alanlardan kentsel alanlara kaymasıyla ilişkili olabileceği de düşünülmektedir [76].

Yetişkin MS dağılımına kıyasla, pediatrik başlangıçlı MS insidansı ve prevalansında önemli coğrafi heterojeniteye sahip olduğu bildirilmektedir. En güncel olan MS Atlası'na göre, şu anda MS ile yaşayan en az 30.000 çocuğun olduğu tahmin edilmektedir [77]. Pediatrik başlangıçlı MS (POMS) hastaları nispeten daha yavaş fiziksel sakatlık ilerlemesine sahip olsa da, erken ve sık görülen nöroinflamatuvar ataklar, yetişkin başlangıçlı MS (AOMS) hastaları veya MS olmayan akranlarıyla karşılaştırıldığında, beyin gelişiminde bozulma ve bilişsel performansta düşüş ile sonuçlanabilir [78]. Bu bozuklukların, yükseköğrenime devam etme olasılığının azalması, daha düşük yıllık kazanç, çalışma hayatı boyunca sık görülen hastalık günleri ve maluliyet emeklilik programlarına erken kayıt olma gibi uzun vadeli sonuçları olabilir [79]. Bu nedenle, erken tanıya yönelik çabalar, uzun vadeli sonuçların öncelikli tanı koyucularının keşfedilmesi ve uygun erken ilaç müdahalesi büyük ölçüde önemli olarak görülmektedir [5].

1.3. Magnezyum

Magnezyum (Mg), memeli hücrelerinde potasyumdan sonra en bol bulunan ikinci katyondur ve enzimatik reaksiyonlar, iyon kanalı fonksiyonları, metabolik döngüler, RNA, DNA ve proteinler gibi biyomoleküllerin stabilitesi, hücresel iletişim de dâhil olmak üzere çok sayıda hücresel süreç için gereklidir [80, 81]. Mg^{2+} sistemik ve hücresel seviyelerde düzenleyici bir katyon görevi görmektedir ve vücuttaki hemen hemen tüm anabolik ve katabolik süreçlere katılmaktadır. ATP sentezi, karbonhidrat metabolizması, K^+ ve Ca^{2+} taşınması, hücre proliferasyonu ve membran stabilitesi dâhil olmak üzere 325'ten fazla enzim sistemini aktive ederek çok çeşitli hücresel olaylarda, biyokimyasal reaksiyonlarda ve fizyolojik fonksiyonlarda temel bir rol oynamaktadır [82,83]. Hücre içi Mg^{2+} homeostazı; enzimatik aktiviteler, kanal açıklıkları, DNA/RNA stabilitesi ve hücresel stresin kontrolü yoluyla hücre büyümesi, farklılaşması, enerji metabolizması ve hücre ölümü gibi fizyolojik olaylarla bağlantılıdır [84]. Bu nedenle Mg^{2+} konsantrasyonunun hücre tipine ve ortama göre optimal seviyelerde düzenlenmesi sadece normal fonksiyon ve gelişim için değil, aynı zamanda hastalıkların önlenmesi için de çok önemlidir. Mg^{2+} homeostazındaki dengesizlikler; kanser, diyabet, parkinson, alzheimer hastalığı ve demiyelinizasyon gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynamaktadır [85]. MSS'de hücre dışı sıvı, BBB ile kan dolaşımından

ayrılmaktadır. BBB, beyin kılcal damarları endotel hücreleri içermektedir ve hücre dışı sıvı homeostazının korunması için besinlerin ve elektrolitlerin geçişine izin vermektedir. Beyinde diğer organlardan farklı olarak nöronal ve glial hücreler 20 ila 50 nm uzaklıktadır ve hücre dışı boşluğun hacmi oldukça küçüktür [86]. Mg, sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini azaltarak sinir sistemi üzerinde önemli bir etki göstermektedir. Bunun yanısıra otonom gangliyonların inhibitör etkisini arttırmakta ve uyarıcı etkisini azaltmaktadır. Ayrıca, Mg^{+2} iyonları sinir uçlarındaki kalsiyum iyonları ile rekabet yoluyla aşırı uyarımı önlemektedir [87]. Kortikal yapıların mikrodolaşımındaki Mg^{2+} seviyesindeki bir azalma, mikrodamarlarda hızlı ve ilerleyici bir hasara neden olarak fokal kanamalara ve beyin ödeme yol açmaktadır [88].

1.4. Biotin

B vitaminleri, hücresel fizyolojik işleyişini her yönden destekleyen enzimatik süreçlerin önemli bir bölümünde koenzim olarak işlev görmektedirler. Bir koenzim olarak, vitaminin biyolojik aktif formu olan "apoenzim" içinde bağlanır ve bir "holoenzim" oluştururlar ve böylece ortaya çıkan enzimin katalize edebileceği reaksiyonların çeşitliliği açısından yeterliliğini arttırırlar [89]. Tiamin, riboflavin, niasin, pantotenik asit, B6, B7 (biyotin), folat ve B12 dâhil olmak üzere tüm B grubu vitaminleri diyet ile alınmaktadır. Optimum beyin işleyişi ve nörotransmitterlerin üretimi için gereklidirler [22]. Biotin suda çözünebilen bir B kompleks vitaminidir. Biotin eksikliğinin daha çok alopesi ve pullu eritematöz dermatit gibi deri semptomlarına neden olduğu da gösterilmiştir [29]. Biotin, hepatik glikoz alımının düzenlenmesi, glukoneogenez ve lipogenez, insülin reseptörü, transkripsiyon ve pankreatik β -hücresi fonksiyonu dâhil olmak üzere glikoz metabolizması ve hemostazında, önemli bir rol oynamaktadır [21]. B-kompleks vitamin grubundan olan biyotin, MS hastalarının beyin omurilik sıvısında azalmaktadır ve son çalışmalarda yüksek doz biyotinin ilerleyici evredeki MS hastalarının küçük bir yüzdesinde fonksiyon bozukluğunu iyileştirdiğini ileri sürmektedir [17]. Biotin, yağ asitleri biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan asetil-CoA karboksilazın (ACC) bir koenzimi olarak işlev gören önemli bir lipojenik vitamindir. Beynin yüksek lipid içeriği nedeniyle, biyotin eksikliği nörolojik bozukluklarla ciddi şekilde bağlantılıdır [90]. Biotinin aracı metabolizmadaki merkezi rolünden dolayı vücudun tüm dokuları tarafından biyotinin gerekli olduğu düşünülmekle birlikte, beyin kimyasında da özellikle önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Biotinin nöron işlevindeki hayati rolüne ilişkin diğer kanıtlar ise biyotin eksikliği ve doğuştan biyotin metabolizmasında bozukluk olan hastalarda nörolojik işlev bozukluğunun belirgin olduğunu göstermektedir [91]. Biotin, nadir nörolojik hastalıklardan olan biyotin-tiyamin duyarlı bazal ganglion hastalığının tedavisinde hayati bir role sahiptir [92]. Günde 300 mg biyotinin, aktif bir farmasötik ajan olarak kullanılabilir olduğu kabul edilmektedir [93].

1.5. Magnezyum Biotinat

Magnezyum biyotinatın (ağırlıkça) bileşimi; $Mg(C_{10}H_{15}N_2O_3S)_2$ moleküler formülüne sahip %93 D-biyotin, % 4.5 magnezyum ve % 2.5 sodyum klorürden oluşan bir moleküldür. Stabil, higroskopik olmayan, kirli beyaz bir toz olarak üretilmiştir. Yapılan toksisite çalışmasında 14 gün boyunca 2500 mg MgB/kg/gün'e kadar olan dozlarda, klinik belirti veya hayvan ölümü gözlenmemiştir. Ayrıca, ortalama vücut ağırlıklarında, günlük vücut ağırlığı artışında, gıda tüketiminde ve gıda verimliliğinde önemli değişiklikler de olmamıştır [94]. MgB, biyoyararlılığı yüksek iyi çözünür bir biyotin formu sağlayan yeni bir biyotin tuzudur. MgB'nin suda çözünürlüğünü D-biyotin ile karşılaştıran bir *in-vitro* deney, MgB'nin D-biyotinden 40 kat daha fazla çözünür olduğunu göstermiştir [94]. Ayrıca, klinik öncesi bir modelde, MgB'nin sıçanlara uygulanmasının, aynı miktarda D-biyotin uygulamalarına göre %47 daha yüksek serum seviyeleri ile sonuçlandığını göstermiştir [95]. Yakın zamanda gerçekleştirilen deneysel bir çalışmada sıçanlarda popiyonik asitle indüklenen deneysel otizim modelinde, MgB'nin oksidatif stres parametrelerini düşürürken antioksidan parametreleri artırarak beyin toksisitesini önlediği bildirilmiştir [96]. Dolayısıyla bu veriler MS hastalığına karşı Mg nin ya da biyotinin tek başına kullanılması yerine MgB formunda uygulanmasının daha etkili olabileceği fikrini desteklemektedirler [97].

Antik çağlardan beri, doğal ürünler hastalıklara karşı koruyucu veya iyileştirici ajanların kaynağı olmuştur. Yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için önemli bir güvenlik ve etkinlik yüküne sahip olan çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahiptirler [98, 99]. Doğal ürünler, oksidatif stres, iltihaplanma ve apoptoz yolları ve diğer birçok hücrel ve moleküler mekanizma dâhil olmak üzere farklı sinyal yollarını hedefleyerek çeşitli nörodejeneratif hastalıklar üzerinde faydalı etkiler gösterirler. Ayrıca mitokondriyal hasarları önleyerek ve serbest radikalleri nötralize ederek antioksidatif performansı arttırmak suretiyle inflamatuvar sitokin/kemokin salınımını aşağı regüle ederler [100, 101]. Bu sinyal zincirlerinden fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt yolu büyük önem taşımaktadır. Ayrıca daha önce çeşitli hastalıkların patolojik prosedüründe PI3K/Akt'ın kritik rol oynadığı gösterilmiştir [102, 103].

1.6. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Sinyal Yolağı

Fosfatidilinositol 3-kinaz / serin-treonin protein kinaz yolunun (PI3K/Akt) anormal aktivasyonu, kanser, diabetes mellitus, parkinson, alzheimer hastalıkları ve diğer nörolojik hastalıklar ile yakından ilişkilidir [103]. PI3K/Akt yolu, sırasıyla, reseptör tirozin kinazlar (RTK), büyüme reseptörleri, G protein-bağlı reseptörler (GPCR) ve Janus kinazın (JAK)/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) azalmasında kritik roller oynayan sitokinler dâhil olmak üzere akış yukarı etmenler tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca, Akt, nörodejeneratif

hastalıklarda kritik olarak glikojen sentaz kinaz 3 beta'yı (GSK-3 β) fosforile etmektedir. Bunun yanı sıra Akt nörodejeneratif bozukluklarla mücadelede inflamatuvar aracılığı (IL'ler, COX, NF- κ B), apoptotik yolları (örn., Bax/Bcl-2, kaspazlar) ve oksidatif faktörlerini (örn., ROS, Nrf2, SOD, CAT, HO-1) etkilemektedir. [102].

1.6.1. Fosfatidilinositol 3-Kinaz: Akış Yukarısındaki Anahtar Bileşen

Hücre içi lipid kinazların bir ailesi olan PI3K'lar, PI3K/Akt sinyal yolunun yukarısındaki anahtar elementlerdir. PI3K'lar yapılarına ve substrat seçiciliğine göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Hücre yüzeyi reseptörleri tarafından aktive edilen en genel olarak incelenen sınıf I izoformları, bir düzenleyici alt birimden (P85) ve bir katalitik alt birimden (P110) oluşan heterodimer yapıdadırlar. P85'in amino terminali, bir Src Homoloji 3 (SH3) alanı ve iki prolin açısından zengin bölge içerirken, bazal terminal, iki SH2 alanı ve P110 ile birleşen kodlamayan bir bölge içermektedir. Ayrıca, sınıf I izoformları, düzenleme modlarına göre sınıf IA (PI3K α , β ve δ) ve sınıf IB (PI3K γ) olarak ayrıca bölümlere ayrılmaktadır [104]. Sınıf IA, katalitik alt birimleri p110 α , β , δ ve düzenleyici alt birimler p85 α , β , γ 'den oluşmaktadır. Sınıf IB, düzenleyici izoformları p101 veya p87 ile birleştirilmiş bir p110 γ katalitik alt biriminden oluşur. İki kinaz arasındaki farklılıklar, aktivasyon yolundan kaynaklanmaktadır. PI3K α , β ve δ hücre dışı ligandlar enzim aktivitesi ile bir transmembran glikoprotein reseptörü tirozin kinaza (RTK) bağlandığında aktive edilirken, PI3K γ , G protein-bağlı reseptörler (GPCR'ler) ve Ras ailesi GTP enzimleri tarafından aktive edilmektedir [105]. Yapısal olarak membranlara bağlanabilen ve ek aktivasyon sinyalleri gerektiren PI3K α , β ve γ olmak üzere üç adet sınıf II izoformu bulunmaktadır. Sınıf III PI3K, vakuolar protein sınıfı 34 (VPS34), plazma zarından erken endozomlara zar trafiğinde önemlidir [106].

1.6.2. Serin/Treonin Protein Kinaz: Çekirdek Bölgesi

Bir serin/treonin kinaz olan protein kinaz B (PKB), PI3K'nın akış aşağısındaki en önemli efektör kinazlardan biri ve PI3K/Akt sinyal yolunun çekirdeği olarak kabul edilmektedir. Farklı genler tarafından, Akt'nin yüksek düzeyde homolog olan üç alt tipi kodlanır: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β ve Akt3/PKB γ . Her izoform, korunmuş bir N-terminal pleckstrin homoloji (PH) alanında bir merkezi parça ve bir C-terminal düzenleyici alan içermektedir [107]. Akt aktivasyonundaki membran translokasyonuna, PH alanı tarafından aracılık edilir ve Akt aktivitesi, mutasyon veya silinme nedeniyle zayıflar. Katalitik alanın yapısı, bir ATP bağlanma bölgesi ve Akt aktivasyonu için gerekli fosforilasyon bölgesi olan bir treonin kalıntısı Thr308'i (Akt1-Thr308, Akt2-Thr309, Akt3-Thr305) içermektedir. C-terminali düzenleyici alan, Akt'yi aktive etmek için gereken ikinci fosforilasyon bölgesi, yani Ser473 serin kalıntısını (Akt1-Ser473, Akt2-Ser474, Akt3-Ser472) içeren bir hidrofobik bölgeyi tutan 40 amino asitten oluşmaktadır. Üç Akt alt tipi

oldukça homolog olmasına rağmen, her biri benzersiz fizyolojik işlevler görmektedir. Akt1, esas olarak hücre büyümesi, proliferasyonu, anjiyogenez ve tümör hücresi invazivliği ile ilgili olarak vücudun tüm dokularında geniş bir şekilde dağılır [108]. Memeli iskelet kası ve yağ dokusunda bulunan Akt2'nin hücre büyümesi ile proliferasyonuna katıldığı ve glukoz homeostazına aracılık ettiği doğrulanmıştır [109]. Akt3 hakkında nispeten az şey bilinmektedir, beyin gelişimi ve malign glioma hücrelerinin hayatta kalması için çok önemlidir [110].

1.6.3. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Aktivasyonu

Fosfatidilinositol 3-kinaz / serin-treonin protein kinaz yolunun aktivasyonu, PI3K'nın RTK tarafından aktivasyonu ile başlamaktadır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit bağli büyüme faktörü (PDGF) gibi çok sayıda sitokin veya büyüme faktörü, hücre dışı ligandlar tarafından uyarılmaya yanıt olarak plazma membran reseptörü RTK'ye bağlanır, reseptör dimerizasyonunu ve hücre içi alanlarda tirozin kalıntılarının çapraz fosforilasyonunu indükler. Düzenleyici alt birim P85, SH2 alanı aracılığıyla aktive edilmiş reseptör üzerindeki fosforile edilmiş tirozin kalıntısına bağlanır. Katalitik alt birim p110 daha sonra tamamen aktif bir PI3K enzimi oluşturmak için toplanır. Ayrıca, P110 alt birimi, Ras-GTP gibi p85'ten bağımsız olarak, hatta insülin reseptör substratı (IRS) olarak diğer kohezif moleküller olarak toplanabilir. Ayrıca, Gα alt biriminin aktivasyonu, PI3K'da Src'ye bağli integrin sinyal iletimini aktive edebilir. PH alanı içeren Akt sinyal proteini Akt ve fosfatidilinositole bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) ile birleşerek, Fosfatidilinositol (4,5)-disfosfattan (PIP2) fosforile edilmiş ikinci haberci Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3) P110 tarafından sitoplazmadan hücre zarına inaktif Akt ve PDK1'i alır, böylece PDK1'in katalitik aktivite olmasını sağlar. Aynı zamanda, Akt yapısının konformasyonel değişimi, Thr308 ve Ser473'ün fosforilasyon bölgelerini açığa çıkararak, Thr308 kalıntılarının PDK1 tarafından fosforilasyonuna neden olmaktadır [109–111]. Karboksil terminalinde Ser473'teki ikinci fosforilasyon gerekmektedir ve bu ise memeli rapamisin hedef kompleksi 2 (mTORC2) tarafından gerçekleştirilir [112]. PDK-1, integrin bağlantılı kinaz (ILK) veya ILK ile ilgili kinazlar ve Akt'nin kendisi dâhil olmak üzere birçok başka kinazın Ser473'te Akt'yi fosforile ettiği bilinmektedir [113]. Ayrıca, DNA'ya bağımlı protein kinazlar (DNA-PK) dâhil olmak üzere PI3K ile ilişkili kinazlar ailesinin üyeleri de Ser473'te Akt'yi fosforile edebilir [114].

1.6.4. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Negatif Regülasyonu

Tümör baskılayıcı, fosfataz ve tensin homolog (PTEN), çift aktiviteye sahip çok özel bir fosfatazdır [115]. Akt'nin inaktivasyonuna, PI(3,4,5)P3'ün PI(4,5)P2'ye fosforilasyonu yoluyla lipid fosfataz PTEN ve PIP3'ten PIP2'ye dönüşüm nedeniyle Src homoloji alanı içeren inositol 5'-fosfataz 1 (SHIP1) aracılık eder. Negatif düzenleme ayrıca sırasıyla Ser473 ve Thr308'de Akt'yi

fosforile eden PH alanı ve lösin bakımından zengin tekrar protein fosfataz (PHLPP) ve protein fosfataz 2 A (PP2A) tarafından yapılır [116].

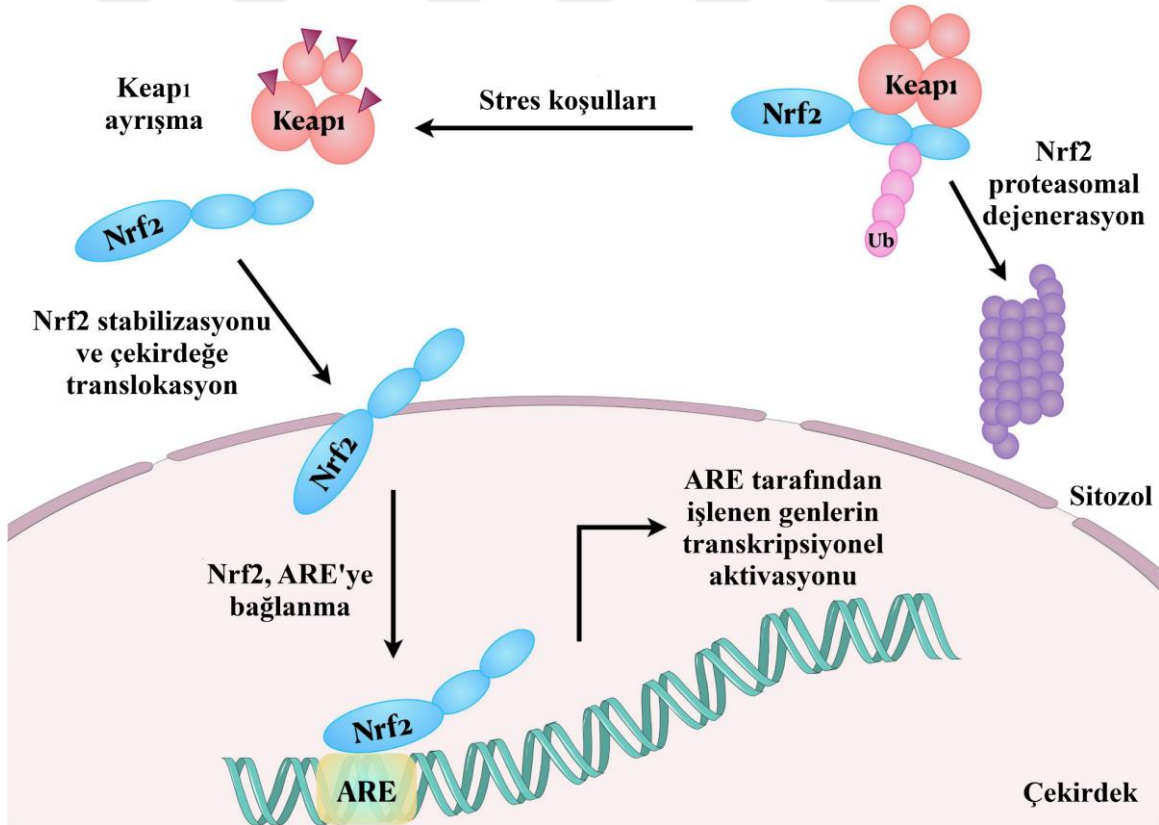
1.6.5. Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Serin-Treonin Protein Kinaz Aşağı Akış Düzenlemesi

Yukarı akış sinyali tarafından fosforile edildikten sonra, PI3K/Akt ile ilgili protein gibi bir dizi aşağı akış molekülü için diğerleri arasında FoxO ailesi üyeleri, GSK-3 β , mTOR ve aktin fosforile ederek veya kompleksler oluşturarak çeşitli biyolojik işlemler gerçekleştirir [117]. PI3K/Akt sinyal iletiminin ana akış aşağı hedefi ve hücre metabolizmasının önemli bir düzenleyici faktörü mTOR'dur. Akt, sikline bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27'yi fosforile ve inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini etkilemektedir. Akt aynı zamanda hücre ölümünün Bcl2-antagonisti (Bad), Bcl-2 benzeri protein 11 (BIM), kaspaz-9 ve FoxO1'i inhibe ederek apoptozu modüle etmektedir. Nükleer faktör eritrosit-2 ilişkili faktör (Nrf2), detoksifikasyon enzimi ve antioksidan enzim protein genlerinin transkripsiyonunu teşvik edebilen oksidatif stresin ana düzenleyicisidir. Bazı ilaçların PI3K/Akt/Nrf2 sinyalini aktive ettiği ve böylece bilişsel bozulmayı ve nörolojik disfonksiyonu azalttığı kanıtlanmıştır [118]. Kısacası PI3K/Akt yolu, hücre proliferasyonu, glikoz metabolizması, hücre hayatta kalması, hücre döngüsü, protein sentezi ile ilişkilendirilmiştir ve bazı aşağı akış moleküllerini düzenleyerek nöronal morfoloji ve plastisiteye katkı sağlamaktadır. Katı (solid) tümörlerde, bağışıklık aracılı hastalıklarda, Kardiyovasküler hastalıklarda, diyabette, sinir sistemi hastalıklarında ve diğer hastalıklardaki ekspresyonunda, PI3K/Akt yolu, birçok bilim insanının ilgisini çekmekte ve daha fazla araştırmaya itmektedir ve anlamlı bir terapötik hedef olarak hareket etmektedir [31]

1.7. Nükleer Faktör Eritroid-2 ile İlişkili Faktör 2

Nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), antioksidan enzimlerin ve redoks homeostazı ile ilgili birkaç önemli genin ekspresyonunu düzenleyerek hücre içi redoks ortamının kontrolünde anahtar rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür [119]. Nrf2 sinyal yolunun modülasyonu, oksidatif stres ve iltihaplanma ile ilgili hastalıklar için terapötik bir hedef olarak incelenmektedir. Başta aktivatörler olmak üzere Nrf2 modülatörlerinin, kanser, otoimmün hastalıklar, karaciğer, böbrek ve akciğer hastalıkları gibi farklı insan patolojisi modellerinde ve ayrıca yaygın nörodejeneratif bozukluklarda faydalı etkiler ortaya çıkardığı görülmüştür [120–122]. Schwann hücreleri gibi sinir hücreleri dâhil olmak üzere çoğu hücre, aşırı ROS üretiminin neden olduğu zararları ortadan kaldırmak için endojen savunma stratejilerine sahiptir. Bunlar arasında, nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2 (Nrf2)/antioksidan yanıt elemanı (ARE) sinyali, hücre içi oksidatif stresin savunması için redoks durumunun korunmasında rol oynayan kritik antioksidan sistemlerden biridir [123]. NFE2L2 tarafından kodlanan Nrf2, yedi

Nrf2-ECH homoloji (Neh) fonksiyonel alanı, Neh1-Neh7 içeren başlık “n” yaka proteinlerinin üyesi olan temel bir l6sin fermuar transkripsiyon fakt6r6d6r [124]. Nrf2, Neh2 alanında bulunan DLG ve ETGE motifleri yoluyla Kelch benzeri ECH ilişkili protein-1'e (Keap1) baēlı aktif olmayan bir formda sitoplazmada bulunur. Keap1 ayrıca ubikütasyon'da rol oynayan cullin proteinlerinin bir üyesi olan cullin 3'ü (CUL3) baēlar [125]. CUL3, ubikütasyon s6recini ve dolayısıyla Nrf2'nin proteazom bozulmasını aktive etmektedir. Bu Keap1 aktivitesi, bazal koşullar altında 15-40 dakikalık bir yarı 6mre ve yetersiz miktara sahip olan Nrf2'nin kararsızlıēını aēıklamaktadır [126]. Nrf2, oksidatif stres veya aktivat6rlere maruz kalmasının ardından Keap1 sistein kalıntılarının tiyol modifikasyonu sonucunda Keap1'den ayrışır [127]. Nrf2 daha sonra 6ekirdeēin iēine doēru yer alır ve Neh1 alanı yoluyla muskuler apon6rotik fibrosarkom (Maf) proteinleri ile heterodimerize olduktan sonra antioksidan yanıt elemanını (ARE) transaktif eder. Aēaēıdaki verilen şekil 1.6'da Nrf2 translokasyonunun şematik g6sterimi sembolik olarak resmedilmiştir [119].



şekil 1.6. Nrf2 translokasyonunun g6steren şematik g6sterimi

Neh3, Neh4 ve Neh5 alanları işlem alanıdır ve Neh5, Nrf2'nin d6zenlenmesi ve h6cresel lokalizasyonu iēin esastır [128]. Nrf2-ARE etkileşiminin, oksidatif stres tepkilerinde yer alan genlere vurgu yaparak, yaklaşık 250 genin ekspresyonunu d6zenlediēi tespit edilmiştir [126]. 6rneēin, Nrf2, bir6ok redoks enzimi iēin 6ok 6nemli bir kofakt6r olan Nikotinamid adenin din6kleotid fosfat (NADPH) oluşumunda yer alan glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, 6-fosfoglukonat

dehidrojenaz, malik enzim 1 ve izositrat dehidrojenaz 1 genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Aynı zamanda hem oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu hem de glutamat-sistein ligaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve birkaç glutatyon S-transferazın alt birimleri gibi indirgenmiş glutatyonun (GSH) sentezinde ve kullanımında yer alan ilgili enzimleri düzenlemektedir. Nrf2'nin bazı sitokrom P450 oksidoredüktazların ekspresyonunu daha iyi bir şekilde düzenlemesi de oldukça önemlidir [126]. Buna göre, Nrf2-ARE sinyal yolunun aktivasyonunun, çeşitli otoimmün, otoinflamatuar, metabolik, bulaşıcı, nörodejeneratif ve kanser gibi hastalıklarda yer alan kronik inflamasyonun iyileştirilmesinde rol oynadığını öne sürülmektedir [129]. Ayrıca, Nrf2 ve NLRP3, inflamasyonun düzenlenmesinde ters orantılı çalışır. Nrf2 düzenlemesi için Keap1'den bağımsız başka mekanizmalar önerilmiştir. Nrf2'nin Neh6 alanı, ubikutasyon ve proteasomal dejenerasyon için Nrf2'yi işaretleyen β -transdusin tekrar içeren proteini (β -TrCP) bağlamaktadır. Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK3), Nrf2'nin β -TrCP tarafından tanınmasını hızlandırmak için Neh6 alanındaki Nrf2'yi fosforile etmektedir [130]. Ayrıca, bir otofagozom taşıyıcı proteini olan p62'nin, Keap1'in otofajik bozulmasını indüklediği ve Nrf2'nin salınımını indüklediği alternatif bir yol da gösterilmiştir [131].

1.7.1. Beyin Metabolizmasında Nükleer Faktör Eritroid-2 İle İlişkili Faktör 2 Sinyali

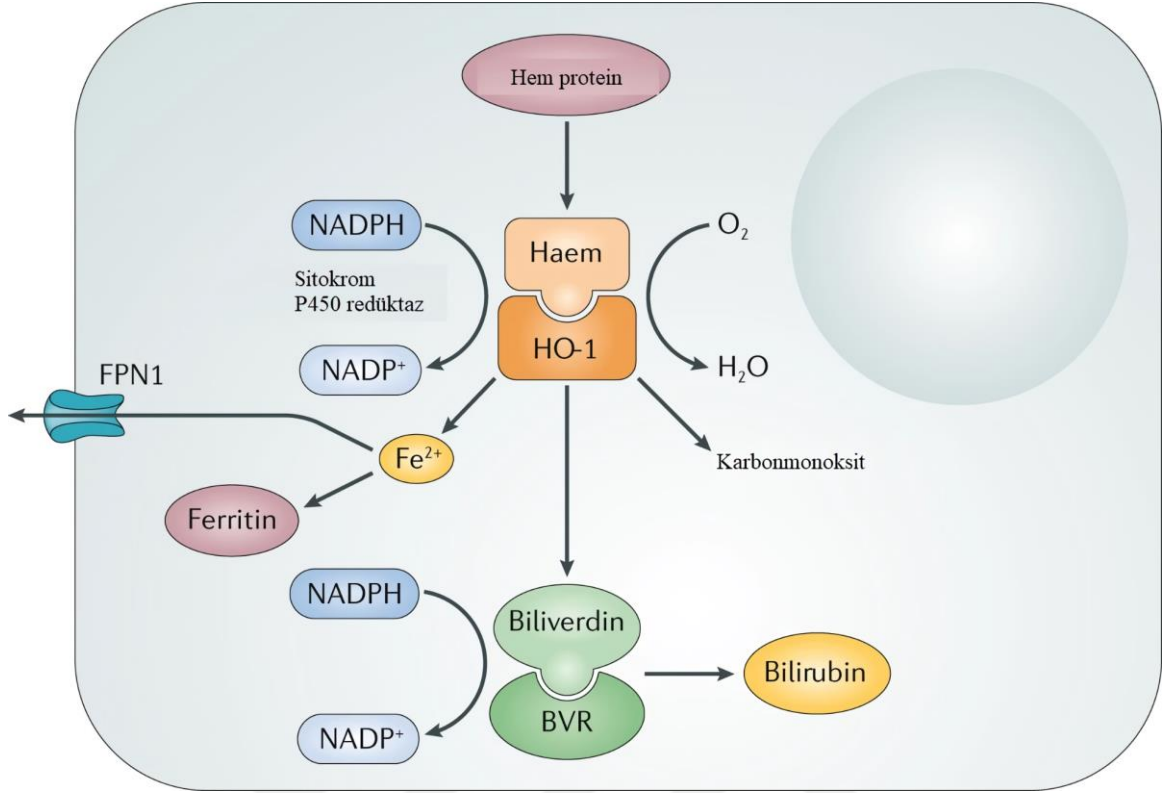
Beyin yüksek bir metabolik hıza sahiptir ve solunan oksijenin yaklaşık %20'sini tüketmektedir, bu da yüksek enerji gerektiren bir dokuya işaret eder. Çeşitli karbon kaynakları oksitlenebilse de, glikoz yetişkin beynindeki birincil yakıttır ve toplam vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan beyin, dinlenme sırasında vücut için gerekli olan glikozun %20'sini tek başına tüketmektedir [132]. Nörotransmisyon, birincil aktif taşıyıcılar aracılığıyla plazma zarı boyunca iyon gradyanlarının sürekli kontrolünü gerektiren, sinirsel enerji harcamasının çoğundan sorumlu olan süreçtir. Böylece, nörotransmisyon, artan oksidatif fosforilasyon nedeniyle nöronlarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırmaktadır [133]. Ayrıca, beyin özellikle redoks geçiş metalleri açısından zengindir, fenton reaksiyonunu destekler ve çoklu doymamış lipidlerle kolayca reaksiyona girerek lipid radikalleri ve diğer ürünleri oluşturan yüksek oranda oksidan radikaller üretmektedir. Bu ürünler yapısal, katalitik ve taşıma proteinlerini değiştirerek amino asit kalıntılarıyla reaksiyona girebilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri beyinde bol miktarda bulunduğundan, oksidasyonları zarlara zarar verebilir ve sonuç olarak sinirlerde sinyal iletimini ve iyon iletimini etkileyebilmektedir [134].

Beyin metabolizması önemli seviyelerde ROS ürettiği için, nöronal antioksidan savunmalar bu türlerle başa çıkmak için yeterli değildir. Sinir hücrelerinde GSH konsantrasyonları oldukça düşüktür ve yaşlanma ile bu konsantrasyon daha da düşmektedir [134]. Zayıf nöronal antioksidan savunmaları, aynı zamanda, ana antioksidan transkripsiyonel aktivatör olan Nrf2'nin sürekli protein dengesizliğinin bir sonucundan kaynaklanmaktadır [135]. Bununla birlikte, Nrf2,

astrositlerde oldukça kararlı bir durumdadır ve bu hücelere nöronlara kıyasla daha etkili bir antioksidan sistem sağlamaktadır [133]. Buna göre, Nrf2'nin aracılık ettiği gen aktivasyonundan elde edilen ürünlerin seviyeleri, astrositlerdeki nöronlardan daha yüksektir. Bu durumda astrositler, nöronlar tarafından alınan ve kendi GSH moleküllerini *de novo* sentezlemek için kullanılan GSH öncüllerini serbest bırakarak yakındaki nöronlara antioksidan destek sağlamada önemli bir rol oynamaktadır [136]. Ayrıca, Nrf2'nin nöral kök hücrelerde önemli bir rol oynadığı, nöral dokunun homeostazını koruduğu ve fizyolojik ve patolojik koşullarda nörojenezi desteklediği için, Nrf2 ekspresyonunun endojen ve eksojen modülasyonunun, nöroproteksiyon ve nörogenez ile sonuçlanan spesifik genlerin ekspresyonunu artırabileceği öne sürülmüştür [137]. Nrf2 ekspresyonundaki değişikliklerin, hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilecek yeni tedavilerin geliştirilmesi için umut verici bir hedefi temsil eden nörodejeneratif bozuklukların patofizyolojisinde yer aldığı düşünülebilir.

1.8. Hem-Oksijenaz 1

Hem-oksijenazlar, hem'in parçalanmasını katalize eden çeşitli ve çok işlevli enzimlerdir. Hem grubu, biyolojik olarak önemli birçok proteinin bir bileşeni olan demir içeren bir porfirindir. Bunlar sırasıyla kırmızı kan ve kas hücrelerinde oksijen taşımak için kullanılan hemoglobin ve miyoglobini; oksidatif solunum, redoks ve ilaç metabolizması sırasında elektron taşınmasını kolaylaştıran sitokromları ve kritik hücresel fonksiyonlarda görev alan katalaz ve hem peroksidaz gibi enzimleri içermektedir [138]. Bununla birlikte, hücresel proteinlerde doğal olarak her yerde bulunmasına rağmen serbest haldeki hem oldukça sitotoksiktir ve oksidatif stres yoluyla oluşan hücre hasarını önlemek için hızlı bir şekilde metabolize edilmelidir [139]. Hem-oksijenazlar, ekimolar miktarlarda lineer tetrapirrol biliverdin, ferröz (Fe^{2+}) ve karbon monoksit (CO) üretmek için NADPH⁻ sitokrom P450 redüktaz ve oksijen kullanarak ilk heme bozunması hız sınırlayıcı adımını katalize etmektedir [140]. Biliverdin daha sonra biliverdin redüktaz enzimi tarafından lineer tetrapirrol bilirubine dönüştürülebilir [141]. Hem bozunması, hücrenin sitozolünde meydana gelmekte ve buradaki hem, HO-1 enzimi tarafından katabolize edilmektedir. Bu reaksiyon, NADP⁺ ve H₂O üretimine yol açan NADPH ve O₂'yi metabolize etmek için bir kofaktör olarak sitokrom P450 redüktaz gerektirir. Hem 'nin parçalanması, hücreden ferroportin 1 (FPN1) yoluyla hızla iletin veya depolama için ferritine sekestre edilen ekimolar miktarlarda biliverdin, CO ve Fe^{2+} üretilmesiyle sonuçlanır. Biliverdin daha sonra biliverdin redüktaz (BVR) enzimi tarafından bilirubine dönüştürülebilmektedir. HO-1 ve hem katabolizması şematik gösterimi aşağıdaki Şekil 1.7'de sembolik olarak verilmiştir [142].



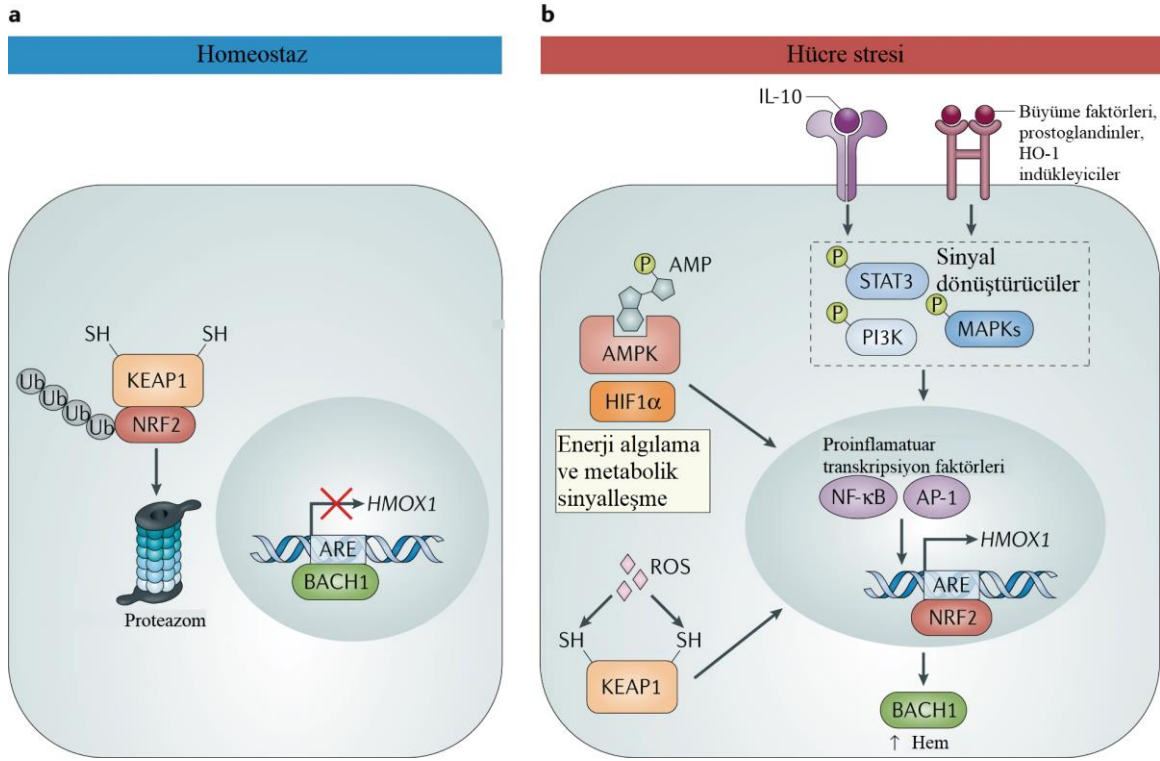
Şekil 1.7. HO-1 ve hem katabolizması

Memeli hücrelerinde HO'nun; HO-1 ve HO-2 olmak üzere iki fonksiyonel izoformu vardır. Homeostatik demir ve redoks metabolizmasında CO aracılığıyla hücrelerarası iletişime katkıda bulunan HO-2; beyin, testis, kardiyovasküler sistem ve karaciğer dâhil olmak üzere belirli dokularda yapısal olarak eksprese edilmektedir [143]. Buna karşılık, HO-1, insanlarda HMOX1 geni tarafından kodlanan stresle indüklenebilir bir izozimdir [144]. HO-1, çok sayıda pro-oksidan uyarana yanıt olarak çoğu hücre tarafından yüksek oranda düzenlenir ve oksidatif hasara karşı koruma sağlar. HO-1 sistemi ayrıca önemli anti-inflamatuar özelliklere sahiptir [145].

HO-1, stres koşulları sırasında çoğu hücre tipi tarafından yukarı regüle edilebilmesine rağmen, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. HO-1, kanıtlanabilir anti-inflamatuar özelliklere sahiptir ve ekspresyonu, inflamasyon sırasında sıklıkla yukarı regüle şeklinde düzenlenmektedir [146].

Homeostatik koşullar altında ubiquitine lenmiş olan Nrf2, KEAP1 bağlanarak bozunma için proteozoma doğru hedeflenir. Transkripsiyon regülatörü proteini BACH1, HMOX1 promotörü üzerindeki ARE bağlanır ve gen transkripsiyonunu bu şekilde inhibe eder. Hücre stres altında olduğu durumda ise, artan hücre içindeki heme seviyeleri, BACH1'in ARE'den ayrılmasına neden olur ve reaktif oksijen türleri (ROS), KEAP1'deki sistein kalıntıları ile etkileşime girerek NRF2'den ayrılmasına neden olmaktadır. Bu, NRF2'nin çekirdeğe göç etmesine ve HMOX1'in transkripsiyonunu teşvik etmek için ARE'ye bağlanmasına izin verir. Transkripsiyon faktörleri NF- κ B, AP-1 ve hipoksi indüklenebilir faktör 1 α (HIF-1 α), HO-1'i yukarı regüle etmek için HMOX1

promotoruna da bağlanabilir. AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler), PI3K ve İnterlökin 10 (IL-10) aracılığıyla sinyallemenin de belirli hücre tiplerinde HO-1 ekspresyonunu düzenlemektedir. Aşağıdaki Şekil 1.8'de HO-1 ekspresyonunun düzenlenmesi şematik gösterimi sembolik olarak verilmiştir [142].



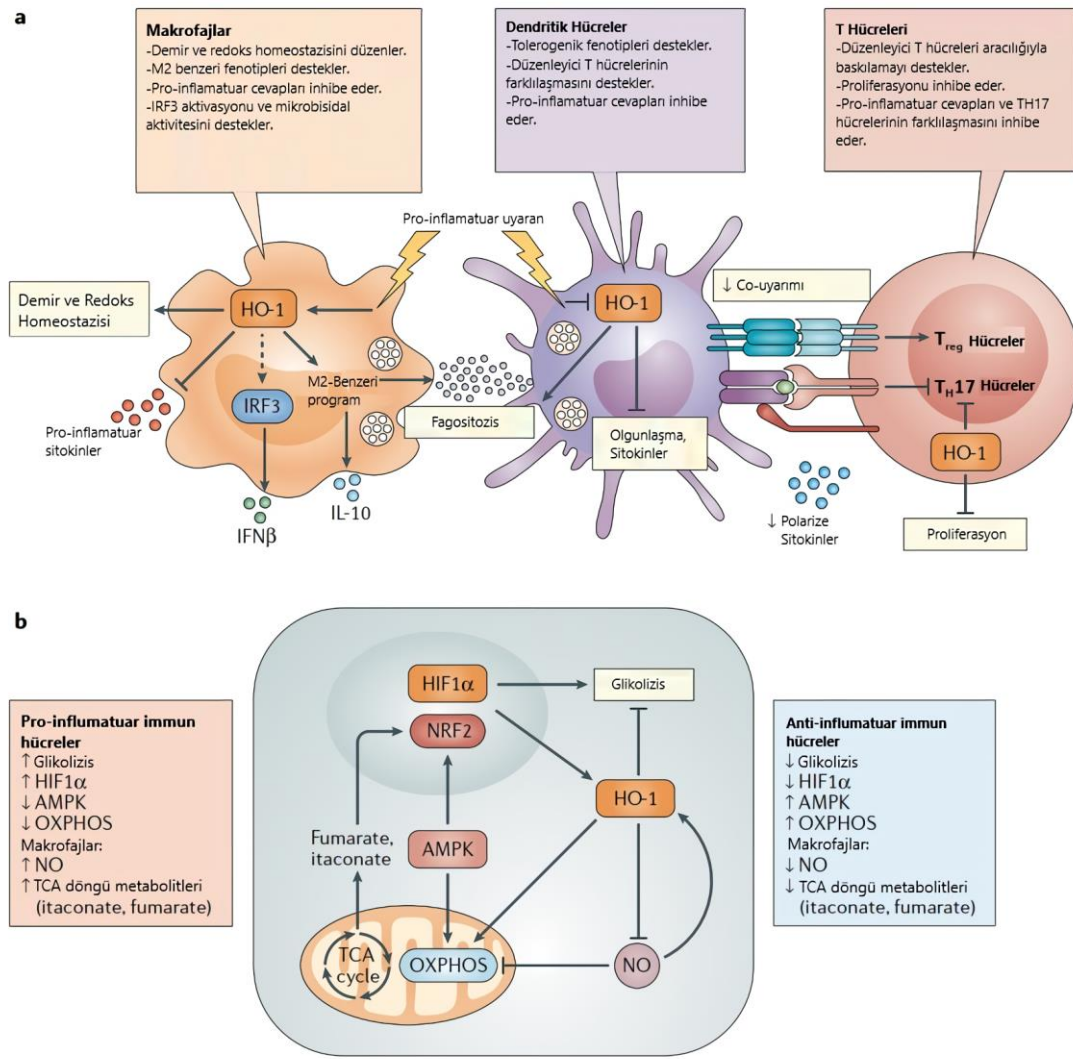
Şekil 1.8. HO-1 ekspresyonunun düzenlenmesi

HO-1, stres koşulları sırasında çoğu hücre tipi tarafından yukarı regüle edilebilmesine rağmen, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [147].

Makrofajlarda, dendritik hücrelerde ve T hücrelerinde HO-1 immünomodülatör aktivitesinde HO-1, makrofajlar tarafından stresle indüklenebilir ve ilişkili anti-inflamatuar aktivitelerle birlikte 'M2 benzeri' bir fenotipe farklılaşmayı destekler. Makrofajlar tarafından HO-1 ekspresyonu ayrıca proinflamatuar uyarılara yanıt olarak interferon düzenleyici faktör 3 (IRF3) aktivasyonunu kolaylaştırmakta ve makrofajların lokal demir ve redoks homeostazını düzenlemesine izin vermektedir. Olgunlaşmamış dendritik hücreler, proinflamatuar uyarılara yanıt olarak olgunlaşma sırasında aşağı regüle edilen HO-1'i yapısal olarak eksprese eder. Bu durum; T yardımcı 17 hücreleri (TH17 hücreleri) gibi proinflamatuar T hücre alt kümelerinin farklılaşması üzerinde düzenleyici T hücresi (T_{reg} hücresi) farklılaşmasının desteklenmesiyle sonuçlanır. HO-1 ekspresyonu T hücreleri tarafından TH17 hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu sınırlayabilir, ayrıca inhibe de edebilir [148].

HO-1 ve immünmetabolizma arasındaki ilişki de ise bağışıklık hücreleri tarafından HO-1 ekspresyonu, metabolik sinyalleme ile düzenlenmektedir. Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α

(HIF1 α) ve NO, glikolitik metabolizmayı destekler, pro-inflamatuar bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu sırasında yukarı yönde düzenlenir ve HO-1 ekspresyonunu indükler. Fumarat ve itakonat gibi trikarboksilik asit (TCA) döngüsünden türetilen metabolitlerin, NRF2 aktivasyonu yoluyla HO-1 ekspresyonunu yukarı regüle ettiği bilinmektedir. Hücresel enerji sensörü AMPK, anti-inflamatuar bağışıklık hücrelerinde oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) teşvik eder ve NRF2 yoluyla HO-1 ekspresyonunu indüklemektedir. Sonuç olarak HO-1 veya ürünleri ayrıca glikoliz ve NO'nun inhibisyonun yanı sıra OXPHOS'un desteklenmesi yoluyla immünmetabolizmayı da düzenleyebilmektedir. Aşağıdaki Şekil 1.9'da HO-1 tarafından immünoregülasyon panel a ve b olarak şematik gösterimi sembolik olarak verilmiştir [148].



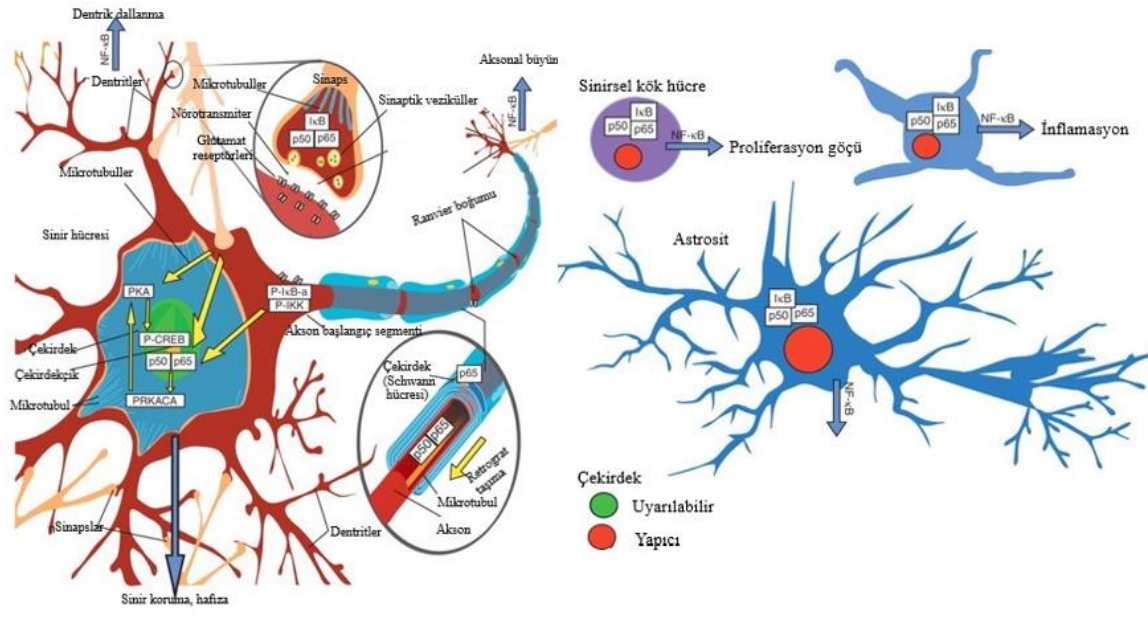
Şekil 1.9. HO-1 tarafından immünoregülasyonu

Hem nöronal hem de nöronal olmayan beyin hücreleri, zararlı uyarılara yanıt olarak HO-1'i ve diğer ısı şoku proteinlerini (HSP) transkripsiyonel düzeyde hızla yukarı regüle edebilmektedir.

HO-1, belirli nöropatolojik koşullarda antioksidan savunmalarla ilişkili olarak, oksidasyona maruz kalan nöronlar için temel bir savunma mekanizması olarak görev yapan indüklenabilir bir enzimdir. Nörodejeneratif hastalıklardan alzheimer, parkinson, MS ve nöropsikiyatrik bozuklukların (depresyon, anksiyete, bipolar bozukluk ve şizofreni) artan inflamatuvar belirteçlerle ilişkili olduğunu göz önünde bulundurarak, bozulmuş redoks homeostazı ve oksidatif stres, HO seviyeleri/aktivitesindeki değişikliklerle ilişkili olabilecek durumlar, bu MSS hastalıklarında HO-1'in olası rolü hakkında katkıda bulunmaktadır [148]. HO-1 sistemini modüle eden tedavilerin, MS için yeni bir tedavi stratejisi olarak faydalı olabileceğini makul bir yaklaşım olarak düşünülebilir.

1.9. Nükleer Faktör Kappa B

Transkripsiyon faktörü NF- κ B, hücrenin hayatta kalması, hücre ölümü, inflamasyon, proliferasyon ve hücre farklılaşması ile ilgili çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri protein kompleksidir [149]. NF- κ B, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri sırasında merkezi bir rol oynamaktadır. İnflamasyon, aşağı akışta pro-inflamatuvar genlerin aşırı ekspresyonu nedeniyle NF- κ B aktivasyonunun temel bir sonucudur [150]. NF- κ B'nin sinir sisteminde de çeşitli işlevleri vardır. Diğer birçok dokudakinin aksine, NF- κ B, nöronlarda yüksek bazal seviyelerde yapısal olarak aktiftir, bu da MSS'deki spesifik fizyolojik fonksiyonları kontrol etmedeki önemini ortaya koymaktadır. Nöronal morfolojinin önemli bir düzenleyicisidir ve nöronal plastisitede, öğrenmeyi, hafızayı ve davranışı etkileyen önemli roller oynamaktadır [35]. Ek olarak, nöronal NF- κ B; eksitotoksik veya oksidatif strese ve iskeminin neden olduğu nörodejenerasyona karşı koruma sağlar, aynı zamanda beyin hasarı ve felçten sonra inflamatuvar reaksiyonlara ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Nöronların aksine, normal koşullarda gliyal hücrelerde yapısal NF- κ B aktivitesi saptanmaz, bu da indüklenabilir NF- κ B'nin esas olarak stresli veya patolojik koşullarda etki ettiğini gösterir [151]. NF- κ B 'nin sinir sistemindeki rolü, sinaptik süreçlere, nörotransmisyonu ve nöroproteksiyona dâhil olması nedeniyle ilgi görmüştür. Ayrıca, indüklenabilir NF- κ B, beyin iltihabı ve nöral kök hücre proliferasyonunda çok önemli bir rol oynar. Aşağıdaki Şekil 1.10'da NF- κ B 'nin sinir sisteminin hücresel bağlamındaki rolü sembolik olarak verilmiştir [35]

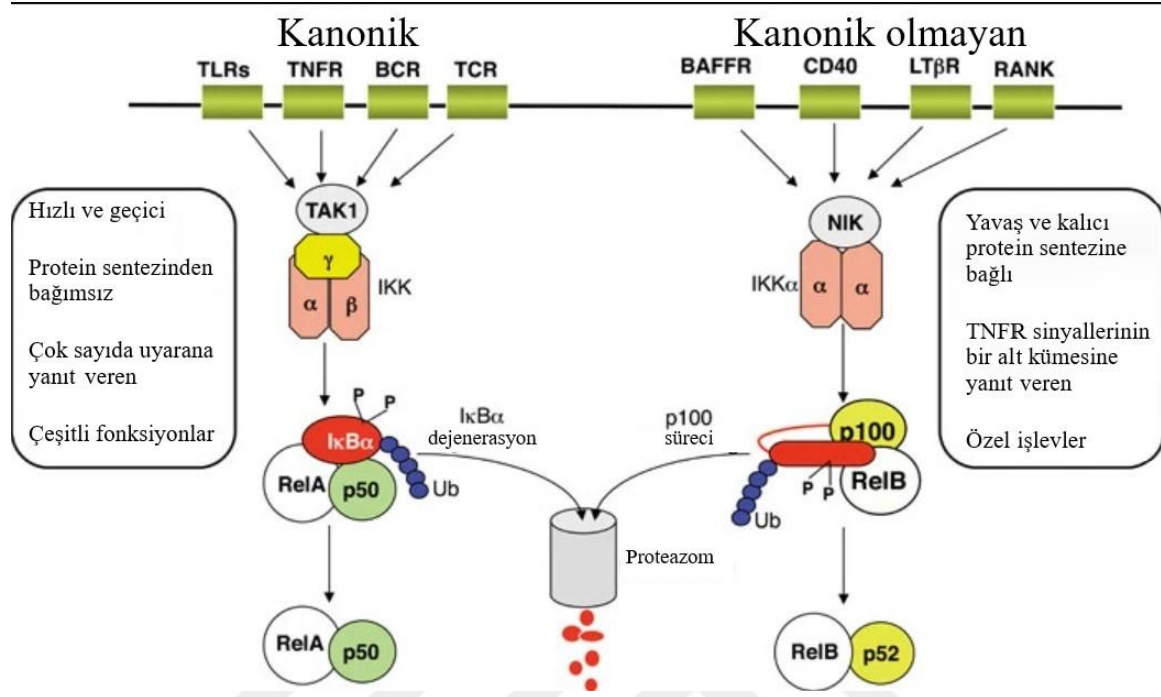


Şekil 1.10. NF-κB'nin sinir sisteminin hücresel bağlamındaki rolü

NF-κB, homodimerler veya heterodimerler oluşturarak yüzlerce gen ekspresyonunu koordine eden bir transkripsiyon faktörleri ailesini içermektedir. Memelilerde NF-κB ailesinin beş üyesi vardır: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105 (NF-κB1) ve p100 (NF-κB2). Çoğu dinlenme hücrelerinde, NF-κB, IκBα, IκBβ ve p100 gibi κB (IκB) proteinlerinin inhibitörlerinin herhangi bir ailesi ile etkileşime girerek sitoplazmada tutulur. Uyarılmış sinyaller üzerine, IκB kinaz (IKK), IκB'yi hızla fosforile ederek ubiquitinasyon ve proteasomal bozulmasını kolaylaştırır, bu da sonuçta NF-κB'nin çekirdeğe girişini sağlamaktadır ve transkripsiyonel aktivitesini ortaya çıkartmaktadır [152].

Genel olarak NF-κB sinyalleşme kaskadı, kanonik (klasik) ve kanonik olmayan (alternatif) yollar ile kategorize edilebilir. Klasik NF-κB sinyal yolu, Toll benzeri reseptör ligandları, proinflamatuvar sitokinler [örneğin, tümör nekroz faktörü α (TNF-α)] ve antijenler dâhil olmak üzere çok sayıda uyarıcı tarafından indüklenebilir ve IKK kompleksinin aktivasyonuna yol açar, IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2) ve NF-κB temel modülatörünü (NEMO veya IKKγ olarak da bilinir) içermektedir. IKK kompleksi daha sonra IκB proteinlerini fosforile ederek sitoplazmik NF-κB dimerlerinin (genellikle p50-p65) bozulmuş IκB'den salınmasına izin vermektedir. Klasik yolun aktivasyonunun, dakikalar içinde çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık ettiği gösterilmiştir [153]. Buna karşılık, klasik olmayan NF-κB sinyal yolu, yalnızca B hücre aktivasyon faktörü (BAFF), lenfotoksin β, CD40 ligandı (CD40L) ve NF-κB ligandının reseptör aktivatörü gibi belirli bir uyarıcı grubuna yanıt vermektedir [154]. Bir kez uyarıldığında, NF-κB-indükleyici kinaz spesifik olarak IKKα'yı aktive eder, bu da sırayla p52 öncülü p100'ü p52'ye işler ve olgun p52 daha sonra RelB ile dimerizasyonu yoluyla çekirdeğe doğru yönelir. Klasik yolun aksine, bu süreç yavaş

olabilmekte ve sınırlı sayıda hücreyel yanıtta yer almaktadır. Aşağıdaki Şekil 1.11’de NF-κB sinyalleşme kaskadı, klasik ve alternatif yollar görsel şeması sembolik olarak verilmiştir [155].



Şekil 1.11. NF-κB sinyalleşme kaskadı, klasik ve alternatif yollar görsel şeması

NF-κB'nin bağışıklık koruyucularının ve bağışıklık hücrelerinin neredeyse tüm savunmalarını etkilediği göz önüne alındığında özellikle MS, sistemik lupus eritematozus ve tip 1 diyabet dâhil olmak üzere birçok otoimmün inflamatuvar hastalıkta NF-κB düzensizliğinin önemli rolü olduğu bilinmektedir [156]. NF-κB, MSS'de, inflamasyon ve ikincil yaralanma süreçlerinde anahtar düzenleyicidir. Travma veya hastalıktan sonra, NF-κB'ye bağlı genlerin ekspresyonu aktive olmakta ve hem koruyucu hem de zararlı etkilere yol açmaktadır [157]. MS multifaktöriyel otoimmün inflamatuvar bir hastalık olmasına rağmen, NF-κB'nin MS patolojisinde önemli bir rol oynadığı netlik kazanmıştır. Ayrıca, MS, T ve B hücreleri, astrositler ve mikrogliya gibi efektör hücreler ile nöronlar ve oligodendrositler gibi hedef hücreler arasındaki karmaşık bir etkileşimden kaynaklandığından, NF-κB, MS'de yer alan farklı hücre tiplerinde hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olabilmektedir [151]. Bu bilgi nihayetinde MS ve diğer demiyelinizan hastalıkları tedavi etmek için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine yol açabilir.

1.10. Nörodejeneratif Hastalıklarda Apoptoz

Omurgalıların doğum öncesi ve sonrası beyin gelişimi sırasında büyük bir nöron ölümünün meydana geldiği ve bunun trofik faktörler için başarısız rekabetle ilişkili olduğu ve bir apoptoz biçimini temsil ettiği bilinmektedir [158]. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, sağlıklı beynin

gelişimi ve olgunlaşması sırasında doğal olarak meydana gelmektedir. Bununla birlikte, apoptotik yollar, nöronların fonksiyonel popülasyonlarının kaybının neden olduğu beyinle ilişkili hastalıklarda da önemli bir rol oynamaktadır. Beyin hücreleri, oksidatif stres, eksitotoksikite veya nöroinflamasyon gibi nörotoksik stimülasyon sırasında ölüm reseptörü aracılı (dışsal) apoptoz, mitokondri aracılı (içsel) apoptoz veya her ikisinin bir kombinasyonuna maruz kalır [159].

Hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, metabolizması ve hücre ölümü gibi temel biyolojik süreçlerin kesin olarak düzenlenmesi, hücresel işlev için büyük bir öneme sahiptir. Aynı derecede önemli olan, hücrelerin aynı zamanda gelişimsel veya çevresel ipuçlarına yanıt olarak bu biyolojik yolları uyarılma yeteneğine sahip olmaları gerekir. Örneğin, nöronlarda, hücre ölüm yolu erken gelişim sırasında oldukça aktif olmasına rağmen, nöronlar olgunlaştıkça oldukça kısıtlı hale gelmektedir. Olgunlaşma sırasında hücre ölümünün düzenlenmesine yönelik bu çarpıcı düzenleme, nöronlar için kritik bir olaydır, çünkü bu post-mitotik hücreler, bir organizmanın tüm yaşamı boyunca hayatta kalmak ve hayati işlevleri yerine getirmek zorundadır [160].

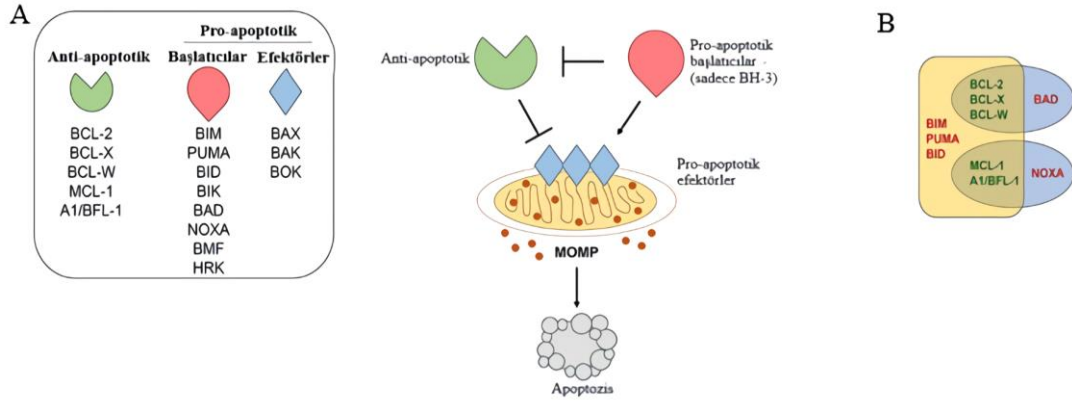
Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz sinir sisteminin gelişimi sırasında gerekli ve ilginç derecede çok sayıda meydana gelmektedir [161]. Otofaji ve apoptoz, insan sağlığının korunmasında ve ayrıca birkaç MSS hastalığının patogeneğinde çok önemli bir rol oynayan iki önemli kendini yok eden süreçtir [161–163]. Bu büyük ve gelişimsel ölüm, mükemmel bir şekilde birbirine bağlanmış sinir sistemi kurma gibi oldukça karmaşık olan bir görev için kritik öneme sahiptir. Bu görev, bol miktarda nöron üretmekte ve gelişimsel olarak geçici olanları ortadan kaldırmaktadır [164]. Örneğin, periferik sinir sisteminde (PSS), başlangıçta tamamen gelişmiş sinir sisteminde bulunan nöronların neredeyse iki katı kadar nöron üretilmektedir. Hayatta kalmak için gelişmekte olan nöronlar, kritik hayatta kalmayı destekleyen trofik faktörleri sağlayan ancak sınırlı miktarlarda uygun hedef hücrelerine ulaşmalı ve onları innerve etmelidir. Trofik faktör desteği olmayan nöronlar apoptoza uğrar, böylece zarif bir şekilde işlevsel, uyumlu bir nöron ağı ve hedef hücreleri üretilir [165]. Önemli olan, sinir sistemi bir kez tamamen geliştikten sonra, bu post-mitotik hücreler sınırlı rejeneratif potansiyele sahip olmaları ve uzun süre yaşamaları gerektiğinden, nöronlar artık apoptoza duyarlı kalmayı göze alamazlar. Bu nedenle, nöronların olgunlaştıkça apoptotik yolu dikkatlice inhibe etmeleri gerekmektedir. Apoptotik duyarlılıktan katı inhibisyona hızlı geçişi uygulamak için, olgun nöronların apoptoz yolunu inhibe etmekte birden fazla mekanizmaya dâhil oldukları görülmektedir. Apoptozda bu inhibisyonların sürdürülememesi durumunda, olgun nöronların dejenerasyona karşı savunmasızlığını artırması muhtemeldir [160].

1.10.1. B Hücreli Lenfoma 2 Ailesi Proteinleri

B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi birincil işlevlerine göre üç gruba ayrılmaktadır:

- ✓ Anti-apoptotik proteinler (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1)
- ✓ Proapoptotik gözenek oluşturmalar (BAX, BAK, BOK)

- ✓ Yalnızca proapoptotik BH3 proteinleri (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA vb.).



Şekil 1.12. Bcl-2 aile üyeleri apoptozu düzenler

Yukarıdaki Şekil 1.12’de verilen Bcl-2 aile üyeleri apoptozdaki görevlerinin yer aldığı sembolik şemada (Panel A) çeşitli hücrel stresörler, Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenen içsel, mitokondriyal yol yoluyla apoptozu indüklemektedir. Bu stres sinyalleri, yalnızca anti-apoptotik proteinleri (yeşil) engelleyen proapoptotik BH-3 başlatıcılarını (kırmızı) aktive eder. Bu da proapoptotik efektörlerin (mavi) etkinleştirilmesine izin verir. Efektör proteinlerin aktivasyonu, onların oligomerizasyonu ve ardından mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) ile sonuçlanır ve kaspaz kaskadı ve hücrel yıkımın son aşamalarını başlatan apoptotik faktörlerin salınmasını sağlamaktadır. Panel B’ de ise pro-apoptotik proteinler BH-3 sadece, farklı afinitelerle anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine bağlanır. BIM, PUMA ve BID, tüm anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine güçlü bir şekilde bağlanırken, BAD tercihen Bcl-2, Bcl-X ve Bcl-W’ye bağlanır ve NOXA tercihen MCL-1 ve A1/BFL-1’e bağlanır [166].

Tüm Bcl-2 ailesi proteinleri bir BH3 alanı içerir; bu proteinler arasındaki etkileşimlerde yer alan dört BH alanından biri. Anti-apoptotik ve gözenek oluşturucu proteinler, dört BH alanının tümünü (çoklu BH alanı proteinleri) içerir ve diğer aile üyelerinin BH3 alanları için bir reseptör görevi gören hidrofobik bir BH3 alanı bağlama oluğu oluşturan yüksek oranda korunmuş bir üçüncül yapıyı benimsemektedir. Yalnızca BH3 proteinleri, sadece BH3 alanını içeren ve BID dışında çözelti içinde yapılandırılmamış olan aktivatör ve duyarlılaştırıcı proteinlere bölünmüştür [167].

1.10.2. B Hücreli Lenfoma 2 ile İlişkili X Proteini

B hücreli lenfoma 2 ile ilişkili X proteini (Bax), mitokondriyal dış zarı (MOM) geçiş kolaylaştıran öldürücü aktivitesi yoluyla mitokondriyal düzenlenmiş hücre ölümünün kritik bir uygulayıcısıdır. Bax’ın fizyolojik işlevi doku homeostazını sağlarken, düzensizliğinde ise anormal

hücre ölümüne yol açmaktadır. Bax, insan hastalıkları için umut verici bir terapötik hedef olmasına rağmen, tarihsel olarak ilaçların gelişimi, Bax aktivasyon mekanizmasının aydınlatılmasındaki ve Bax'ın ilaçlara karşı yüzeylerinin belirlenmesindeki zorluklar nedeniyle, antiapoptotik Bcl-2 proteinlerine odaklanmıştır [168]. Bcl-2 protein ailesi, apoptotik hücre ölümünün anahtar düzenleyicileri olarak iyi kurulmuştur [169]. Apoptozun temel adımı, bir hücreyi geri dönüşümsüz olarak ölüme gönderen MOM geçirgenleştirmedir (MOMP). Proapoptotik efektör Bcl-2 proteinleri Bax ve Bak, MOMP'yi yürüten MOM gömülü oligomerik gözenekleri oluşturarak merkezi bir rol oynamaktadır [167]. Bax ve BAK, öncelikle kısmen Bcl-2, Bcl-xL veya MCL-1 gibi antiapoptotik Bcl-2 proteinleri ile etkileşimlerle sürdürülen aktif olmayan durumlarda bulunur [170]. Hücrel stres altında, BIM, BID ve PUMA gibi yalnızca Bcl-2 homoloji 3 (BH3) proteinleri, hem antiapoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe etmek hem de proapoptotik Bax ve Bak'ı doğrudan aktive etmek için MOMP'yi indükleyen oligomerik gözeneklerin oluşumuyla sonuçlanan bir dizi konformasyonel değişiklik başlatarak BH3 alanlarını kullanırlar [170].

1.10.3. B Hücreli Lenfoma 2 ile İlişkili X Proteini Aktivasyon Mekanizması

Sağlıklı hücrelerde Bax esas olarak aktif olmayan bir sitozolik monomer veya oto-inhibe edilmiş bir homodimer olarak bulunmaktadır. Hücrel stres altında, BIM gibi yalnızca BH3 proteinleri, Bax aktivasyon kaskadını başlatan $\alpha 1$ ve $\alpha 6$ sarmalları tarafından oluşturulan Bax N-terminal tetikleme bölgesini bağlamak için BH3 alanlarını kullanmaktadır. Yalnızca BH3 bağlanması, heliks $\alpha 1$ ve $\alpha 6$ ile yakından ilişkili olduğu kapalı bir konformasyondan, ilmeğin ayrıştığı ve solvente maruz kaldığı açık bir konformasyona, ilmek $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 'nin konformasyonel bir değişikliğini indüklemektedir. Bu adımı takiben, 6A7 epitopunun (Bax aktivasyonunun bir işareti) maruz kalması ve Bax BH3 alanının ($\alpha 2$) açığa çıkması gibi ek konformasyonel değişiklikler meydana gelir. En kritik olarak, Bax transmembran heliks $\alpha 9$, C-terminal klasik bölgesinden ($\alpha 3$ - $\alpha 5$ heliksleri tarafından oluşturulan) mobilize edilerek Bax'ın MOM'a yer değiştirmesine izin vermektedir. MOM'a heliks $\alpha 9$ aracılığıyla bağlandıktan sonra, Bax'ın mandal alanına (heliks $\alpha 6$ - $\alpha 8$) ve çekirdek alana (heliks $\alpha 3$ - $\alpha 5$) ve BH3 alanını (heliks $\alpha 2$) ayırmasına izin veren yalnızca BH3'ün şu anda boş olan kanonik bölgeye bağlanmasıyla Bax, daha fazla konformasyonel değişikliğe uğrayabilmektedir. Çekirdek alan, klasik bölgenin genel yapısını korur, özel olarak BH3 alanlarına bağlanmasına izin veren başka bir Bax-BH3, diğer bir Bax protomerinin kanonik bölgesine bağlanan bir Bax protomerinin BH3 alanı aracılığıyla simetrik dimerlerin oluşumuna izin vermektedir. Bu simetrik Bax dimerlerinin, MOM'yi geçirgen hale getiren homooligomerik gözeneklerin yapı taşları olduğu varsayılır. Bax oligomerik gözeneklerinin kesin yapısı, büyük boyutuna ve heterojenliğine borçlu olması muhtemel olarak çözülmemiş kalsa da, yakın Bax dimerleri arasında, oluşumuna katkıda bulunması muhtemel olan çekirdek, mandal ve transmembran alanları aracılığıyla kararlı etkileşimler rapor edilmiştir [170–172]. Ayrıca, belirli

lipidler Bax aktivasyonunun düzenlenmesinde, MOM'a entegrasyonda ve Bax oligomerlerinin oluşumunda rol oynayabilir [173]. Son veriler, lipidlerin, Bax ve yalnızca BH3 proteinlerinin doğrudan etkileşimi olmadan Bax α 9 ve MOM ilişkisi yoluyla spontan Bax aktivasyonuna ve membran translokasyonuna aracılık etmede etkili olduğunu göstermektedir [174]. MOMP, Bax oligomerleri tarafından en belirgin şekilde, heptamerik apoptozomu oluşturmak için APAF1'e bağlanan ve sırasıyla kaspazları aktive edip apoptoz sürecini başlatan sitokrom c (12 kDa) gibi düşük moleküler ağırlıklı apoptojenlerin salınmasına izin vermektedir [175]. Bununla birlikte, apoptoz sırasında mitokondriyal DNA'nın (10^4 kDa) sitozole salınmasından Bax gözeneklerinin de sorumlu olduğu belirtilmelidir [176]. Bax'ın MOM'da nasıl daha yüksek dereceli oligomerler oluşturduğunun kesin ayrıntıları bilinmemektedir ve genel Bax aktivasyon mekanizmasını anlamamızda önemli bir eksikliktir.

1.10.4. B Hücreli Lenfoma 2

Dış mitokondriyal zarın geçirgenliği, protein-protein etkileşimleri yoluyla Bcl-2 ailesi proteinlerinin üyeleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bcl-2 protein ailesi, protein yapısına ve temel işlevlere göre üç ana alt gruba, anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik çok alanlı efektör proteinler ve pro-apoptotik Bcl2 homolojisi (BH)3 sadece alan proteinleri göre sınıflandırılan 20'den fazla farklı üyeden oluşur [177]. Hayatta kalma yanlısı Bcl-2 proteinleri, B hücreli lösemi/lenfoma-2 (Bcl-2), miyeloid hücreli lösemi-1 (MCL-1), B hücreli lenfoma-ekstra büyük (Bcl-XL; Bcl211), B içerir -hücre lenfoma-w (Bcl-W/Bcl2l2), Bcl2 benzeri protein 10 (Bcl-B/Bcl2l10) ve Bcl-2 ile ilgili gen A1 (A1/Bcl2a1; BFL-1 olarak da bilinir). Hayatta kalma taraftarı Bcl-2 proteinleri, proapoptotik Bcl-2 proteinlerini sekestre ederek onların anti-apoptotik aktivitelere aracılık eder. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, hücrel membranlara bağlamak için gerekli olan bir transmembran alanı ve BH alanları (BH1, BH2, BH3, BH4) olarak adlandırılan dört korunmuş motif ile ortak bir yapıyı paylaşır. BH1, BH2 ve BH3 alanları, proapoptotik Bcl-2 proteinleri ile etkileşim için kritik olan hidrofobik bir cep oluşturur. İlginç bir şekilde, bu grubun bazı proteinleri, pro-apoptotik aktiviteye sahip olan aynı genden çevrilmiş izoformlara sahiptir. Örneğin, tam uzunlukta MCL-1 (MCL-1L), MCL-1 kısa (MCL-1S) ve MCL-1 ekstra kısa (MCL-1ES) dâhil olmak üzere MCL-1'in bilinen üç aynı gen izoformu vardır. Anti-apoptotik protein MCL-1L'nin aksine, hem MCL-1S hem de MCL-1ES farklı protein yapılarına sahiptir ve pro-apoptotik aktiviteler gösterir [178]. Aşağıdaki Şekil 1.13'te anti-apoptotik Bcl-2'nin alt ailesi içindeki rollerin görsel şeması sembolik olarak verilmiştir [177].

Genin adı / izoformun rolü / endojen ekspresyon düzeyi	Gen ekleme kontrol mekanizması / izoform adı / primer yapı
BCL-2 Anti-Apoptotik: t(14:18) translokasyonlu B hücreli lenfomalarda yüksek oranda eksprese edilir. Rolü bilinmiyor: BCL2α ile karşılaştırıldığında sağlıklı hücrelerde düşük ekspresyon; KML hastalarının kan ve kemik iliğinde ekspresyon oranının artması	BCL-2α  BCL-2β 
BCL-XBCL2L1 Anti apoptotik: Büyüme faktöründen yoksun hücre hatlarında aşırı eksprese edildiğinde hayatta kalma sağlar. Pro-apoptotik: BCL-2'nin hayatta kalımı artırmasını engeller, genellikle yüksek devir hızına sahip hücrelerde expresse edilir, hücreleri kemoterapi ajanlarına karşı duyarlı hale getirebilir.	BCL-X_L  BCL-X_S 
MCL-1 Anti-apoptotik: hücreler, canlı hücrelerde eksprese edilen, hücre-hayatta kalmaya neden olan tümörjenik bileşiklere maruz kaldığında artar. Pro-apoptotik: MCL-1'e kıyasla oral kanser dokusunda çok düşük ekspresyona maruz kalır. Pro-apoptotik: MCL-1'e kıyasla oral kanser dokusunda çok düşük ekspresyona maruz kalır.	MCL-1L  MCL-1S  MCL-1ES 

Şekil 1.13. Anti-apoptotik Bcl-2 alt ailesi içindeki roller

B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) proteinleri ailesi, hücresel sağlıkta kilit işlevler uygular. Bcl-2 öncelikle apoptozun başlamasını kontrol ettiği mitokondride etki eder. Birkaç anti ve proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi, nöronlarda eksprese edilir ve nöronal fonksiyonu etkiler. Önemli olarak, nöronal Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri yaştan etkilenir [179]. Mitokondri, yalnızca elektrokimyasal gradyanları ve membran uyarılabilirliğini korumak için gerekli olan ATP'nin ana kaynağı olarak değil, aynı zamanda ek Ca^{2+} tamponlama kapasitesi sağlamak ve birçok Ca^{2+} aracılı sinyalleşme sürecine katılmak için gerekli olan nöronlarda özel bir role sahiptir [180]. Anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin lenfoma patogeneğinde, hastalık progresyonunda ve ilaç direncinde çok önemli bir rol oynadığı gerçeği göz önüne alındığında, onları terapötik olarak hedefleme çabaları birkaç on yıldır devam etmektedir [178]. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, Bcl-XL ve Bcl-w olgun nöronlarda bulunurken Bcl-2 çoğunlukla gelişmekte olan beyinde eksprese edilir [181].

1.10.5. Kaspaz-3

Kaspaz-3, en yaygın olarak hücre ölümüyle ilişkilendirilen bir sistein proteazıdır. Son çalışmalar, hücre farklılaşmasına, hücre çoğalmasına ve hücre morfolojisinin gelişimine aracılık edebileceğini göstermiştir [182]. Kaspaz-3, apoptozda köklü bir rol oynayan sistein-aspartik asit proteaz ailesinin evrimsel olarak korunmuş bir üyesidir. Kaspazlar, başlatıcı veya efektör kaspazlar olarak sınıflandırılır. Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları parçalar, bunlar daha sonra apoptotik bir kaskadda diğer protein substratlarını parçalayabilir. Kaspaz-3, aktif olmayan bir pro-kaspaz formunda veya aktif bir bölünmüş kaspaz formunda bulunur. Bir başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3'e bölerek aktive eder, bu da daha sonra hücre ölümünü başlatabilir [183].

Programlanmış gelişimsel hücre ölümü sırasında nöronlarda kaspaz-3 kaynaklı apoptoz gözlemlenmiştir ve normal beyin gelişimi için gerekli bir bileşendir. Örneğin kaspaz-3 eksikliği olan fareler, beyin boyunca hiperplazi ve düzensiz hücre yerleşimi sergilemektedir [184]. Kaspaz-3'ün ayrıca gelişmekte olan beyinlerin mikrogliya ve astrositlerinde apoptozu indüklediği de gösterilmiştir [185]. Daha yakın zamanlarda, kaspaz-3'ün apoptotik olmayan işlevleri keşfedilmiştir. Kaspaz-3'ün hem nöronlarda hem de gliada hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını bulmuştur. Ayrıca kaspaz-3, retinal akson köklerindeki uç noktalarını belirleyerek ve dendrit ve dendritik sapları temizleyerek nöronal gelişimi etkilemektedir [185–187].

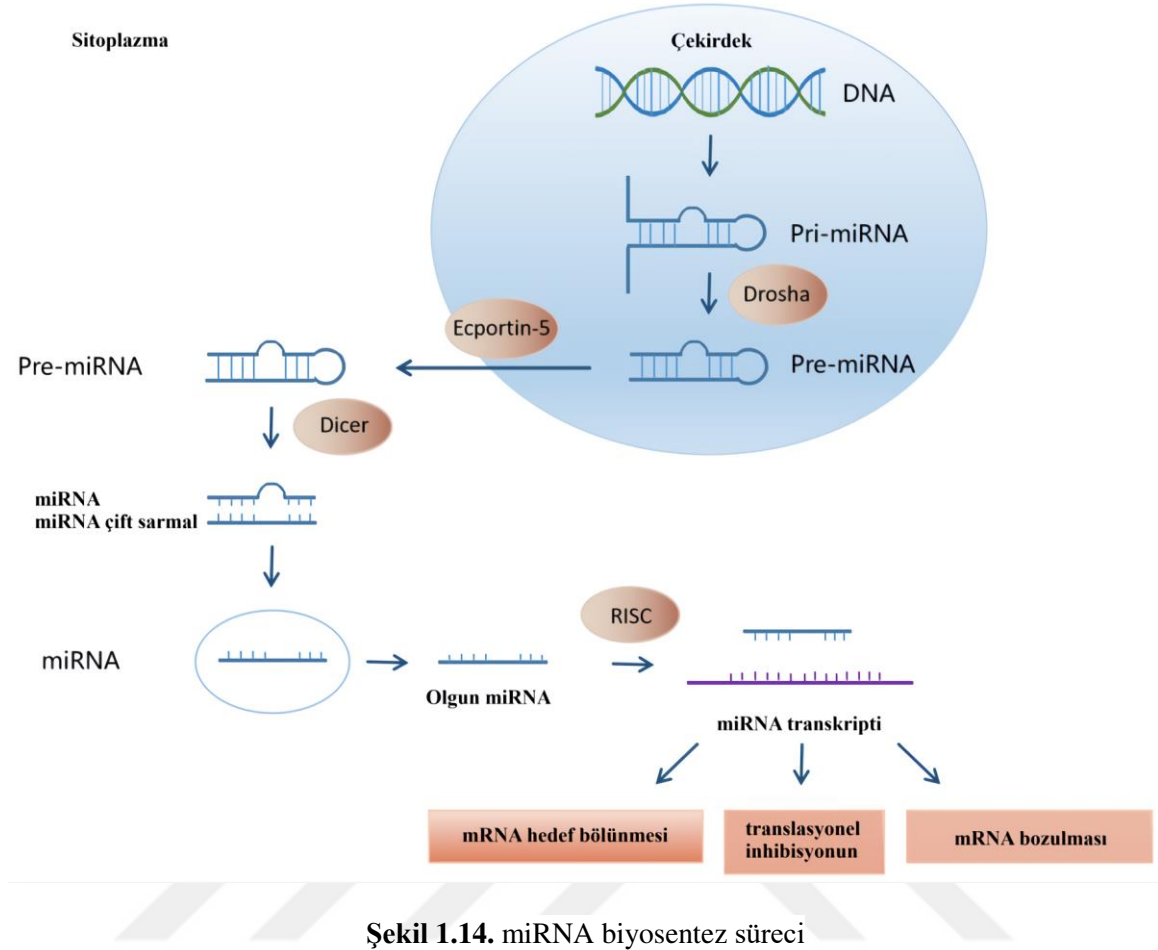
1.11. MikroRNA Biyosentezi ve İşlevi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, çok sayıda endojen tek sarmallı kodlayıcı olmayan RNA molekülleri sınıfıdır. Hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş

bölgelerindeki (3'-UTR) sekansları tanır ve mRNA bozunmasını indüklerler ya da translasyonlarını engellerler [188]. MikroRNA'lar (miRNA'lar), fizyolojik ve patolojik süreçlerde transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu modüle eden küçük endojen kodlamayan RNA molekülleri ailesidir. miRNA'lar, birçok insan hastalığının patogeneğinde önemli roller göstererek hedef mRNA'ları indirgeme veya transkripsiyonun inhibisyonu yoluyla susturabilir. miRNA araştırması, yirmi yıldan fazla bir süre önce keşfedilmelerinden bu yana hızla büyüyen bir alan haline gelmiştir. Birçok moleküler düzenleyici özelliklerine dayanarak, miRNA'lar küresel bir modelde çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlara katkıda bulunmaktadır. Birçok hastalığın yanı sıra MSS yaralanmalarının altında yatan hücre ve moleküler değişiklikler, önemli potansiyel biyobelirteçleri ve terapötik hedefleri sağlamaktadırlar. [189].

Artan sayıda çalışma, tRNA, rRNA, piwi-RNA ve miRNA dâhil olmak üzere çeşitli kodlamayan RNA (ncRNA) türlerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bulmuştur. miRNA veri tabanının (miRBase) en son sürümü *Caenorhabditis elegans*'ta 434, *Drosophila melanogaster*'da 466 ve insanlarda 2588 miRNA'yı kataloglamıştır [190].

Olgun miRNA genlerinin çoğu, fonksiyonel gen kodlama bölgelerinde veya kodlamayan bölgelerde bulunur ve kümeler halinde veya bağımsız olarak ifade edilebilir. MiRNA'ların biyogenezi, çekirdek ve sitoplazmada birbirini izleyen iki işleme olayını katalize eden iki RNase III enzimi, Drosha ve Dicer tarafından yürütülür [191]. Çekirdekte, genomik DNA, uzun bir birincil miRNA (pri-miRNA) üretmek üzere kopyalanır; bu daha sonra, yaklaşık 70 nükleotid (nt) uzunluğunda saç tokası yapılı bir öncü miRNA (pre-miRNA) oluşturmak üzere Drosha tarafından bölünür. Bu saç tokası yapılı RNA'ları, nükleer taşıma reseptörü taşıyıcı-5 tarafından sitoplazmaya taşınır ve 19-23 nt'lik olgun miRNA'lar oluşturmak için sitoplazmada Dicer tarafından bölünür. Ek olarak, fonksiyonel miRNA'lar, klasik olmayan miRNA biyogenez yolları yoluyla da üretilebilir. Bunlar, mRNA öncesi ekleme yoluyla üretilen mirtronları ve küçük nükleolar RNA (snoRNA) öncülerinden üretilen miRNA'ları içerir [192]. Olgun tek sarmallı miRNA'lar, bir dizi proteine bağlanarak miRNA kaynaklı susturma kompleksleri (miRISC'ler) oluşturur, bunlar da hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanır, bağlı mRNA'nın translasyonunu önler veya doğrudan hedef miRNA'yı bozar. Her miRNA birden fazla hedef geni düzenleyebilir ve belirli hedef miRNA'lar aynı anda birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir [193]. miRNA biyosentez süreci miRNA, RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA'ya işlenir. Daha sonra, pri-miRNA'lar, Drosha dâhil olmak üzere karmaşık mikroişlemciler tarafından pre-miRNA'lara bölünür. Daha sonra pre-miRNA'lar, exportin-5 aracılığıyla çekirdekte sitoplazmaya aktarılır ve burada Dicer tarafından çift sarmallı miRNA'yı daha da küçük fragmanlarına parçalar. RISC'ye bağlandıktan sonra miRNA çift sarmalı, Argonot proteini tarafından zincirsiz hale getirilir. Olgun zincir RISC'de kalır ve gen regülasyonu için hedef mRNA'ya bağlanırken diğer yolcu zinciri hidrolize edilir. Aşağıdaki Şekil 1.14'te miRNA biyosentez sürecinin görsel şeması sembolik olarak verilmiştir [194].



Şekil 1.14. miRNA biyosentez süreci

1.11.1. MikroRNA-21

MikroRNA-21 (miR-21), makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller ve T hücreleri gibi çeşitli aktif bağışıklık hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen, mikroglia, astrositler, nöronlar ve oligodendrositler dâhil olmak üzere MSS'nin çeşitli hücre tiplerinde önemli roller oynamaktadır [195]. miR-21, MyD88 ve NF- κ B aracılığıyla TLR sinyali ile indüklenen ve PDCD4'ü hedefleyen ve NF- κ B'nin aşağı regülasyonu ve anti-inflamatuar sitokin IL-10'un indüklenmesine yol açan başka bir anti-inflamatuar düzenleyicidir [196]. Ayrıca miR-21, TNF- α salgılanmasını azaltarak makrofajlarda anti-inflamatuar etkilere aracılık eder, ancak STAT-3'ü hedefleyerek M2 polarizasyonunu da engellemektedir. MiR-21 ayrıca strese yanıt olarak astrositlerde indüklenir ve astrogliosisin erken evrelerinde astrositik aktivasyonu bozmaya hizmet eder [195]. MiR-21'in aşırı ekspresyonu, MS hastalarının karakteristik bir özelliğidir ve T hücresi aktivasyonunu ve apoptozu, Treg fonksiyonunu ve gelişimini veya Th17 farklılaşmasını modüle edebilir [197]. Transkripsiyon sonrası düzenleyici faktörler olarak işlev görerek gen ekspresyonunu düzenleyen bol miktarda küçük kodlamayan RNA molekülleri sınıfı olan miRNA'lar, travmatik beyin hasarı (TBI) ilerlemesinin temel bileşenleri olarak tanımlanmıştır. miR-21, TBI'da fiziksel

egzersizler tarafından indüklenen inflamasyon, nöronal apoptoz, reaktif gliozis, kan beyin bariyerinin bozulması, anjiyogenez ve iyileşme sürecinin sinyal yollarında yer alan yakın zamanda tanımlanmış tipik bir miRNA'dır [198]. Birçok çalışma, miR-21'i bir oncomiR olarak dâhil etmiştir, çünkü birincil tümörlerdeki zenginleşmesi bu proteinlerin ekspresyonu ile negatif korelasyona sahiptir. Bununla birlikte, kanser için zararlı olan bu anti-apoptotik fonksiyonun hücre hayatta kalmasını teşvik ederek akut beyin hasarı koşullarında faydalı olduğunu akılda tutmak önemlidir [199].

1.11.2. MikroRNA -107

MikroRNA-107 (miR-107), son yıllarda keşfedilen yeni bir kodlamayan RNA dır, birkaç çalışma miRNA-107'nin kanserler, Alzheimer hastalığı ve osteoartrit gibi çeşitli hastalık süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin ve meme kanseri hücrelerinin kemoterapi ilacı paklitaksele duyarlılığının miR-107 tarafından düzenlenebileceğini gösteren çalışmalar olmasına rağmen, miR-107'nin ekspresyon seviyesi de etkili olabilir [200]. MiR-107'nin anormal ifadesi, iskemik inme (İS) dâhil olmak üzere bazı nörolojik hastalıklarda doğrulanmıştır. Bununla birlikte, miR-107'nin işlevi ve altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır [201]. Alzheimer hastalığındaki, farklı rekabet eden endojen RNA (ceRNA) döngülerini de düzenlemektedir. Bu düzenleyici mekanizmanın çeşitli yönlerini anlamak, Alzheimer hastalığının bilinmeyen etiolojisini aydınlatmaya yardımcı olabilir ve terapötik ve klinik uygulamalarda kullanım için yeni moleküler hedefler sağlayabilir [202]. Çentik yolu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişim süreçleri ve doku homeostazı üzerinde çok önemli etkileri olan bir sinyal kaskadıdır ve miR-107 ile işlevsel etkileşime de sahiptir [203]. İnsan beyni örneklerinden izole edilen RNA'dan miR-107, aile üyeleri arasında en yüksek oranda eksprese edilen miRNA'lar içerisinde. Ayrıca, insan dokularının analizi ilginç bir şekilde en yüksek seviyelerde ifade edilen miRNA'ların 7-nt ortak dizi AGCAGCA'yı içerdiğini göstermektedir. miR-107, renal berrak hücreli karsinom, mide kanseri ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerde bir tümör baskılayıcı olarak keşfedilmiştir. Bununla birlikte, miR-107'nin Wilms tümöründeki biyolojik rolü hala belirsizdir [204].

1.11.3. MikroRNA -122

MikroRNA-122 (miR-122), yeni oluşan nöronlarda farklılaşma hızlarını yavaşlatmada etki göstermektedir ve potansiyel olarak farklılaşma gerçekleşmeden önce nöronların daha uzun mesafelere erişmesine izin vermektedir [205]. Bir nörodejeneratif hastalık olan Huntington hastalığı oluşturulan deneysel hayvan modelinde, miR-122'nin de dâhil olduğu birçok mikroRNA'nın serebral kortekste ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir [206]. miR-122'nin, lökosit

aktivasyonu ve trombüs oluşumu dâhil olmak üzere iskemik inme ile ilişkili birkaç gen ve yolun düzenlenmesine dâhil olduğu gösterilmiştir [207]. Ayrıca miR-122, inme sonrası immün aktivasyonda yer alan bir hasar ilişkili moleküler model moleküllerinden peroksiredoksin 2'nin ekspresyonunu da düzenlemektedir. Akut iskemik inmeli hastaların kan hücrelerinde içinde miR-122 ninde bulunduğu birkaç miRNA farklı şekilde eksprese edilir. Bu miRNA'nın, iskemik inme ile ilişkili kandaki gen ekspresyonunu ve yolakları düzenlediği tahmin edilmektedir. Yapılan bir çalışma ile tanımlanan miRNA, serebral iskeminin belirteçleri olarak hizmet edebilir veya iskemik inmede bağışıklık ve pıhtılaşma sistemlerini modüle etmek için yeni yöntemler sağlayabilir [207].



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Hayvan Materyali

Bu doktora tezi çalışmasındaki tüm deneyler Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Sağlık Rehberi Ulusal Enstitüleri kapsamında ve Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 12.10.2016, Toplantı: 2016/18, Karar No:169), etik kurallara uygun bir şekilde hayvan refahı ve hayvan haklarına riayet edilerek yürütülmüştür.

Çalışmada, 42 adet erkek Wistar albino sıçan (yaş: 8 haftalık, ağırlık: 180 ± 20 g) kontrollü bir ortamda, 12: 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü 22°C 'de barındırılan sıçan yemi ve su ad libitum olarak verilmiştir. Tüm deneyler Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Sağlık Rehberi Ulusal Enstitüleri kapsamında ve Üniversitenin Etik Kurulu tarafından onaylanmış olarak yürütülmüştür. Laboratuvar koşullarına uyum sağladıktan sonra, sıçanlar 6 gruba ayrılmıştır. Takviyeler tüm gruplara, 7 hafta süreyle günde bir kez oral gavaj olarak uygulanmıştır.

Demiyelinizasyon prosedürü daha önce tanımlandığı gibi bir stereotaksik enjeksiyonu kullanılarak lizolesitin (LPC) indüklendi. Bu amaçla, sıçanlara ketamin (100 mg / kg, Alfasan, Hollanda) ve ksilazin (10 mg / kg, Alfasan, Hollanda) ile anestezi yapıldı ve kafatası düz bir konumunda stereotaksik bir çerçeveye yerleştirildi. Sıçanların delinen kafatasına %1'lik LPC (Sigma, St. Louis, MO, ABD) taşıyıcı olarak % 0.9 steril serum fizyolojik içinde 1.5 μl tek doz uygun stereotaksik koordinatları (AP = -3.6, bregma koordinatı; ML = ± 1.6 ; DV= -3.2 dura yüzeyi) kullanılarak, %1'lik LPC hipokampüsün CA1 bölgesine bilateral olarak enjekte edildi [208]. Kontrol sıçanlarına ise hipokampüsün CA1 bölgesine eşit hacimde %9'luk steril serum fizyolojik enjekte edildi. Dokuyu dengelemek ve iğne yolundan olası geri akışı önlemek için çözeltiyi enjekte ettikten sonra iğne 3 dakika daha yerinde tutuldu.

2.1.1. Araştırma Grupları

Kontrol: Sıçanlara tek doz % 0.9 steril serum fizyolojik 1.5 μl /sıçan dozunda intraventriküler olarak uygulanmıştır.

LPC: Demiyelinizasyon oluşturmak için sıçanlara % 0.9 serum fizyolojik içerisinde % 1 oranında hazırlanmış LPC, 1.5 μl /sıçan dozunda intraventriküler olarak uygulanmıştır.

LPC+B I: Demiyelinizasyon oluşturulan sıçanlara uygulamadan 5 gün sonra 0.9 mg biyotin /sıçan/gün dozunda d-biyotin oral gavaj ile 7 hafta boyunca günlük olarak uygulanmıştır.

LPC+B II: Demiyelinizasyon oluşturulan sıçanlara uygulamadan 5 gün sonra 9 mg biyotin /sıçan/gün dozunda d-biyotin oral gavaj ile 7 hafta boyunca günlük olarak uygulanmıştır.

LPC+MgB I: Demiyelinizasyon oluşturulan sıçanlara uygulamadan 5 gün sonra 0.9 mg biyotin /sıçan/gün dozunda MgB oral gavaj ile 7 hafta boyunca günlük olarak uygulanmıştır.

LPC+MgB II: Demiyelinizasyon oluşturulan sıçanlara uygulamadan 5 gün sonra 9 mg biyotin /sıçan/gün dozunda MgB oral gavaj ile 7 hafta boyunca günlük olarak uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan farklı biyotin formlarının dozları Birnbaum ve Stulc [17] tarafından yapılan çalışmalara göre belirlendi. Biyotin ve MgB içme suyunda çözündürülerek, her sıçana 1 ml hacim olacak şekilde oral gavaj yardımıyla uygulandı. Eşit miktarda içme suyunun oral gavajla uygulanması kontrol grubuna da uygulanmıştır.

Deneysel uygulama 7 haftalık oral gavaj uygulamasının ardından, etik yönergelere uygun biçimde sıçanlar dekapite edilerek hedef doku olan beyin dokusu bütünlüğü bozulmadan dikkatli bir şekilde alındı. Alınan beyin dokuları Westren blot ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) protokollerine uygun olarak alındı ve analiz edilinceye kadar -80°C’de, derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2. Laboratuvar Analizleri

2.2.1. RNA ekstraksiyonu

miRNA izolasyonu, Life Technologies’e ait ticari *mirVana*TM miRNA izolasyon kiti ürünün kit protokolüne göre eldesi yapıldı.

Deneysel uygulama sonunda RT-PCR analizleri için sıvı azot (77 K, -196°C veya -320°F) içinde daldırılarak alınan beyin hipokampus bölgesinden alınan parça dokuları RNeasy[®] solüsyonu eklenerek RT-PCR analizleri için -80°C’de, derin dondurucuda bekletilen dokular çözündürülerek PBS ile yıkandı.

RNA ekstraksiyonu için *mirVana*TM miRNA İzolasyon Kit protokolüne göre kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonları hazırlanarak miRNA eldesi için hazırlık yapıldı.

- miRNA Yıkama Solüsyonu 1’e 21 mL % 99 luk saf etanol eklendi.
- miRNA Yıkama solüsyonu 2/3’e 40 mL %99’luk saf etanol eklendi.

Her bir beyin dokusunun hipokampus bölgesinden steril 2’lik ependorf tüpe 30 mg doku alınarak üzerine 300 µl Lizis / bağlama tamponu eklendi her ependorf içerisine 3.2 mm olan ebatındaki 3 adet steril çelik bilye konularak 2 dakika tissue lyser yardımı ile 45 frekansta parçalandı. Tissue lyser ile parçalanan dokuya eklenilen Lizis / Bağlama Tamponun 1/10’u kadar miRNA Homojenat solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika süresince vortekslendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Lizata eşit bir hacimde 1/1 oranında Asit-Fenol: Kloroform eklendi 1 dakika süreyle vortekslendi ve sonrasında oda sıcaklığında 5 dakika 10000 rpm de santifirüjlendi. Santifirüjlenen üst faz dikkatlice yeni bir ependorf tüpe alınarak miktarı not edildi. Yeni bir ependorf tüpe alınan lizat üzerine alınan hacmin 1.25 katı kadar oda sıcaklığında saf etanol eklendi ve tekrar 5-10 saniye kadar vortekslendi. Her bir örnek için, ependorf tüplere miRNA filtre kartuşu

yerleştirildi filtre kartuşları maksimum 700 µl hacim aldığından bu miktarın geçilmemesine dikkat edildi. Lizat/etanol karışımını filtreden geçirerek süzülmesi için ~ 15 saniye RCF 10.000 rpm 'de santrifüjlendi sonrasında sızıntı atıldı ve ependorf tüpe filtre tekrardan yerleştirildi. miRNA filtre kartuşuna 700 µl miRNA yıkama Solüsyonu 1 eklenerek ~ 5–10 saniye santrifüjlendi ve sızıntı atıldı. Filtreye 500 µL yıkama solüsyonu 2/3 önceki gibi filtre kartuşundan santrifüj yardımı ile süzdürüldü ve bu işlem 2 defa yapıldı sonrasında atık atıldıktan sonra filtre son kez boş şekilde 1 dakika santrifüjlendi kalıntının tamamen süzülmesine dikkat edildi ve sonrasında filtre yeni bir ependorf tüpe yerleştirildi. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen filtre kartuşunun tam orta noktasına önceden ısıtılmış olan (95 °C) 100 µL Elüsyon Solüsyonu uygulandı maksimum hızda ~ 20–30 saniye santrifüjlendi. Süzülen kısım qubit4 cihazı ile elde edilen miRNA değerleri ölçüldü. Öncelikle birinci basamakta 199 µl miRNA tamponuna 1 µl miRNA Reagent (Qubit microRNA Assay, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) eklenerek toplamda 200 µl olan 2 adet çalışma solüsyonu hazırlandı. Öncelikle cihaza 2 adet standart tanıtımı yapılarak cihaz hazır hale getirildi. Tanıtılan standartlardan 190 µl çalışma solüsyonu üzerine 10 µl standart 1 eklenerek birinci standart hazırlandı ve yine 190 µl çalışma solüsyonu üzerine 10 µl standart 2 eklenerek ikinci standart hazırlandı ve cihaza standartlar sırayla tanıtıldı. Her bir örneğin ölçümünde 198 µl çalışma solüsyonu üzerine 2 µl örnek eklenerek toplam hacim 200 µl olan karışım elde edilerek Qubit4 cihazda okuma yapıldı ve elde edilen miRNA miktarı belirlendi.

2.2.2. cDNA Sentezi Protokolü

cDNA eldesi için 0.2 ml'lik uygun boyuttaki bir mikrosantrifüj tüpünde Reverz Traskriptaz Reaksiyonu aşağıdaki Tablo 2.1'de cDNA sentezi içeriği protokole göre hazırlandı.

Tablo 2.1. cDNA sentezi içeriği

Madde	Her bir örnek için
100 mM dNTP	0,15 µL
MultiScribe TersTranskriptaz, 50 U / µL	1,00 µL
10× Ters Transkripsiyon Tamponu	1,50 µL
RNaz İnhibitörü, 20 U / µL	0,19 µL
Nükleaz içermeyen Su	4,16 µL
Total hacim	7,00 µL

Her bir kuyucuğa 7 µL RT Reaksiyon Miksi ve 10 µL toplam RNA içerecek şekilde eklendi. Hassas bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra içeriğin tüpün altında toplanması için tüplere kısa süre dikkatli bir şekilde spin atırıldı. Her reaksiyon tüpüne 3 µL 5× RT Primer eklenerek toplam hacim 20 µL ye tamamlandı.

Çalışmada kullanılan mikroRNA primerlerine ait sekans dizinleri ve gen bilgileri aşağıda verilen Tablo 2.2’de miRNA sekans ve genID’leri olarak verilmiştir.

Tablo 2.2. miRNA sekans ve genID

miRNA	Stem-loop (5'→3')	Gen ID
miR-21	UGUACCACCUUGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGA UGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACAGCAGUC GAUGGGCUGUCUGACAUUUUGGUAUC	NR_031823.1
miR-107	UUCUCUCUGCUUUAAGCUUCUUUACAGUGUUGC CUUGUGGCAUGGAGUUCAAGCAGCAUUGUACAG GGCUAUCAAAGCACAGAGAGC	NR_031863.1
miR-122	CCUUAGCAGAGCUCUGGAGUGUGACAAUGGUGU UUGUGUCCAAAACAUCAAACGCCAUCACACAC UAAACAGCUACUGCUAGGC	NR_031864.1
U6 snRNA	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGG AACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGC AAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATA TTTT	NR_004394

Reaksiyon tüplerinin kapakları iyice kapatıldı. Reaksiyon içeriğini tüplerin altında toplamak için kısa süre tekrar dikkatlice spin atırıldı. Soğuk zincire uygun bir şekilde buz üzerine konarak termal döngü protokolü aşağıdaki tablodaki sürelerle göre hazırlandı ve Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazına Tablo 2.3’te termal döngü protokolüne göre yerleştirildi.

Tablo 2.3. Termal döngü protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre
Reverz transkription	16°C	30 dak
	42°C	30 dak
Durma reaksiyonu	85°C	5 dak
Bekleme	4°C	Bekleme

2.2.3. RT-PCR Örnek Tüplerinin Hazırlanması

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için Tablo 2.4'te miRNA reaksiyon miksi RT-PCR için stok şeklinde hazırlanması verilmiştir.

Tablo 2.4. miRNA reaksiyon miksi RT-PCR için stok şeklinde hazırlanması

Bileşenler	Her bir reaksiyon için hacim 0,1 ml 1 tüp için
TaqMan small RNA Testi (20X)	0,50 µL
PCR Master Mix	5,00 µL
Nükleaz içermeyen su	3,84 µL
Total PCR Reaksiyon Miks hacmi	9,34 µL

Uygun hacimde PCR için reaksiyon karışımını bir optik reaksiyon tüpleri içerisine aşağıdaki gibi eklendi.

- Her bir tüpe (0,1 mL): 9,34 µL reaksiyon miksi kendi reaksiyonundan
- Her bir tüpe (0,1 mL): 0,67 µL cDNA örneği
- Her bir negatif kontrol tüpüne (0,1 mL): 0,67 µL Nükleaz içermeyen su eklendikten sonra RT-PCR cihazında total hacim 10 µL olarak ayarlanarak Tablo 2.5'te RT-PCR cihazının kurulması işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 2.5. RT-PCR cihazının kurulması

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
UNG aktivasyonu	50 °C	2 dak	1
Enzim aktivasyonu	95 °C	10 dak	1
Denature	85 °C	15 saniye	40
Ekleme/Uzatma	60 °C	60 saniye	

Sonuçlar U6 snRNA ekspresyonu baz alınarak normalize edildi. Elde edilen Ct değerlerinden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak fold change oranları hesaplandı.

2.2.4. Western Blot Analizi

Beyin dokusuna ait her grubu temsil eden örnekler homojenize edilerek homojenatların içerdiği toplam protein miktarları hesaplandı ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot tekniği kullanılarak PI3K, Akt, Nrf2, HO1, NF- κ B, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin seviyeleri tespit edildi.

2.2.5. Beyin Dokusu Örneklerinin Homojenizasyonu

Western blot analizleri için -80°C derin dondurucuda bekletilen beyin dokularından soğuk zincire uygun bir şekilde hedef bölge olan hipokampus kısmı alınarak grubu üyelerini temsil edecek şekilde 200±5 mg hassas terazide tartıldı. Daha sonra ağırlık/hacim oranı 1/6 (w/v) olacak şekilde homojenizasyon buffer [10 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, 0.1mM NaCl, 5µM soybean (Sigma, St. Louis, MO, USA) ve %1'lik SDS] solüsyonunda cam homojenizatör ve sonrası sonikasyon kullanılarak işlemler soğuk zincire uygun şekilde (proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek için) homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüj cihazında (Hettich, universal 320 R, Germany) +4°C'de 15.000 rpm'de 60 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından protein içeren kısım olan süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınarak katı olan pellet kısmı atıldı. Beyin dokusuna ait süpernatant içerisine 1/1 oranında %10 SDS, 5 ml 0.5 M Tris (pH 6.8), %5'lik Gliserol, %25 β -Merkoptoetonol, %0.05 Bromophenol blue, 3.245 ml dH₂O içeriğinden oluşan sample buffer eklenerek vortekslandı. Daha sonra kaynamakta olan yaklaşık 100°C' de su banyosu içerisinde 7 dakika süresince bekletildi. Bu işlemde sonra her grup doku örneğine ait toplam protein içeriğini hesaplamak için bir nanodrop spektrofotometre cihazı (MaestroGen, Las Vegas, NV) kullanıldı. Elde edilen homojenatlar SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapılmaya kadar -80°C'de beklemeye alındı.

2.2.6. SDS-PAGE Analizleri

Jel oluşturmak için 10 ml'lik %12'lik; 3.35ml dH₂O, 2.5ml 1.5 M Tris (pH 6.8), 100µl %10 SDS, 4ml Akrilamid (bis %30), 75µl APS, 15µl TEMED içeriğinden oluşan ayırma (resolving) jel solusyonu hazırlandı. Daha sonra solusyon karıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Bu işlemde sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi. Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli (Stacking) %4; 6.1ml dH₂O, 2.5ml 0.5 M Tris (pH 6.8), 100µl %10 SDS, 1.3ml Akrilamid (bis %30), 60µl APS, 12µl TEMED içeriğinden oluşan solüsyon hazırlandı. Bu işlemde sonra hazırlanan jel solusyonu karıştırılarak tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. 10–15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı ve cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Hazırlanan karışımdan 10–20 µl kadar

transfer edildi ve tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi. Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) 20 mA'lık akım elektroforeze verildi. 30 dakika sonra voltaj değeri 40 mA yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra aradaki jel çıkarıldı. Elde edilen jelin stacking kısmı kesilip atıldı ve bantlaşmanın gerçekleştiği resolving jel kısmı, çalışmanın blotlama aşamasını yapmak üzere hazırlandı.

2.2.7. Western Blot Protokolü

Western blot analizleri Sahin ve arkadaşlarına (2018) göre yapıldı. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama) için, SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde filtre kâğıtlarının arasında karşı karşıya getirildi. Akım yönü (-) kutuptan (+) kutba olacak şekilde hazırlanan sandviçin yarı kuru transfer sisteminde (Thermo Fisher Scientific, China) 1.2A 25V sabit akımda 10 dk boyunca transferi gerçekleştirildi. Bu şekilde proteinlerin transferi nitroselüloz membrana sağlanmış oldu.

Daha sonra nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama) için, blotlama işleminden sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla yani fosfat buffer saline ile (PBS) [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 10 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda %1'lik BSA (taze sığır serum albumini) ile 37°C'de 90 dakika blokladı. Daha sonra yıkama yapılmadan primer antikor ile muamele işlemine geçildi. Özgül antikorlarla tepkime işleminde primer antikorlar olarak; PI3K, Akt, Nrf2, HO1, NF- κ B, Bax, Bcl-2 ve Caspase-3 antikorları kullanıldı. Primer antikorlar 1:1000 oranında %0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda hazırlanarak kullanıldı. Primer antikorları ile +4°C'de, nitroselüloz membranlar gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Nitroselüloz membranlar 3 kez PBS buffer solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar %0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti- mouse immünoglobulinle 37°C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Nitroselüloz membranlar 3 kez PBS buffer ile yıkandı. Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda %0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanılarak yapıldı. DAB solüsyonunun içerisine eklenen 80 μl H_2O_2 reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice dH_2O ile yıkandı.

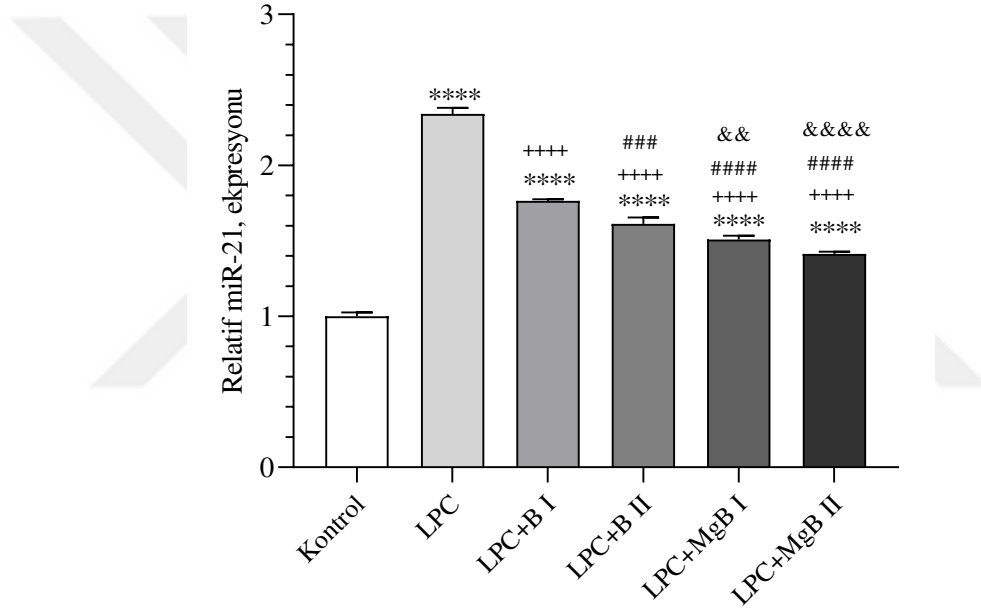
Bu işlemden sonrabantlar rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.3. İstatistiksel Analizler

Veriler IBM SPSS (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, New York, A.B.D.) ve GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Bütün sonuçlardaki veriler ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SD) olarak verildi ve $p<0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi. Yapılan analizlerdeki, veriler parametrik veya nonparametrik durumuna göre belirlendi. Veri dağılımlarının normalliğini belirlemek için Shapiro-Wilk testi ya da skewness ve kurtosis değerleri kullanılırken, varyans homojenliğini test etmek için ise Levene testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis ve Bonferonni düzeltmeli Mann-Whitney U ($p<0.01$) ile test edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ile test edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar yapılırken varyans homojenliğine sahip veriler için post hoc olarak Tukey's testi, varyansları homojen olmayan veriler için ise Tamhane testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon analizi kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesinin miR-21 ekspresyonunun etkileri aşağıdaki Şekil 3.1’de farklı biyotin formlarında miR-21 ekspresyonu gösterilmiştir. Sıçanların beyin dokusundaki miR-21 ekspresyonu kontrol grubuna göre yükselme görülürken Biotin ve MgB formlarının takviye olarak verildiği gruplarda ise LPC grubuna göre düşme görülmektedir. LPC grubuna göre karşılaştırıldığında LPC+B I ($p<0.0001$); LPC+B II ($p<0.0001$); LPC+MgB I ($p<0.0001$); LPC+MgB II ($p<0.0001$) grupları arasında istatistiksel olarak fark vardır. LPC+MgB II grubu tedavi grupları içerisinde en etkili istatistiksel farklılık göstermesine rağmen LPC+MgB I ile arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur.

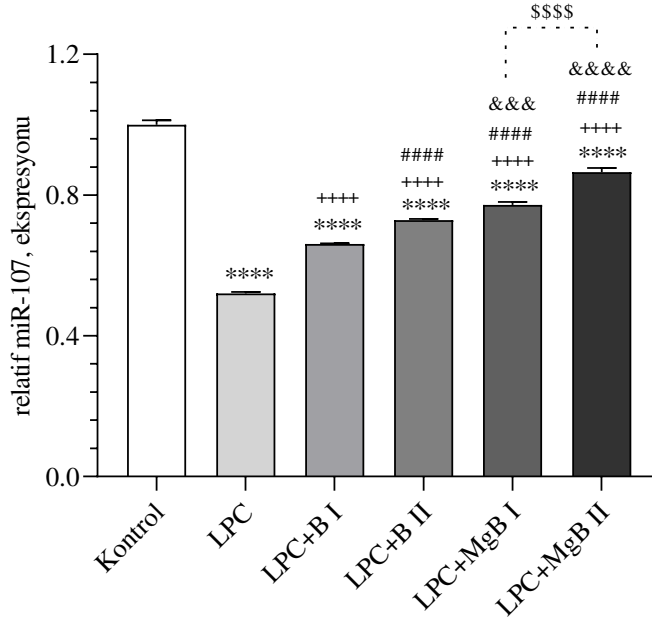


Şekil 3.1. Farklı Biotin formlarında miR-21 ekspresyonu

Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p<0.0001$), LPC grubu; (### $p<0.001$, #### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (&& $p<0.01$, &&&& $p<0.0001$), LPC+B II grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir. LPC: Lizolesitin, LPC+B I: Lizolesitin + Biotin I, LPC+B II: Lizolesitin+Biyotin II, LPC+MgB I: Lizolesitin+Magnezyum biyotinat I, LPC+MgB II: Lizolesitin+Magnezyum biyotinat II

LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesinin aşağıdaki Şekil 3.2’de farklı biyotin formlarının miR-107 ekspresyonu üzerine olan etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubu ile diğer grupların miR-107 ekspresyonu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı

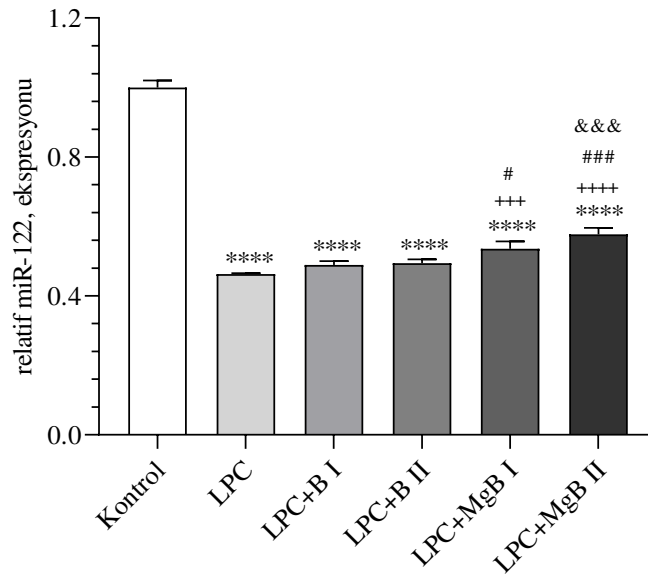
bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. LPC grubuna göre tedavi grupları arasında LPC+B I ($p<0.0001$); LPC+B II ($p<0.0001$); LPC+MgB I ($p<0.0001$); LPC+MgB II ($p<0.0001$) istatistiksel olarak fark vardır. miR-107 ekspresyonunu LPC+MgB II grubu diğer tedavi gruplarına istatistiksel farklılık ($p<0.0001$) göstermektedir.



Şekil 3.2. Farklı Biyotin formlarının miR-107 ekspresyonu

Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p<0.0001$), LPC grubu; (#### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (&&&& $p<0.0001$), LPC+B II; (\$\$\$\$ $p<0.0001$), LPC+MgB I grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

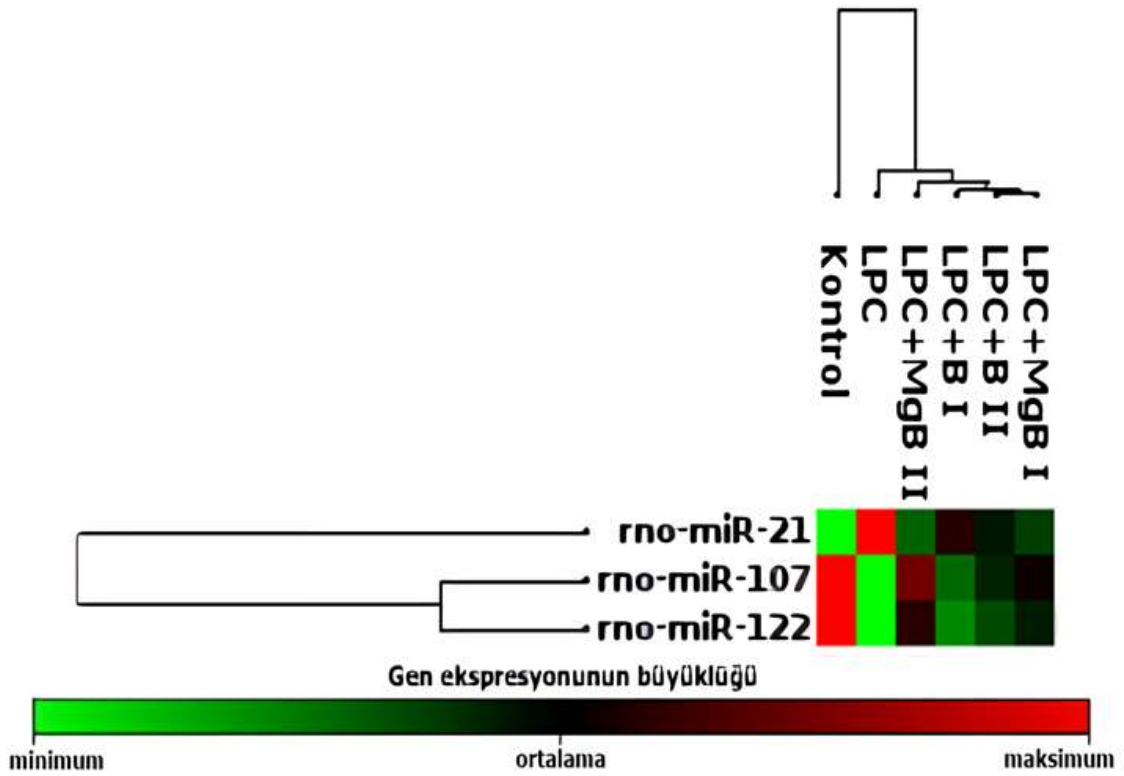
LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesinin aşağıdaki Şekil 3.3'te farklı biyotin formlarının miR-122 ekspresyonu üzerine etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubu ($p<0.0001$) ile diğer grupların miR-122 ekspresyonu düzeyleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmesine rağmen LPC grubu ile LPC+B I ve LPC+B II grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur. LPC grubu ile LPC+MgB I ($p<0.001$) iken LPC+MgB II ($p<0.0001$) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur. LPC+B I grubuna göre ise LPC+B II, arasında fark bulunmamasına rağmen LPC+MgB I ($p<0.05$) ve LPC+MgB II ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. LPC+B II grubuna göre LPC+MgB I ile arasında İstatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır LPC+MgB II ($p<0.001$) ise istatistiksel olarak fark bulunmuştur. LPC+MgB I ile LPC+MgB II arasında İstatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır.



Şekil 3.3. Farklı Biyotin formlarının miR-122 ekspresyonu

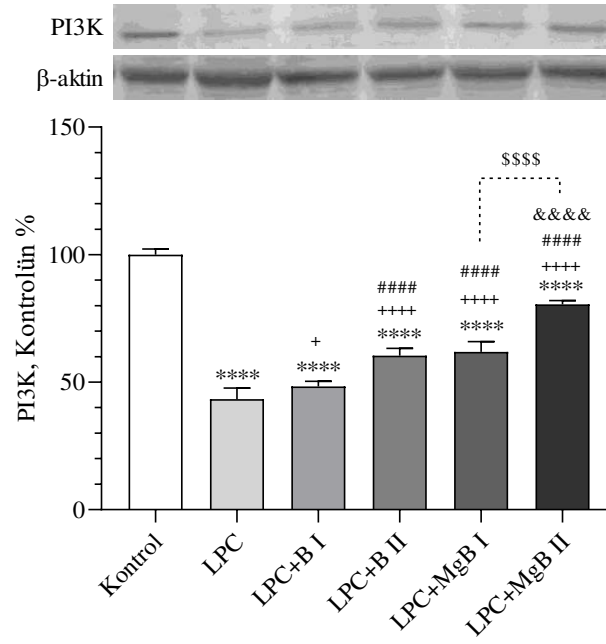
Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (+++ $p<0.001$, ++++ $p<0.0001$), LPC grubu; (# $p<0.05$, ### $p<0.001$), LPC+B I grubu; (&&& $p<0.001$), LPC+B II; grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biyotin ve MgB takviyesinin Şekil 3.4'te miR-21, miR-107 ve miR-122 ekspresyonun gruplara göre ısı haritası gösterilmiştir. Gen ekspresyonunun büyüklüğü yeşilden kırmızıya doğru artmaktadır. Gruplara göre miRNA'ların ekspresyonu değişkenlik göstermektedir. Kontrol grubu ile LPC grupları arasındaki ekspresyon düzeyleri en uçlarda yer almakta iken tedavi gruplarında bu farklılığın düzeylerinin azaldığı görülmektedir. Verilen şekilde LPC+MgB II grubunun kullanılan miRNA'lardaki ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna en yakın düzeyde olduğu görülmektedir.



Şekil 3.4. miR-21, miR-107 ve miR-122 ekspresyonunun gruplara göre ısı haritası

LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesinin aşağıdaki Şekil 3.5'te farklı biyotin formlarının PI3K üzerine etkileri gösterilmiştir. Sıçanların beyin dokusundaki PI3K düzeyinde kontrol grubuna göre düşme görülürken Biotin ve MgB formlarının takviye olarak verildiği gruplarda ise LPC grubuna göre artış görülmektedir. LPC grubu ile LPC+B I ($p<0.05$); LPC+B II ($p<0.0001$); LPC+MgB I ($p<0.0001$) ve LPC+MgB II ($p<0.0001$) grupları arasında doza bağlı olarak yüksek doz biyotin gruplarında önemli bir şekilde artış görüldüğü gibi istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık göstermiştir. LPC+B II ve LPC+MgB I grupları arasında bir istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Bunun sebebi Mg'nin Biotin biyoyararlanımını arttırarak düşük doz biyotinden yüksek oranda biyoyararlanım sağlayabileceğinden olabilir.

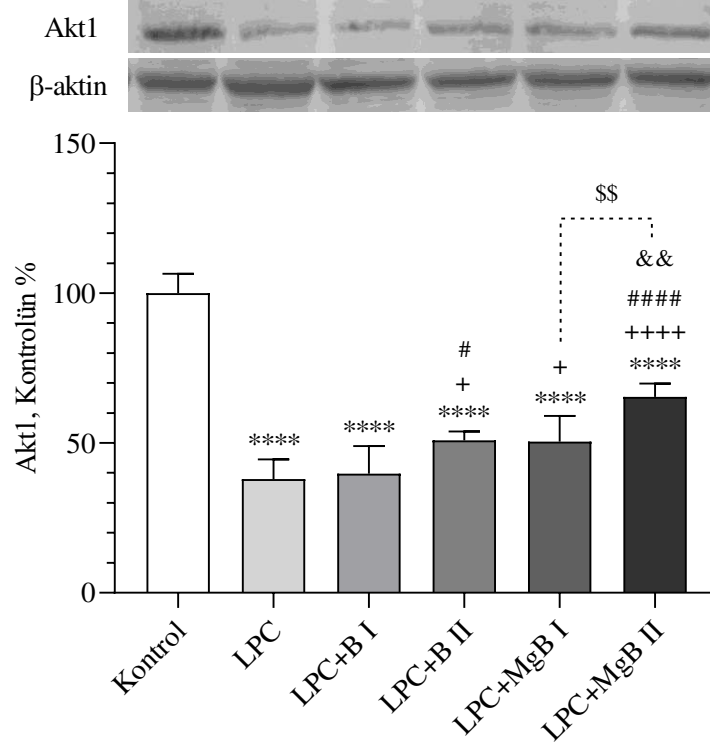


Şekil 3.5. Farklı Biotin formlarının PI3K üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 kez tekrar olarak yapılmıştır Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (+ $p<0.05$,++++ $P<0.0001$), LPC grubu; (#### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (&&&& $p<0.0001$), LPC+B II; (\$\$\$\$ $p<0.0001$), LPC+MB I grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

LPC ile MS deneysel modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesi Şekil 3.6'da farklı biyotin formlarının Akt1 üzerine etkileri gösterilmiştir. Sıçanların beyin dokusundaki Akt1 düzeyinde kontrol grubuna göre protein seviyelerinde azalma görülürken Biotin ve MgB formlarının takviye olarak verildiği gruplarda ise LPC grubuna göre nispeten artış görülmektedir. LPC grubu ile LPC+B I grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, LPC grubu ile LPC+B II ($p<0.05$), LPC+MgB I ($P<0.05$) ve MgB II'nin ($p<0.0001$) grupları arasında doza bağlı olarak yüksek doz biyotin gruplarında önemli bir şekilde artış görüldüğü gibi istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık göstermiştir. LPC+B II ve LPC+MgB I grupları arasında bir istatistiksel olarak fark yoktur. Bunun

sebebi Mg'nin Biotin biyoyararlanımını arttırarak düşük doz biyotinden yüksek oranda biyoyararlanım sağlayabileceği olabilir.

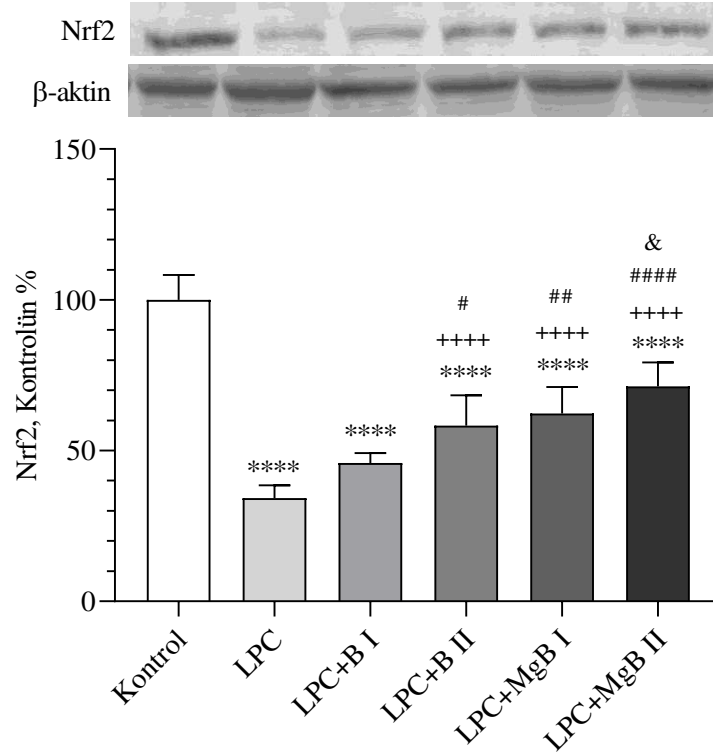


Şekil 3.6. Farklı Biotin formlarının AKT1 üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 kez tekrar olarak yapılmıştır. Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** p <0.0001), Kontrol grubu; (* p <0.05), (++++ p <0.0001), LPC grubu; (# p <0.05, ##### p <0.0001), LPC+B I grubu; (&& p <0.001), LPC+B II grubu; (\$\$ p <0.01), LPC+MB I grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

Sıçanlarda LPC ile oluşturulan MS modelinde farklı Biotin ve MgB takviyelerinin Şekil 3.7’de farklı biyotin formlarının Nrf2 üzerine etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla diğer grupların beyin Nrf2 düzeyleri azalmıştır. En düşük beyin Nrf2 düzeyi LPC grubunda tespit edilmiş ve doza bağlı olarak sırayla LPC+B I, LPC+B II, MgB I ve MgB II gruplarında artış göstermiştir. Biotin dozundaki artış istatistiksel olarak bir fark oluşturmaya rağmen (p <0.05) MgB

kombinasyonunun dozundaki artış fark oluşturmamıştır ($p>0.05$). Beyin Nrf2 düzeyinin yükseltilmesinde en etkili grubun MgB II olduğu tespit edilmiştir.

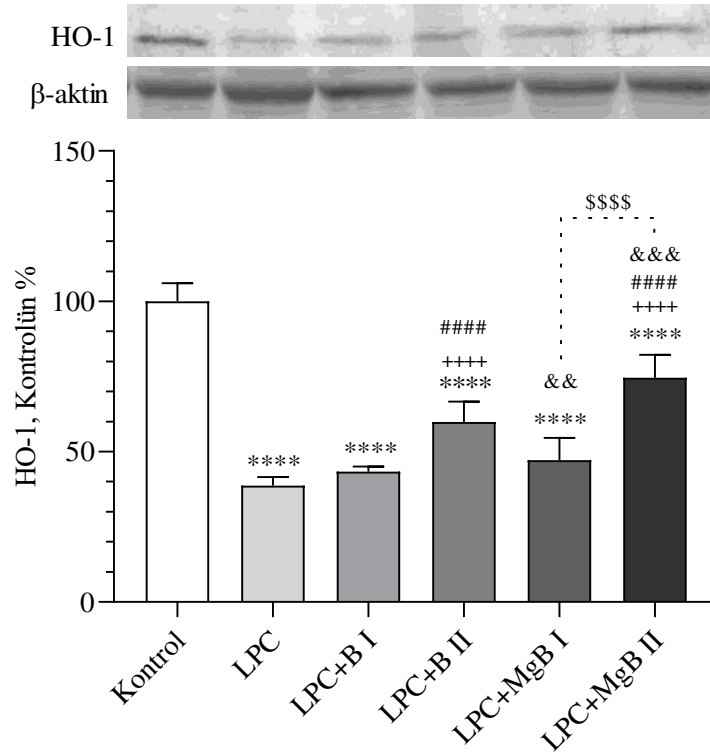


Şekil 3.7. Farklı Biotin formlarının Nrf2 üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 kez tekrar olarak yapılmıştır Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*, +, #, &, \$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p<0.0001$), LPC grubu; ($p<0.05$, ## $p<0.01$, #### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (& $p<0.05$), LPC+B II grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

LPC ile MS oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesinin Şekil 3.8’de farklı biyotin formlarının HO-1 üzerine etkileri gösterilmiştir. Beyin dokusu HO-1 düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edildi. LPC ile MS oluşturulan sıçanlarda beyin HO-1 düzeyi kontrol grubuna göre düşük bulundu. Biotinin düşük dozlarda tek başına veya kombinasyon halinde uygulamalarında HO-1 düzeylerinde etkili olamazken yüksek dozları etkili oldu. HO-1 düzeyleri üzerine en etkili grubun LPC+MgB II olduğu tespit edildi. LPC+B I ile LPC+B II grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0.0001$). LPC+B II ile LPC+MgB I grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak

anlamli bir fark tespit edildi ($p<0.01$). LPC+MgB I ile LPC+MgB II grubu arasinda yapilan karšılařtırmada istatistiksel olarak anlamli bir fark tespit edildi ($p<0.0001$).

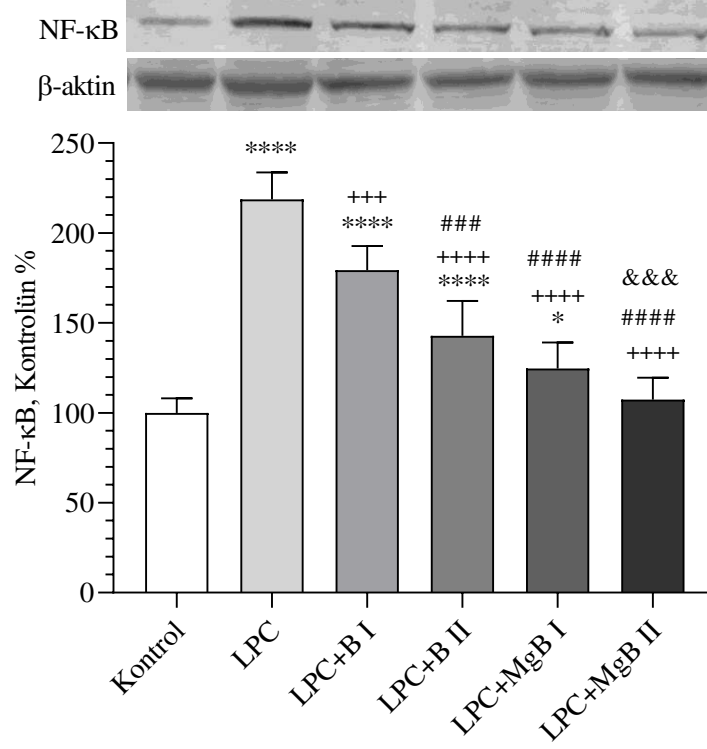


Şekil 3.8. Farklı Biotin formlarının HO-1 üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 tekrar olarak yapılmıştır Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karšılařtırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (**** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p<0.0001$), LPC grubu; (#### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (&& $p<0.01$, &&& $p<0.001$), LPC+B II grubu; (**** $P<0.0001$), LPC+MgB I grubu ile karšılařtırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

Sıçanlarda LPC ile oluşturulan MS modelinde farklı Biotin ve MgB takviyelerinin Şekil 3.9’da farklı biyotin formlarının NF- κ B üzerine etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubuyla diğer grupların beyin NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuş ($p<0.05$) ancak MgB II grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Diğer gruplar ile karšılařtırıldığında en düşük beyin NF- κ B düzeyi MgB II grubunda olduğu tespit edilmiştir. LPC ile diğer grupların beyin NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Biotin I grubuyla diğer grupların beyin NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Biotin II grubuyla diğer grupların beyin NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuş ($p<0.001$) ancak MgB I grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). MgB I grubuyla diğer grupların beyin NF- κ B

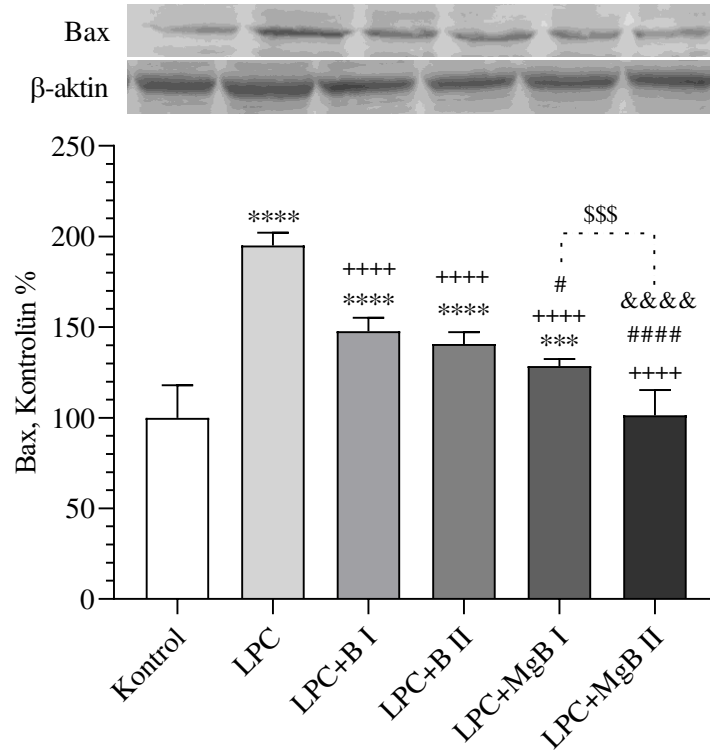
düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). MgB II grubuyla diğer grupların beyin NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuş ($p<0.001$) ancak kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 3.9. Farklı Biotin formlarının NF- κ B üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 tekrar olarak yapılmıştır. Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (* $p<0.05$, **** $p<0.0001$), Kontrol grubu; (+++ $p<0.001$, ++++ $p<0.0001$), LPC grubu; (### $p<0.001$, #### $p<0.0001$), LPC+B I grubu; (&&& $p<0.001$), LPC+B II grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

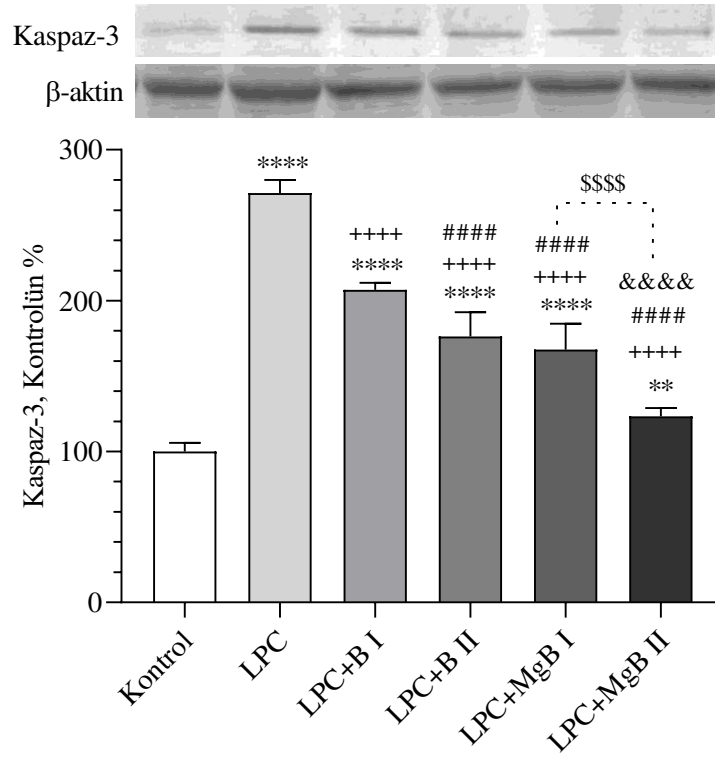
LPC ile MS modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesi Şekil 3.10'da farklı biyotin formlarının Bax üzerine etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubu ile diğer grupların Bax düzeyleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmesine rağmen LPC+MgB II grubu arasında fark yoktur. LPC grubu ile tedavi grupları kıyas edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Tedavi grupları arasında doza bağlı olarak LPC+B I ve LPC+B II arasında fark yok iken LPC+MgB I, LPC+MgB II arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Tedavi grupları arasında en etkili cevap LPC+MgB II grubunda alınmıştır.



Şekil 3.10. Farklı Biotin formlarının Bax üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 tekrar olarak yapılmıştır. Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*,+,#,&,\$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p < 0.0001$), LPC grubu; (# $p < 0.05$, #### $p < 0.0001$), LPC+B I grubu; (&&&& $p < 0.0001$), LPC+B II grubu; (\$\$\$ $p < 0.001$), LPC+MgB I grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir. Bax: Bcl-2-ilişkili X proteini

LPC ile MS modeli oluşturulan sıçanlarda Biotin ve MgB takviyesi Şekil 3.11’de farklı biyotin formlarının Bcl-2 üzerine etkileri gösterilmiştir. Kontrol grubu ile diğer grupların Bcl-2 düzeyleri kıyaslandığında düşüş tespit edilmiştir. LPC grubu ile tedavi grupları kıyas edildiğinde LPC+B I fark olmamasına rağmen sırasıyla LPC+B II ($p < 0.05$), LPC+MgB I ($p < 0.0001$), LPC+MgB II ($p < 0.0001$) grupları arasında fark vardır. LPC grubu tedavi grupları içinde doza bağlı LPC+B I ve LPC+B II arasında fark yokken LPC+MgB I, LPC+MgB II grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.



Şekil 3.12. Farklı Biotin formlarının kaspaz-3 üzerine etkileri

Blotlama işlemi en az 3 tekrar olarak yapılmıştır. Eşit protein yüklemesini sağlamak için dâhil edilen aktin ile Western blot analizi yapıldı. Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilen tüm veriler, tek yönlü ANOVA ile çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey *post hoc* analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark, (*, +, #, &, \$) farklı sembollerle gösterilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık ($p < 0.01$ **** $p < 0.0001$), Kontrol grubu; (++++ $p < 0.0001$), LPC grubu; (##### $p < 0.0001$), LPC+B I grubu; (&&&& $p < 0.0001$), LPC+B II grubu; (\$\$\$\$ $p < 0.0001$), LPC+MgB I grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

Aşağıdaki verilen Tablo 3.1’de hedef protein düzeyleri arasındaki ilişki görüldüğü üzere PI3K, Akt1, Nrf2, HO1 ve Bcl2 arasında kuvvetli derecede pozitif yönlü korelasyon tespit edilirken ($p < 0.01$), bu proteinler ile Bax, NF- κ B ve Kaspaz-3 arasında ise kuvvetli derecede negatif yönlü korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Benzer şekilde NF- κ B, Bax ve kaspaz-3 arasında da kuvvetli derecede pozitif yönlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$).

Tablo 3.1. Hedef protein düzeyleri arasındaki ilişki

Proteinler	Akt1	Nrf2	HO1	NF-κB	Bax	Bcl2	Kaspaz-3
PI3K	0.933**	0.905**	0.936**	-0.832**	-0.829**	0.950**	-0.914**
Akt1		0.876**	0.883**	-0.712**	-0.693**	0.939**	-0.813**
Nrf2			0.850**	-0.806**	-0.782**	0.897**	-0.865**
HO1				-0.734**	-0.791**	0.914**	-0.822**
NFκB					0.881**	-0.741**	0.902**
Bax						-0.775**	0.922**
Bcl2							-0.847**

Veriler pearson korelasyon katsayılarını (r) göstermektedir.

** $p < 0.01$

Dünya Sağlık Örgütü, önümüzdeki 20 yıla kadar temel olarak motor fonksiyonları etkileyen nörodejeratif hastalıkların kansere yakalanma oranını geçerek kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yaygın ölüm nedeni olacağını tahmin ettiğinden, nörodejeratif hastalıklar için tedavi ihtiyacı hayati bir önem taşımaktadır [209]. MS, T hücrelerinin MSS antijenlerini tanıyarak otoreaktif hale geldiği MSS'in otoimmün inflamatuvar bir hastalığıdır [210]. Aşırı nöroenflamasyon; aksonal kayba, sinyal iletim disfonksiyonuna ve nörodejenerasyona neden olabilmektedir. Bu durum MS dâhil nörolojik hastalıkların çoğunda ayırt edici özelliktir [211]. Hastalığın seyri tahmin edilememekte ve başlangıcından zamanla ilerleyici hale gelen geri dönüşümlü nörolojik defisitlerle karakterizedir. MS için net bir tedavi yöntemi henüz bulunamamış olmakla birlikte, hastalığın semptomlarını ve ilerlemesini azaltmak için hâlihazırda onaylanmış tedaviler bulunmaktadır. Nörodejeratif hastalıklar tedavi edilemez ve hastaların genel yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Kontrollü deneyler ile kabul görmüş tedavi yöntemleri ise çoğunlukla semptomatik ve hastalığın seyrini durdurma hususlarında avantajlar göstermiştir. Ne yazık ki, nörodejenerasyon sonucu oluşan fiziksel hasarı tamamen geri döndürebilecek herhangi bir ilaç tedavisi henüz bulunamamıştır [212].

Magnezyum eksikliği, stres etkisine ve stres tarafından üretilen fizyolojik hasara karşı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır. Stres sonucunda, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenini ve sempatik sinir sistemini harekete geçirmektedir [213]. Mg, sinirsel iletimde kilit rol oynayan kalsiyum ve potasyum iyonlarının taşınmasında, kas kasılmasında ve kalp ritminin korunmasında rol oynamaktadır. Ayrıca Mg eksikliği birçok nörolojik bozukluğa sebep olmaktadır [214]. Mg, bilişsel fonksiyonlar dâhil olmak üzere vücutta birçok işlevde yer almakta ve son yıllarda Mg eksikliğinden dolayı migren, depresyon, epilepsi ve potansiyel olarak demans riski ile ilişkili olduğundan, Mg' ye olan ilgi artmış [213, 214] ve hayvan demans modellerinde nöroprotektif

etkiler göstermiştir. Ancak magnezyumun nörolojik hasarları önleyebileceği mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır [215–218].

Biyotin, miyelin onarımını ve sentezini artırmak için asetil-CoA-, 3-metilkrotonil-CoA-, propiyonil-CoA- ve piruvat karboksilazları aktive edebilir ve nörodejenerasyonu önlemek için gerekli olabilecek ATP üretimini artırabilir [219]. B7 vitamini olarak da bilinen biyotin, besinlerin enerjiye metabolize edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. MgB, D-Biyotin'den çok daha fazla çözünür olduğu gösterilen yeni bir biyotin bileşiğidir. Klinik öncesi yapılan farmakokinetik çalışmasında, MgB'nin zamanla kan dolaşımına ve dokularda, özellikle ise beyinde iyi emildiğini gösterilmiştir [97].

Bu çalışmada, nörodejeneratif hastalık modellerinden olan multiple sklerozun deneysel olarak oluşturulduğu sıçanlarda farklı biyotin formlarının beyin dokusunda miR-21, miR-107 ve miR-122 relatif mikroRNA ekspresyon düzeyleri ile PI3K, AKT1, Nrf2, HO-1, NF-κB, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Lizolesitin uygulanarak oluşturulan demiyelinizasyonun miR-21 düzeyinin, kontrol ve tedavi gruplarına göre LPC grubunda belirgin bir şekilde artmasının yanı sıra istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmuştur. miR-107 ve miR-122 de ise miR-21 in aksine kontrol ve tedavi gruplarına göre LPC grubunda belirgin bir şekilde düşerken yine istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farklar olduğu görülmüştür. PI3K, AKT1, Nrf2, HO-1 ve Bcl-2 protein düzeylerinde kontrol ve tedavi gruplarına göre LPC gruplarının düzeyleri düşerken gruplar arası farklılık doza bağlı olarak değişmekte ve istatistiksel farklar görülmektedir. NF-κB, Bax ve Kaspaz-3 protein düzeylerinde ise kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla LPC grubuna protein seviyeleri artmıştır. Gruplar arasında ise yine doza bağlı olan farklı biyotin formlarında farklılık görülürken istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. LPC aracılığı ile demiyelinizasyon oluşturulan *in vitro* MS modelindeki sıçanların tedavi gruplarına takviye olarak verilen biyotin formlarından özellikle yüksek doz biyotin grupları dikkat çekmektedir. Mg ile birlikte verilen yüksek doz biyotin kombinasyonu ise demiyelinizasyon hasarının azalmasında en etkili olarak görülür. Bunun yanı sıra yüksek doz biyotin formunun tek başına dahi yapmış olduğu olumlu etkinin göz ardı edilemez olduğu da görülmektedir.

MiRNA'lar, ökaryotik hücrelerde protein ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlamayan RNA'ların büyük bir sınıfıdır [220]. Genetikte, miRNA' lar gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar, yaklaşık olarak 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülü türüdür, birçok organda önemli görevleri bulunduğu gibi beyinde de hayati düzeyde modülasyonu sağlamaktadır [221]. Son çalışmalar, periferik dolaşımdaki miRNA'ların, nörodejeneratif hastalıklar da dâhil olmak üzere hastalıkların değerlendirilmesi için önemli biyobelirteçler olduğunu ileri sürmektedir. Nörodejeneratif hastalarda, spesifik miRNA'lar, kan ve interstisyel sıvılar gibi vücut sıvılarında farklı şekilde eksprese edilmektedir [222]. Endojen

miRNA'lar, beyin ve diğer organlarda birçok hastalıkla doğrudan ilişkisi olan kritik nöroprotektif işlevler gerçekleştirmektedir [222–224].

Nörodejeneratif hastalıklar halk sağlığı yönetimindeki önemi giderek artmaktadır ve bunların ortaya çıkmasında çevresel ve kalıtsal faktörlerin gerçek rolü hala belirsizliğini korumaktadır. MiRNA, düzenleyici ağı önemli ölçüde etkileyebilir. MiRNA'ların karmaşık çeşitliliği ve gen düzenleme kapasitesi, çevresel durumlara yüksek oranda uyarlanabilen nöronların işlevsel olarak uzmanlaşması gibi çok kompleks bir organ olan özellikle beyinde değerlidir. Ayrıca, miRNA'nın rolü, çevre tarafından toksik ve mutajenik maddelere maruz kalmanın bir etkisi olarak nörolojik hastalıklarda gösterilmektedir [222].

MikroRNA'lar, nöronal farklılaşma, hayatta kalma ve aktivite için çok önemli olan gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileridir. MikroRNA biyogenezinin yaşa bağlı düzensizliği, hücresel strese karşı nöronal kırılganlığı arttırmakta ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Tüm majör nörodejeneratif bozukluklar, koruyucu tedaviler için potansiyel bir hedef olarak yaygın olarak kabul edilen oksidatif stres ile de ilişkilidir. Genellikle ayrı düşünülse de, miRNA ağları ve oksidatif stres, nörodejeneratif süreçlerde ayrılmaz bir şekilde iç içedir [225]. MiRNA'lar, MS'de ortaya çıkan bağışıklık düzenlemesini anlamamızda yeni bir perspektif sağlamaktadır. Hücre dışı miRNA'ların rolü ve biyolojilerinin hala tam olarak anlaşılamamış olan büyüleyici yönleri çıkmaya devam etmektedir. Yakın zamana kadar, çoğu çalışma biyolojik sıvılarda serbest yüzen hücre dışı miRNA'ların analizine odaklanmıştır [226].

Yapılan bir çalışmada MS hastalarında miRNA'nın ekspresyon profili araştırılmış ve çok sayıda farklı düzeylerde eksprese edilmiş genler tanımlanmıştır. Manian ve arkadaşları (2021) tarafından, sağlıklı kontrollere kıyasla MS hastalarında miR-21 ekspresyonunun yukarı regüle şeklinde düzenlendiğine dair güçlü kanıtlar bulunmuştur. miR-21'in işlevi nispeten iyi çalışılmış olmasına rağmen, MS hastalığının gelişimi ve ilerlemesindeki rolü belirsizliğini korumaktadır [41]. Junker ve arkadaşları (2009), aktif MS lezyonlarında en fazla yukarı regüle edilen yirmi miRNA'dan aralarında miR-21 inde bulunduğu sekiz miRNA'nın Integrin ile ilişkili protein olarak bilinen CD47'yi hedeflediğini tahmin etmektedirler [227]. MiR-21'in Travmatik Beyin Hasarı (TBI) daki rolüne ilişkin bilimsel raporlar tartışmalıdır. Çeşitli çalışmalar, miR-21'in hipokampal seviyesinin TBI'dan 1-3 gün sonra arttığını göstermektedir [227–229]. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, TBI sonrası miR-21'in yükselmesi, hipokampal nöronların morfolojisini değiştirerek uzamsal öğrenme ve hafıza tutma üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. TBI ile de önemli seviyede ilişkilendirilen miRNA'lardan olan miR-21, beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde ve hücre dışı eksozomlarda miR-21 yukarı regüle edilmektedir. Harrison ve arkadaşları (2016) miR-21, apoptozu baskımlarken BBB onarımını ve anjiyogenezi desteklediği ve mikroglia üzerinde anti-inflamatuar etkisi gösterdiği için TBI'da koruyucu olarak kabul etmektedirler [230]. Chatterjee ve

arkadaşları (2016) çalıştıkları Alzheimer modelinde, miR-21, STAT3'ün ekspresyonunu ve aktivasyonunu azaltarak potansiyel olarak NF- κ B aktivasyonunu modüle edebilmektedir. Sonuçlarda, amiloid β (A β) nin hipokampal ve kortikal nöronlarda miR-21 seviyesini azalttığını göstermişlerdir [231]. MS hastalarında miR-21 ve bazı miRNA'ların düzensiz olduğu gösterilmiştir. Deneysel MS modeli oluşturulan hayvanların hem periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) hem de beyin beyaz cevher lezyonlarında miR-21'i up regüle ettiği görülmekte iken RRMS hastalarının periferik kan örneklerinden alınan B hücrelerinde miR-107 önemli ölçüde aşağı regüle etmiştir [232]. RRMS hastalarının serumdan izole edilen eksozomlarda ise miR-122 önemli ölçüde aşağı regüle etmiştir [233].

Bu çalışmada ise yapılan diğer çalışmaların doğrultusunda LPC ile demiyelinizasyon oluşturulan grupta yukarı regüle olan miR-21'in biyotin ve MgB gruplarında aşağı regüle olduğu ve elde edilen sonuçlar, benzer çalışmaların doğrultusunda olduğu görülmüştür.

Gen ekspresyonunun miRNA aracılı regülasyonu, tüm genlerin %40-60'ının doğrudan miRNA tarafından hedeflenmesiyle artık iyi bir şekilde oluşturulmuştur [234–236]. MiR-107 ekspresyonunun, Oksijen-Glikoz Yoksunluğu/Reoksijenasyon (OGD/R) ile indüklenen PC12 hücrelerinde aşağı regüle iken, iskemik inme durumunun model alındığı çalışmada OGD/R ile tedavi edilen PC12 hücrelerinde doğrulanan orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) olan sıçanlarda yukarı regüle olduğu ortaya konmuştur [201]. Yapılan başka bir çalışmada kontrollere kıyasla MS hastalarının kan hücrelerinde miR-107'nin aşağı regülasyonu saptanmıştır [237]. Ayrıca miR-107, Alzheimer hastalığının ilerlemesinin erken dönemlerinde insanlarda geçici kortikal gri maddesinde ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterilen bir mikroRNA'dır. Bunun yanı sıra miR-107 ifadesi, Alzheimer hastalığı ilerledikçe diğer miRNA'lara göre daha düşük olma eğilimindedir [238]. Wang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan nörodejeneratif hastalık modeli olan bir fare modelinde miR-107'nin aşağı regüle olduğu gösterilmişlerdir [239]. Spesifik bir miRNA, hastalığın çok erken dönemlerinde başlayan Alzheimer hastalığında miR-107 aşağı regüle olarak görülmektedir [240]. Yapılan birçok çalışmayı destekleyen bu araştırmada ise nörodejeneratif hastalık modeli olarak, LPC ile demiyelinizasyon oluşturulan grupta miR-107 aşağı regüle olduğu görülmektedir. Tedavi grupları olarak çalışılan biyotin ve MgB gruplarında ise olan miR-107'nin yukarı regüle olduğu görülmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Huntington hastalığı, hayvan deneme modeli incelemesinde birçok mikroRNA'nın striatum ve serebral kortekste ekspresyon seviyelerini değiştirdiği ve miR-122 nin de aralarında bulunduğu miRNA'ların aşağı regüle olduğu görülmüştür [206]. Tekrarlayan-düzelten MS RRMS hastalarında ve kontrol serum örneklerinde önemli ölçüde farklı şekilde eksprese edilen 4 miRNA dan birisi de miR-122 dir. Ayrıca RRMS'de nüks sırasında önemli ölçüde azalmıştır. Bu miRNA'lar, beyin manyetik rezonans görüntülemeye gadolinyum geliştirmesi olan hastalarda da azalmıştır [241]. Bcl2L11, CCNG1 ve CDKN2A gibi

hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu düzenleyen genleri hedefleyen miR-122 gibi bazı miRNA'ların aşağı regülasyonuna neden olduğunu gösterilmektedir [242]. Sıçanlarda MCAO'dan sonra miR-122'nin kanda azaldığını doğrulanmıştır [243]. Akut iskemik inme hastalarının kan hücrelerinde de miR-122 seviyesinde bir düşüş tespit edilmiştir [244]. Bu çalışmada da nörodejeneratif hastalık modelinde, LPC ile demiyelinizasyonun oluşturulduğu grupta miR-122'nin aşağı regüle olmasına karşı biyotin ve MgB ile tedavi edilen gruplarda ise miR-107'nin yukarı regüle olarak tedaviye tepki verdiği görülmektedir.

Magnezyum, oksidatif fosforilasyon, glikoliz, hücre solunum, protein sentezi ve insülin metabolizması dâhil olmak üzere çeşitli hücresel süreçler için gerekli olan temel bir mikromineraldir. Mg tedavisinden sonraki genler, MgO ve MgPic'in α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) tipi glutamat reseptörünün modülasyonu ve PI3K-Akt-GSK-3 β sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla bilişsel işlevi iyileştirebileceğini gösterir [245]. Su ve arkadaşları (2013) MgSO₄'ün güçlü anti-enflamasyon etkilerini doğrulamaktadır. MgSO₄'ün güçlü anti-enflamasyon etkilerinin altında yatan mekanizmaların, PI3K/Akt aktivitesini arttırması ve bunun sonucunda NF- κ B aktivasyonunun ve inflamatuvar mediatörlerin üretiminde azalma göstermektedir [246].

PI3K, hücre içi kaskadın sinyalizasyonundan ve düzenlenmesinden sorumlu çok yönlü bir enzimdir [247]. PI3K sinyalinin özellikle beyindeki rolü, yaşlanma sürecinde, uzamsal hafızada, hücrenin sinaptik plastisitesinde ve yetişkin nöronal progenitörünün çoğalmasında önemli etkiye sahiptir [248]. PI3K sinyalinin aktivasyonu, iskemik inme üzerinde koruyucu rol gösterirken, baskılama iskemik hasarını kötüleştirir [249]. PI3K/Akt yolağı ve NF- κ B, kanser, MS, romatoid artrit, diyabet, anemi, inflamatuvar bağırsak, Crohn ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli patolojik durumlara yol açmaktadır [250]. PI3K/Akt sinyal yolu, memeli hücrelerinde hücre büyümesini, göçünü, çoğalmasını ve metabolizmasını kontrol eden önemli bir düğümdür. Son on yılda, bir dizi çalışma, düzenleyici T hücresi gelişimi, işlevi ve stabilitesinde PI3K/Akt yolunun önemli bir rol oynadığını göstermiştir [251]. PI3K/Akt sinyal yolu aracılığıyla otofajiyi düzenleyebileceğini, böylece neonatal hipoksik-iskemik beyin hasarı (HIBD)'nin neden olduğu apoptozu azaltabileceğini ve yenidoğan HIBD'si üzerinde nöroprotektif etkiler uygulayabileceğini göstermektedir [252]. PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 sinyal yolu yoluyla TBI sonrası yaralanmanın ilerlemesini inhibe etmiştir [253]. PI3K/Akt yolu, hücre büyüme, inflamatuvar yanıtlar, hayatta kalma yanlısı sinyalleşme ve hücre proliferasyonunun düzenleyicisidir [254]. PI3K/Akt, nöroprotektif etkilere aracılık eden iyi bilinen ve önemli bir sinyal yoludur [254]. PI3K/Akt ile GSK3 β etkileşiminin, antioksidan enzim HO-1 aktive ettiği için koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [255]. PI3K, Akt'yi fosforile eder ve ardından apoptoz belirteçleri gibi hedeflerinin yardımıyla nörodejenerasyon hızını yavaşlatır [256]. Bu çalışmada ise diğer çalışmaların doğrultusunda nörodejeneratif hastalık modelinde, LPC ile demiyelinizasyonun oluşturulduğu

grupta PI3K ve Akt seviyelerinin önemli oranda azalmasına karşın, farklı biyotin ve MgB dozları ile tedavi edilen gruplarda ise PI3K ile Akt'nin anlamlı olarak arttığı görülmektedir.

Çok işlevli bir hücre içi transkripsiyon faktörü olan Nrf-2, serbest radikallere ve oksidatif strese karşı hücre içi savunma sisteminin önemli bir parçasıdır. Nrf-2'nin aktivasyonu, inflamatuvar mediatörlere ve detoksifiye edici faktörlere karşı önemli rol oynayıp, bununla birlikte antiapoptotik proteinleri aktive ederek, nöroproteksiyonda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [257]. Birkaç çalışma, Nrf-2 aktivasyonunun çeşitli genleri, özellikle oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza karşı koruma sağlayan ve nörodejenerasyona karşı çok önemli bir rol oynayan HO-1'i hedeflediğini göstermiştir [258]. MgPic takviyesi, Nrf2'nin aktivasyonunu ve ekspresyonunu arttırmış bunun sebebi ise Mg'un antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir [259]. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimindeki bir dengesizlik ve ortadan kaldırılması gereksinimi, nükleer Nrf-2 ve HO-1 ile düzenlenmesi gereken ve zayıflamış bir immün savunma mekanizmasına yol açan oksidatif strese neden olmakta böylece antioksidan enzimleri azalmaktadır [260]. Nrf-2 ve NF-κB, hücrel redoks reaksiyonlarının ince dengesini ve iltihaplanma ve oksidatif strese verilen yanıtları düzenleyen kilit yollardır [254]. Enflamasyon ve oksidatif stresin MS doku hasarını desteklediği düşünülmektedir [261]. Nörodejeneratif hastalıklarda Nrf2 aktivasyonu ve nükleer translokasyonu azaltmaktadır [262]. Nrf2 sinyal yolu, antioksidan genlerin yukarı regülasyonunu, mikroglia aracılı inflamasyonun inhibisyonunu ve nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiğini göstermiştir [263]. Nrf2 seviyesinin Alzheimer hastalarında azaldığı gözlemlenmiştir [264]. Nrf2 eksikliği ile Alzheimer hastaları arasında önemli bir negatif korelasyon olduğunu öne sürülmektedir [265]. Nörodejeneratif bozukluklarda, mikroglial hücreler aktive olur, bu da proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına ve ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimine yol açar [266]. Oksidatif hasar ve nöroinflamasyon, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde anahtar düzenleyicilerdir. Bu nedenle, bu oksidatif stresi ve iltihabı önlemenin bir yolu, nöronal hücrelerdeki endojen koruma sistemini yukarı regüle etmektir [263]. Omega-3 çoklu doymamış yağ asidi olan Alfa-Linolenik asit (ALA) oral uygulaması sonrasında Kadmiyum (Cd) kaynaklı fare beyninin korteksinde oksidatif stres, nöroinflamasyon, nöronal apoptoz artışı ve nörodejenerasyona karşı nöroprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ALA'nın etkili bir antioksidan olduğu ve antioksidan protein ekspresyon seviyesini Nrf-2/HO-1 sinyal düzenlemesi aracılığıyla nöroinflamasyonu ve nörodejenerasyonu daha da azaltan Nrf2/HO-1 ekspresyon seviyesini artırarak Cd kaynaklı nörotoksititeye karşı savunabilen bir antienflamatuvar ajan olduğu gösterilmiştir [267]. Kadmiyum'un yüksek oksidatif stres ve nörodejenerasyondan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Nrf-2, ROS'a karşı koruyucu bir rol oynar ve ayrıca fare beynindeki serbest radikalleri detoksifiye ettiği bilinmektedir. Nrf-2, oksidatif stres ve nörodejenerasyona karşı koruyucu rolü olan HO-1'in ekspresyonunu düzenlemektedir [267]. Khan ve arkadaşları (2019)

tarafından yapılan çalışmada Cd'nin Nrf-2 ve HO-1 ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, ekspresyonlarının yetişkin fare beyinde Cd tarafından önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini ve Cd + kafein içinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermişlerdir [268]. Khan ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışmada 17 β -estradiol (E2), deri altından (10 mg/kg) glutamat ile birlikte enjekte edildiğinde, Nrf2 protein ekspresyonunu ve HO-1 ekspresyonunu ve immünoreaktivitesini önemli ölçüde yukarı regüle ettiğini bildirmişlerdir [269].

HO-1, oksidatif hasara karşı hücrel savunmanın ilk sırası olarak kabul edilen içsel bir antioksidan enzimdir [270]. Mikroglialdan salınan nitrik oksit (NO), inflammatuar bir aracıdır ve aşırı üretimi, inflamasyonun yanı sıra nörotoksiteyi de indüklemektedir. Anti-oksidan enzim HO-1 anti-inflamatuar etkiler gösterdiği bilinmektedir [271]. HO-1, çeşitli yaralanma ve hastalık modellerinde hücrel ve doku koruması sağlayan, indüklenebilir, düşük moleküler ağırlıklı bir stres proteinidir. HO-1'in iskemi kaynaklı yukarı regülasyonu, kritik perfüzyon fleplerini apoptotik hücre ölümü ve doku nekrozundan korumak için hayati öneme sahiptir [272].

Bir pleiotropik transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, inflammatuar yanıtla ilişkili farklı genleri düzenler ve proinflammatuar mediatörlerin artan salınımı ile sonuçlanan birkaç hücrel yolu uyarır. Astrositlerde ve mikroglialarda Cd ile indüklenen NF- κ B aşırı ekspresyonunun, inflammatuar mediatörlerin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir [273–276]. Nöroinflamasyonun nöronal ve glial hücre fonksiyonu üzerinde hem zararlı hem de faydalı etkileri olabileceği ve NF- κ B' nin bu sürecin kontrolünde belirleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir [277]. NF- κ B, inflamasyon dâhil olmak üzere çok sayıda normal hücrel işlemin kontrolünde görev alan çeşitli transkripsiyon faktörlerine ithafen bulunan genel bir terimdir [278]. Genç dişi SJL/J farelerine miyelin bazik protein (MBP) spesifik T hücrelerinin adaptif transferi, deneysel otoimmün EAE, tekrarlayan-düzelten (RR) formunda, SJA6017'ye maruz kalan MBP'ye özgü T hücrelerini alan RR-EAE farelerinin omuriliklerinde NF- κ B seviyesinin azaldığı görülmüştür [279]. Cd kaynaklı nörotoksite çalışmasında, fare beyininin korteksinde NF- κ B ekspresyon seviyesini belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir [267]. Khan ve arkadaşları (2019) kafeinin NF- κ B yoluyla Cd kaynaklı inflammatuar sitokin salınımını azalttığı ve böylece fare beyinini Cd kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruduğunu savunmuşlardır [268]. Bu çalışmada ise yapılan çalışmaların doğrultusunda demiyelinizasyon gruplarında Nrf2 ve HO-1 protein ekspresyon düzeylerinde düşme NF- κ B protein ekspresyon düzeyinde ise yükselme görülür iken tedavi grupları olan farklı doz biyotin ve MgB gruplarında Nrf2 ve HO-1 protein ekspresyon düzeylerinde yukarı regüle NF- κ B protein ekspresyon düzeyinde ise aşağı regüle olarak demiyelinizasyon hasarında azalmanın olduğu söylenebilir.

Bcl-2 ailesi üyeleri, nöronal hücre ölümünün kontrolünde anahtar bir rol oynar [280]. Apoptoz sırasında, Bax sitozolden mitokondriye yer değiştirir, bu da mitokondriyal bağımlı

apoptozu aktive eder, ardından sitokrom-c salınımı, mitokondriyal disfonksiyon ve sonuçta hücre ölümüne yol açan kaspaz aktivasyonu gelmektedir [281].

Bir otofaji inhibitörü olan 3-MA ve bir otofaji indükleyicisi olan rapamisin kullanıldığı çalışmada, sırasıyla otofajiyi bastırmak ve indüklemek için kullanılmıştır. Çalışmada rapamisin neden olduğu otofajinin inflamasyonu, demiyelinizasyonu ve nöronal hasarı iyileştirebileceğini ve ayrıca EAE farelerinde klinik skoru iyileştirebileceği bulmuştur. Ek olarak, rapamisin kaynaklı otofaji, Bax/Bcl-2 oranını azaltarak ve bölünmüş kaspaz-3'ü etkisiz hale getirerek hücre apoptozunu baskılamıştır [282]. Apoptoz, MS [283] ve kronik öngörülemez hafif stres [284, 285] dâhil olmak üzere farklı depresif hayvan modellerinde bulunmaktadır ve tadafil, dentat girusta hücrelerindeki apoptozu inhibe ederek depresif benzeri davranışı hafifletmiştir [286]. Apoptotik protein belirteçlerinin aktivasyonu, nöroinflamasyonun gelişmesinden sonra nörodejenerasyonun ilerlemesinden esas olarak sorumludur [268]. Kadmiyum'un fare beyinde kaspaz-3 ve Bax gibi nöronal apoptotik ile ilişkili protein belirteçlerini kalıcı olarak aktive ettiği gösterilmiştir [287]. Fare beyinde Cd'nin Bax, kaspaz-3 ekspresyon seviyesini arttırdığını ve Bcl-2 proteini gibi bir anti-apoptotik proteini azalttığını göstermiştir [267]. Yapılan bir çalışmada kafeinin Cd kaynaklı apoptotik hücre ölümüne karşı olası koruyucu etkilerini araştırmak için fare beyinde Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu, tuzlu su ile tedavi edilen kontrol grubuna kıyasla Cd ile tedavi edilen grupta ikisinin de ekspresyonu artırmıştır [268]. Wei ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan Ekinakozid' in antioksidan kapasitesi artırılarak yeni doğan sıçanlarda hipoksik-iskemik beyin hasarı etkisine bakıldığı bir çalışmada Bax ve Kaspaz-3 protein ekspresyonu hipoksik-iskemik gruplarında artarken Bcl-2 protein ekspresyonu ise azalmaktadır [288].

Bcl-2/Bax aracılığıyla ölüm sinyallerini entegre ederek nörodejeneratif hastalıklarda nöronal apoptozda önemli bir rol oynar ve Sitokrom C salınımı yoluyla kaspazları koordine eder. Bcl-2, proapoptotik protein Bax'ın sitozolden mitokondriye translokasyonunu modüle eder. Mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırdığı ve pro-kaspaz aktivasyonunu destekleyen Cyt C'yi serbest bırakarak membrandan salınımını destekler. Aktive edilmiş kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif formuna ayırır ve bu da hücre apoptozunu indükler [289]. Kaspaz-3, aktivasyon sırasında apoptotik sinyale bağlı olarak 20 veya 18 kDa'lık büyük bir alt birime ve 12 kDa'lık küçük bir alt birime bölünen 32 kDa'lık bir ön form olarak sentezlenmektedir [290]. Magnezyum sülfatın ($MgSO_4$) preeklampsi (PE) sıçanlarda kraniyal sinirleri üzerindeki koruyucu etkisinin yapıldığı bir çalışmada, beyin dokularında nöronal apoptozu $MgSO_4$ 'ün etkili bir şekilde azaltabileceğini gösterdi, $MgSO_4$ 'ün Bax protein ekspresyonunu önemli ölçüde azaltabileceğini ve Bcl-2 ekspresyonunu artırabileceğini göstermiştir [291]. Magnezyum İzoglisirizinat (MI)'in hepatik ensefalopati üzerine etkisi Epirubisin indüklemesi, Nrf2 ve HO-1 protein ifadelerini belirgin şekilde düşerken NF- κ B yükselmiştir. MI ile tedavisinde Nrf2 ve HO-1 yukarı regüle NF- κ B ise aşağı regüle olduğu görülmüştür. MI'nın apoptozla ilişkili proteinlerdeki ekspresyon seviyeleri

üzerindeki etkisi ise Bax ve kaspaz-3 protein ifadeleri aşağı regüle olurken Bcl-2 protein ekspresyonunda yukarı regüle olduğu görülmektedir [292]. Magnezyum Sülfat ($MgSO_4$) tedavisi karbon monoksit (CO) zehirlenmesi sonrası beyin dokularında apoptotik bir indeks olan Bax/Bcl2 oranını azalttığını gösterilmiştir [293]. Bu çalışmada ise apoptozla ilişkili proteinlerdeki ekspresyon düzeylerinde yapılan çalışmaların doğrultusunda tutarlı bir şekilde demiyelinizasyon gruplarında Bax ve Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinde önemli bir artışın olduğu görülürken Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde ise önemli derecede azalma görülmektedir. Buna karşın tedavi gruplarında ise farklı doz biyotin ve MgB, Bax ve Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinin aşağı regüle olduğu görülürken Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde ise yukarı regüle olarak demiyelinizasyon sonucu apoptotik hasarda azalmanın olduğu söylenebilir.



4. SONUÇLAR

Sıçanlarda LPC'nin neden olduğu demiyelizasyona karşı biyotin formlarının etkilerini inceleyen daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut çalışmada, sıçanlarda LPC ile indüklenmiş MS modelinde farklı biyotin formlarının etkilerini inceledik. Farklı biyotin formlarının özellikle de yüksek doz MgB'nin, miR-21, miR-107 ve miR-122 relatif mikroRNA ekspresyonları ile PI3K-Akt yolaklarını, apoptotik (Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3) ve proinflatuar faktörlerin (NF-κB, Nrf2, HO-1) ekspresyon düzeylerini modüle edebileceği sonucuna varılmıştır. Biotin ve MgB'nin MS modeli üzerindeki etkileri hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



ÖNERİLER

Multiple skleroz genellikle yetişkinlerin iş hayatına başlama yıllarında ortaya çıkmaktadır ve bireylerin bütün hayatı boyunca yaşam kalitelerini olumsuz etkilemesinin yanı sıra kişi ve ülkelere büyük oranda maddi olarak ciddi kayıplara sebep olan bir hastalıktır. Mevcut tedavilerin bu hastalığı tamamen iyileştiremediğinden dolayı ekonomik olarak tedavi maliyetleri her geçen yıl katlanarak artmaktadır. Bu nedenle MS hastalığının oluşumunun henüz kesin olarak aydınlatılamaması özellikle tedavi amaçlı bilimsel araştırmaları da olumsuz etkilemektedir. Multiple skleroz hastalığının tanı kriterlerinin geliştirilmesi erken tedaviler için elzem bir durumdur. Bu yüzden MS ile ilgili daha fazla bilimsel çalışmaların yapılması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmada farklı biyotin formlarının sentezlemesi sonucunda elde edilen sonuçlar ışığında daha farklı yeni sentez ürünlerinin çalışılması MS tedavisinde etkili olacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Pathak, N., Vimal, S.K., Tandon, I., Agrawal, L., Hongyi, C., Bhattacharyya, S. (2022). Neurodegenerative Disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Multiple Sclerosis: An Early Diagnostic Approach for Precision Treatment, *Metabolic Brain Disease*, C. 37, Sayı 1, 67–104. doi:10.1007/s11011-021-00800-w
- [2] Lopes, P., Martins, A., Lopes, J. (2020). Incidence, Prevalence and Characteristics of MS in São Miguel, an Island in the Atlantic, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, C. 44, 102254. doi:10.1016/j.msard.2020.102254
- [3] Krysko, K.M., Graves, J.S., Dobson, R., Altintas, A., Amato, M.P., Bernard, J., Bonavita, S., Bove, R., Cavalla, P., Clerico, M., Corona, T., Doshi, A., Fragoso, Y., Jacobs, D., Jokubaitis, V., Landi, D., Llamasa, G., Longbrake, E.E., Maillart, E., Marta, M., Midaglia, L., Shah, S., Tintore, M., van der Walt, A., Voskuhl, R., Wang, Y., Zabad, R.K., Zeydan, B., Houtchens, M., Hellwig, K. (2020). Sex Effects across the Lifespan in Women with Multiple Sclerosis, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, C. 13, 175628642093616. doi:10.1177/1756286420936166
- [4] Belman, A.L., Krupp, L.B., Olsen, C.S., Rose, J.W., Aaen, G., Benson, L., Chitnis, T., Gorman, M., Graves, J., Harris, Y., Lotze, T., Ness, J., Rodriguez, M., Tillema, J.-M., Waubant, E., Weinstock-Guttman, B., Casper, T.C. (2016). Characteristics of Children and Adolescents With Multiple Sclerosis, *Pediatrics*, C. 138, Sayı 1. doi:10.1542/peds.2016-0120
- [5] Jakimovski, D., Awan, S., Eckert, S.P., Farooq, O., Weinstock-Guttman, B. (2022). Multiple Sclerosis in Children: Differential Diagnosis, Prognosis, and Disease-Modifying Treatment, *CNS Drugs*, C. 36, Sayı 1, 45–59. doi:10.1007/s40263-021-00887-w
- [6] Parks, N.E., Jackson-Tarlton, C.S., Vacchi, L., Merdad, R., Johnston, B.C. (2020). Dietary Interventions for Multiple Sclerosis-Related Outcomes, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, C. 2020, Sayı 5. doi:10.1002/14651858.CD004192.pub4
- [7] Varma-Doyle, A.V., Lukiw, W.J., Zhao, Y., Lovera, J., Devier, D. (2021). A Hypothesis-Generating Scoping Review of MiRs Identified in Both Multiple Sclerosis and Dementia, Their Protein Targets, and MiR Signaling Pathways, *Journal of the Neurological Sciences*, C. 420, 117202. doi:10.1016/j.jns.2020.117202
- [8] Olsson, T., Barcellos, L.F., Alfredsson, L. (2017). Interactions between Genetic, Lifestyle and Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis, *Nature Reviews Neurology*, C. 13, Sayı 1, 25–36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
- [9] Goldenberg, M.M. (2012). Multiple Sclerosis Review., *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, C. 37, Sayı 3, 175–84
- [10] Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., Baneke, P. (2020). Rising Prevalence of Multiple Sclerosis Worldwide: Insights from the Atlas of MS, Third Edition, *Multiple Sclerosis Journal*, C. 26, Sayı 14, 1816–1821. doi:10.1177/1352458520970841
- [11] Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A. (2015). Immunopathology of Multiple Sclerosis, *Nature Reviews Immunology*, C. 15, Sayı 9, 545–558. doi:10.1038/nri3871
- [12] Lublin, F.D., Reingold, S.C. (1996). Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: Results of an International Survey, *Neurology*, C. 46, Sayı 4, 907–911. doi:10.1212/WNL.46.4.907
- [13] Katz Sand, I. (2015). Classification, Diagnosis, and Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis, *Current Opinion in Neurology*, C. 28, Sayı 3, 193–205. doi:10.1097/WCO.0000000000000206
- [14] Soares, J.M., Conde, R., Magalhães, R., Marques, P., Magalhães, R., Gomes, L., Gonçalves, Ó.F., Arantes, M., Sampaio, A. (2021). Alterations in Functional Connectivity Are Associated with White Matter Lesions and Information Processing Efficiency in Multiple Sclerosis, *Brain Imaging and Behavior*, C. 15, Sayı 1, 375–388. doi:10.1007/s11682-020-00264-z
- [15] Giatti, S., Rigolio, R., Diviccaro, S., Falvo, E., Caruso, D., Garcia-Segura, L.M., Cavaletti, G., Melcangi, R.C. (2020). Sex Dimorphism in an Animal Model of Multiple Sclerosis: Focus on Pregnenolone Synthesis, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, C. 199,

105596. doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105596

- [16] Ndemazie, N.B., Inkoom, A., Morfaw, E.F., Smith, T., Aghimien, M., Ebeseoh, D., Agyare, E. (2022). Multi-Disciplinary Approach for Drug and Gene Delivery Systems to the Brain, *AAPS PharmSciTech*, C. 23, Sayı 1, 11. doi:10.1208/s12249-021-02144-1
- [17] Birnbaum, G., Stulc, J. (2017). High Dose Biotin as Treatment for Progressive Multiple Sclerosis, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, C. 18, 141–143. doi:10.1016/j.msard.2017.09.030
- [18] Haindl, M.T., Hochmeister, S. (2021). Vitamin D in Multiple Sclerosis—Lessons From Animal Studies, *Frontiers in Neurology*, C. 12. doi:10.3389/fneur.2021.757795
- [19] de Oliveira, L.R.C., Mimura, L.A.N., Fraga-Silva, T.F. de C., Ishikawa, L.L.W., Fernandes, A.A.H., Zorzella-Pezavento, S.F.G., Sartori, A. (2020). Calcitriol Prevents Neuroinflammation and Reduces Blood-Brain Barrier Disruption and Local Macrophage/Microglia Activation, *Frontiers in Pharmacology*, C. 11. doi:10.3389/fphar.2020.00161
- [20] Zeitelhofer, M., Adzemovic, M.Z., Gomez-Cabrero, D., Bergman, P., Hochmeister, S., N'diaye, M., Paulson, A., Ruhrmann, S., Almgren, M., Tegnér, J.N., Ekström, T.J., Guerreiro-Cacais, A.O., Jagodic, M. (2017). Functional Genomics Analysis of Vitamin D Effects on CD4+ T Cells in Vivo in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 114, Sayı 9. doi:10.1073/pnas.1615783114
- [21] Kennedy, D. (2016). B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review, *Nutrients*, C. 8, Sayı 2, 68. doi:10.3390/nu8020068
- [22] MahdaviFar, B., Hosseinzadeh, M., Salehi-Abargouei, A., Mirzaei, M., Vafa, M. (2021). Dietary Intake of B Vitamins and Their Association with Depression, Anxiety, and Stress Symptoms: A Cross-Sectional, Population-Based Survey, *Journal of Affective Disorders*, C. 288, 92–98. doi:10.1016/j.jad.2021.03.055
- [23] Anagnostouli, M., Livaniou, E., Nyalala, J.O., Evangelatos, G., Zournas, C., Ithakissios, D.S., Papageorgiou, C. (1999). Cerebrospinal Fluid Levels of Biotin in Various Neurological Disorders, *Acta Neurologica Scandinavica*, C. 99, Sayı 6, 387–392. doi:10.1111/j.1600-0404.1999.tb07369.x
- [24] Sedel, F., Papeix, C., Bellanger, A., Touitou, V., Lebrun-Frenay, C., Galanaud, D., Gout, O., Lyon-Caen, O., Tourbah, A. (2015). High Doses of Biotin in Chronic Progressive Multiple Sclerosis: A Pilot Study, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, C. 4, Sayı 2, 159–169. doi:10.1016/j.msard.2015.01.005
- [25] Mezzaroba, L., Alfieri, D.F., Colado Simão, A.N., Vissoci Reiche, E.M. (2019). The Role of Zinc, Copper, Manganese and Iron in Neurodegenerative Diseases, *NeuroToxicology*, C. 74, 230–241. doi:10.1016/j.neuro.2019.07.007
- [26] Popescu, B.F., Frischer, J.M., Webb, S.M., Tham, M., Adiele, R.C., Robinson, C.A., Fitz-Gibbon, P.D., Weigand, S.D., Metz, I., Nehzati, S., George, G.N., Pickering, I.J., Brück, W., Hametner, S., Lassmann, H., Parisi, J.E., Yong, G., Lucchinetti, C.F. (2017). Pathogenic Implications of Distinct Patterns of Iron and Zinc in Chronic MS Lesions, *Acta Neuropathologica*, C. 134, Sayı 1, 45–64. doi:10.1007/s00401-017-1696-8
- [27] Nirooei, E., Kashani, S.M.A., Owraangi, S., Malekpour, F., Niknam, M., Moazzen, F., Nowrouzi-Sohrabi, P., Farzinmehr, S., Akbari, H. (2022). Blood Trace Element Status in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Biological Trace Element Research*, C. 200, Sayı 1, 13–26. doi:10.1007/s12011-021-02621-5
- [28] de Oliveira, M., Gianeti, T.M.R., da Rocha, F.C.G., Lisboa-Filho, P.N., Piacenti-Silva, M. (2020). A Preliminary Study of the Concentration of Metallic Elements in the Blood of Patients with Multiple Sclerosis as Measured by ICP-MS, *Scientific Reports*, C. 10, Sayı 1, 13112. doi:10.1038/s41598-020-69979-9
- [29] Cicek, D., Demir, B., Orhan, C., Tuzcu, M., Ozercan, I.H., Sahin, N., Komorowski, J., Ojalvo, S.P., Sylla, S., Sahin, K. (2021). The Protective Effects of a Combination of an Arginine Silicate Complex and Magnesium Biotinate Against UV-Induced Skin Damage in Rats, *Frontiers in Pharmacology*, C. 12, 657207. doi:10.3389/fphar.2021.657207
- [30] Matsuda, S., Ikeda, Y., Murakami, M., Nakagawa, Y., Tsuji, A., Kitagishi, Y. (2019). Roles of

- PI3K/AKT/GSK3 Pathway Involved in Psychiatric Illnesses, *Diseases*, C. 7, Sayı 1, 22. doi:10.3390/diseases7010022
- [31] Long, H.-Z., Cheng, Y., Zhou, Z.-W., Luo, H.-Y., Wen, D.-D., Gao, L.-C. (2021). PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease, *Frontiers in Pharmacology*, C. 12. doi:10.3389/fphar.2021.648636
- [32] Upadhayay, S., Mehan, S. (2021). Targeting Nrf2/HO-1 Anti-Oxidant Signaling Pathway in the Progression of Multiple Sclerosis and Influences on Neurological Dysfunctions, *Brain Disorders*, C. 3, 100019. doi:10.1016/j.dscb.2021.100019
- [33] Yue, Y., Stone, S., Lin, W. (2018). Role of Nuclear Factor KB in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Neural Regeneration Research*, C. 13, Sayı 9, 1507. doi:10.4103/1673-5374.237109
- [34] Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prüllage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israël, A., Kaltschmidt, C., Mémet, S. (2006). NF-KB Regulates Spatial Memory Formation and Synaptic Plasticity through Protein Kinase A/CREB Signaling, *Molecular and Cellular Biology*, C. 26, Sayı 8, 2936–2946. doi:10.1128/MCB.26.8.2936-2946.2006
- [35] Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C. (2009). NF- B in the Nervous System, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, C. 1, Sayı 3, a001271–a001271. doi:10.1101/cshperspect.a001271
- [36] Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., Tsujimoto, Y. (1994). Multiple Subcellular Localization of Bcl-2: Detection in Nuclear Outer Membrane, Endoplasmic Reticulum Membrane, and Mitochondrial Membranes., *Cancer Research*, C. 54, Sayı 9, 2468–71
- [37] Mooney, S.M., Miller, M.W. (2000). Expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in the Brain of the Developing Rat, *Developmental Brain Research*, C. 123, Sayı 2, 103–117. doi:10.1016/S0165-3806(00)00081-X
- [38] Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: An Overview, *British Medical Bulletin*, C. 53, Sayı 3, 451–465. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a011623
- [39] Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M., Yoshikawa, K. (1999). Activation of Neuronal Caspase-3 by Intracellular Accumulation of Wild-Type Alzheimer Amyloid Precursor Protein, *The Journal of Neuroscience*, C. 19, Sayı 16, 6955–6964. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-16-06955.1999
- [40] Gao, Y., Han, D., Feng, J. (2021). MicroRNA in Multiple Sclerosis, *Clinica Chimica Acta*, C. 516, 92–99. doi:10.1016/j.cca.2021.01.020
- [41] Manian, M., Sohrabi, E., Eskandari, N., Assarehzadegan, M.-A., Ferns, G.A., Nourbakhsh, M., Jazayeri, M.H., Nedaieinia, R. (2021). An Integrated Bioinformatics Analysis of the Potential Regulatory Effects of MiR-21 on T-Cell Related Target Genes in Multiple Sclerosis, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. doi:10.18502/ajmb.v13i3.6364
- [42] Amor, S., Peferoen, L.A.N., Vogel, D.Y.S., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., van Noort, J.M. (2014). Inflammation in Neurodegenerative Diseases - an Update, *Immunology*, C. 142, Sayı 2, 151–166. doi:10.1111/imm.12233
- [43] Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., Amor, S. (2018). Inflammation in CNS Neurodegenerative Diseases, *Immunology*, C. 154, Sayı 2, 204–219. doi:10.1111/imm.12922
- [44] Jayasooriya, R.G.P.T., Lee, K.-T., Lee, H.-J., Choi, Y.H., Jeong, J.-W., Kim, G.-Y. (2014). Anti-Inflammatory Effects of β -Hydroxyisovalerylshikonin in BV2 Microglia Are Mediated through Suppression of the PI3K/Akt/NF-KB Pathway and Activation of the Nrf2/HO-1 Pathway, *Food and Chemical Toxicology*, C. 65, 82–89. doi:10.1016/j.fct.2013.12.011
- [45] <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/neurodegenerative-diseases-drugs-market-100661>
- [46] Calkins, M.J., Johnson, D.A., Townsend, J.A., Vargas, M.R., Dowell, J.A., Williamson, T.P., Kraft, A.D., Lee, J.-M., Li, J., Johnson, J.A. (2009). The Nrf2/ARE Pathway as a Potential Therapeutic Target in Neurodegenerative Disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, C. 11, Sayı 3, 497–508. doi:10.1089/ars.2008.2242

- [47] Giovannoni, G., Butzkueven, H., Dhib-Jalbut, S., Hobart, J., Kobelt, G., Pepper, G., Sormani, M.P., Thalheim, C., Traboulsee, A., Vollmer, T. (2016). Brain Health: Time Matters in Multiple Sclerosis, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, C. 9, S5–S48. doi:10.1016/j.msard.2016.07.003
- [48] Küçükali, C.İ., Kürtüncü, M., Çoban, A., Çebi, M., Tüzün, E. (2015). Epigenetics of Multiple Sclerosis: An Updated Review, *NeuroMolecular Medicine*, C. 17, Sayı 2, 83–96. doi:10.1007/s12017-014-8298-6
- [49] Lund, C., Nakken, K.O., Edland, A., Celius, E.G. (2014). Multiple Sclerosis and Seizures: Incidence and Prevalence over 40 Years, *Acta Neurologica Scandinavica*, C. 130, Sayı 6, 368–373. doi:10.1111/ane.12276
- [50] Murray, T.J. (2009). The History of Multiple Sclerosis: The Changing Frame of the Disease over the Centuries, *Journal of the Neurological Sciences*, C. 277, S3–S8. doi:10.1016/S0022-510X(09)70003-6
- [51] Cotsapas, C., Mitrovic, M., Hafler, D. (2018). Multiple Sclerosis, 723–730. doi:10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6
- [52] https://multiplesclerosisnewstoday.com/wp-content/uploads/2017/02/shutterstock_239380201.jpg
- [53] Ibañez-Vega, J., Vilchez, C., Jimenez, K., Guevara, C., Burgos, P.I., Naves, R. (2021). Cellular and Molecular Regulation of the Programmed Death-1/Programmed Death Ligand System and Its Role in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases, *Journal of Autoimmunity*, C. 123, 102702. doi:10.1016/j.jaut.2021.102702
- [54] Chu, T., Shields, L.E., Zeng, W., Zhang, Y., Wang, Y., Barnes, G., Shields, C., Cai, J. (2021). Dynamic Glial Response and Crosstalk in Demyelination-Remyelination and Neurodegeneration Processes, *Neural Regeneration Research*, C. 16, Sayı 7, 1359. doi:10.4103/1673-5374.300975
- [55] Ransohoff, R.M., Hafler, D.A., Lucchinetti, C.F. (2015). Multiple Sclerosis—a Quiet Revolution, *Nature Reviews Neurology*, C. 11, Sayı 3, 134–142. doi:10.1038/nrneurol.2015.14
- [56] Weber, M.S., Hemmer, B. (2010). Cooperation of B Cells and T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis., *Results and Problems in Cell Differentiation*, C. 51, 115–26. doi:10.1007/400_2009_21
- [57] Giacoppo, S., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., Mazzon, E. (2017). Target Regulation of PI3K/Akt/MTOR Pathway by Cannabidiol in Treatment of Experimental Multiple Sclerosis., *Fitoterapia*, C. 116, 77–84. doi:10.1016/j.fitote.2016.11.010
- [58] Filippi, M., Rocca, M.A. (2005). MRI Evidence for Multiple Sclerosis as a Diffuse Disease of the Central Nervous System., *Journal of Neurology*, C. 252 Suppl, v16-24. doi:10.1007/s00415-005-5004-5
- [59] De Stefano, N., Giorgio, A., Battaglini, M., Rovaris, M., Sormani, M.P., Barkhof, F., Korteweg, T., Enzinger, C., Fazekas, F., Calabrese, M., Dinacci, D., Tedeschi, G., Gass, A., Montalban, X., Rovira, A., Thompson, A., Comi, G., Miller, D.H., Filippi, M. (2010). Assessing Brain Atrophy Rates in a Large Population of Untreated Multiple Sclerosis Subtypes., *Neurology*, C. 74, Sayı 23, 1868–76. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e24136
- [60] Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Brück, W. (2002). Acute Axonal Damage in Multiple Sclerosis Is Most Extensive in Early Disease Stages and Decreases over Time., *Brain : A Journal of Neurology*, C. 125, Sayı Pt 10, 2202–12. doi:10.1093/brain/awf235
- [61] Sbardella, E., Tona, F., Petsas, N., Pantano, P. (2013). DTI Measurements in Multiple Sclerosis: Evaluation of Brain Damage and Clinical Implications., *Multiple Sclerosis International*, C. 2013, 671730. doi:10.1155/2013/671730
- [62] Rocca, M.A., Mezzapesa, D.M., Falini, A., Ghezzi, A., Martinelli, V., Scotti, G., Comi, G., Filippi, M. (2003). Evidence for Axonal Pathology and Adaptive Cortical Reorganization in Patients at Presentation with Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis., *NeuroImage*, C. 18, Sayı 4, 847–55. doi:10.1016/s1053-8119(03)00043-0
- [63] Rocca, M.A., Filippi, M. (2007). Functional MRI in Multiple Sclerosis., *Journal of Neuroimaging : Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, C. 17 Suppl 1, 36S-41S. doi:10.1111/j.1552-6569.2007.00135.x

- [64] Sinay, V., Perez Akly, M., Zanga, G., Ciardi, C., Racosta, J.M. (2015). School Performance as a Marker of Cognitive Decline Prior to Diagnosis of Multiple Sclerosis., *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, C. 21, Sayı 7, 945–52. doi:10.1177/1352458514554054
- [65] Barkhof, F., Scheltens, P., Frequin, S.T., Nauta, J.J., Tas, M.W., Valk, J., Hommes, O.R. (1992). Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Sequential Enhanced MR Imaging vs Clinical Findings in Determining Disease Activity., *AJR. American Journal of Roentgenology*, C. 159, Sayı 5, 1041–7. doi:10.2214/ajr.159.5.1414773
- [66] Crocker, T.F., Brown, L., Lam, N., Wray, F., Knapp, P., Forster, A. (2021). Information Provision for Stroke Survivors and Their Carers., *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, C. 11, CD001919. doi:10.1002/14651858.CD001919.pub4
- [67] Okuda, D.T., Siva, A., Kantarci, O., Inglese, M., Katz, I., Tutuncu, M., Keegan, B.M., Donlon, S., Hua, L.H., Vidal-Jordana, A., Montalban, X., Rovira, A., Tintoré, M., Amato, M.P., Brochet, B., de Seze, J., Brassat, D., Vermersch, P., De Stefano, N., Sormani, M.P., Pelletier, D., Lebrun, C., Radiologically Isolated Syndrome Consortium (RISC), Club Francophone de la Sclérose en Plaques (CFSEP). (2014). Radiologically Isolated Syndrome: 5-Year Risk for an Initial Clinical Event., *PLoS One*, C. 9, Sayı 3, e90509. doi:10.1371/journal.pone.0090509
- [68] Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., Filippi, M. (2005). Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis, Part I: Natural History, Pathogenesis, Diagnosis, and Prognosis., *The Lancet. Neurology*, C. 4, Sayı 5, 281–8. doi:10.1016/S1474-4422(05)70071-5
- [69] Koch, M., Kingwell, E., Rieckmann, P., Tremlett, H., UBC MS Clinic Neurologists. (2010). The Natural History of Secondary Progressive Multiple Sclerosis., *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, C. 81, Sayı 9, 1039–43. doi:10.1136/jnnp.2010.208173
- [70] Leary, S.M., Porter, B., Thompson, A.J. (2005). Multiple Sclerosis: Diagnosis and the Management of Acute Relapses., *Postgraduate Medical Journal*, C. 81, Sayı 955, 302–8. doi:10.1136/pgmj.2004.029413
- [71] Schwartz, C.E., Quaranto, B.R., Healy, B.C., Benedict, R.H., Vollmer, T.L. (2013). Cognitive Reserve and Symptom Experience in Multiple Sclerosis: A Buffer to Disability Progression over Time?, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, C. 94, Sayı 10, 1971–81. doi:10.1016/j.apmr.2013.05.009
- [72] Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C.H. (2014). Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: The 2013 Revisions., *Neurology*, C. 83, Sayı 3, 278–86. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
- [73] Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P. (2000). Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis., *The New England Journal of Medicine*, C. 343, Sayı 20, 1430–8. doi:10.1056/NEJM200011163432001
- [74] Scalfari, A., Neuhaus, A., Daumer, M., Muraro, P.A., Ebers, G.C. (2014). Onset of Secondary Progressive Phase and Long-Term Evolution of Multiple Sclerosis., *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, C. 85, Sayı 1, 67–75. doi:10.1136/jnnp-2012-304333
- [75] Gökçe, Ş.F., Çiğdem, B., Nemmezi Karaca, S., Bolayır, A., Kayım Yıldız, Ö., Topaktaş, A.S., Balaban, H. (2019). Prevalence of Multiple Sclerosis in an Urban Population of Sivas Province in Turkey, *Turkish Journal of Medical Sciences*, C. 49, Sayı 1, 288–294. doi:10.3906/sag-1808-112
- [76] Howard, J., Trevick, S., Younger, D.S. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis., *Neurologic Clinics*, C. 34, Sayı 4, 919–939. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.016
- [77] Jeong, A., Oleske, D.M., Holman, J. (2019). Epidemiology of Pediatric-Onset Multiple Sclerosis: A Systematic Review of the Literature., *Journal of Child Neurology*, C. 34, Sayı 12, 705–712. doi:10.1177/0883073819845827
- [78] Bartels, F., Nobis, K., Cooper, G., Wendel, E., Cleaveland, R., Bajer-Kornek, B., Blaschek, A., Schimmel, M., Blankenburg, M., Baumann, M., Karenfort, M., Finke, C., Rostásy, K. (2019).

- Childhood Multiple Sclerosis Is Associated with Reduced Brain Volumes at First Clinical Presentation and Brain Growth Failure., *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, C. 25, Sayı 7, 927–936. doi:10.1177/1352458519829698
- [79] McKay, K.A., Friberg, E., Razaz, N., Alexanderson, K., Hillert, J. (2021). Long-Term Socioeconomic Outcomes Associated With Pediatric-Onset Multiple Sclerosis., *JAMA Neurology*, C. 78, Sayı 4, 478–482. doi:10.1001/jamaneurol.2020.5520
- [80] Romani, A.M.P. (2011). Cellular Magnesium Homeostasis., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, C. 512, Sayı 1, 1–23. doi:10.1016/j.abb.2011.05.010
- [81] de Baaij, J.H.F., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M. (2015). Magnesium in Man: Implications for Health and Disease., *Physiological Reviews*, C. 95, Sayı 1, 1–46. doi:10.1152/physrev.00012.2014
- [82] Barbagallo, M., Dominguez, L.J. (2010). Magnesium and Aging., *Current Pharmaceutical Design*, C. 16, Sayı 7, 832–9. doi:10.2174/138161210790883679
- [83] Wolf, F.I., Trapani, V. (2008). Cell (Patho)Physiology of Magnesium., *Clinical Science (London, England : 1979)*, C. 114, Sayı 1, 27–35. doi:10.1042/CS20070129
- [84] Holm, N.G. (2012). The Significance of Mg in Prebiotic Geochemistry., *Geobiology*, C. 10, Sayı 4, 269–79. doi:10.1111/j.1472-4669.2012.00323.x
- [85] Yamanaka, R., Shindo, Y., Oka, K. (2019). Magnesium Is a Key Player in Neuronal Maturation and Neuropathology., *International Journal of Molecular Sciences*, C. 20, Sayı 14. doi:10.3390/ijms20143439
- [86] Rubin, H. (2011). Intracellular Free Mg²⁺ and MgATP²⁻ in Coordinate Control of Protein Synthesis and Cell Proliferation, R. Vink; M. Nechifor (Eds.), *Magnesium in the Central Nervous System*, University of Adelaide Press, Adelaide, 75–84. doi:10.1017/UPO9780987073051.005
- [87] Kim, Y.-H., Jung, K.-I., Song, C.-H. (2012). Effects of Serum Calcium and Magnesium on Heart Rate Variability in Adult Women., *Biological Trace Element Research*, C. 150, Sayı 1–3, 116–22. doi:10.1007/s12011-012-9518-2
- [88] Kaya, M., Ahishali, B. (2011). *The Role of Magnesium in Edema and Blood Brain Barrier Disruption, Magnesium in the Central Nervous System*
- [89] Rucker, R.B., Zemleni, J., Suttie, J.W., McCormick, D.B. (Eds.). (2007). *Handbook of Vitamins*, CRC Press. doi:10.1201/9781420005806
- [90] Anand, R.S., Ganesan, D., Selvam, S., Rajasekaran, S., Jayavelu, T. (2020). Distinct Utilization of Biotin in and between Adipose and Brain during Aging Is Associated with a Lipogenic Shift in Wistar Rat Brain., *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, C. 79, 68–76. doi:10.1016/j.nutres.2020.06.004
- [91] Wolf, B. (2011). The Neurology of Biotinidase Deficiency., *Molecular Genetics and Metabolism*, C. 104, Sayı 1–2, 27–34. doi:10.1016/j.ymgme.2011.06.001
- [92] Zeng, W.-Q., Al-Yamani, E., Acierno, J.S., Slaugenhaupt, S., Gillis, T., MacDonald, M.E., Ozand, P.T., Gusella, J.F. (2005). Biotin-Responsive Basal Ganglia Disease Maps to 2q36.3 and Is Due to Mutations in SLC19A3., *American Journal of Human Genetics*, C. 77, Sayı 1, 16–26. doi:10.1086/431216
- [93] Sedel, F., Bernard, D., Mock, D.M., Tourbah, A. (2016). Targeting Demyelination and Virtual Hypoxia with High-Dose Biotin as a Treatment for Progressive Multiple Sclerosis., *Neuropharmacology*, C. 110, Sayı Pt B, 644–653. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.028
- [94] Blum, J.L., Ellis, M., Chen, J.X., Mendes, O., Sylla, S., Ojalvo, S.P., Komorowski, J. (2021). Toxicologic Evaluation of a Novel, Highly Soluble Biotin Salt, Magnesium Biotinate., *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, C. 153, 112267. doi:10.1016/j.fct.2021.112267
- [95] Ojalvo, S.P., Sylla, S., Komorowski, J., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Sahin, K. (2019). The Safety and Absorption of Magnesium Biotinate in Rats (P06-029-19), *Current Developments in Nutrition*, C. 3, Sayı Supplement_1. doi:10.1093/cdn/nzz031.P06-029-19
- [96] Ivanoff, A.E., Einstein, G.P., Tulp, O.L. (2020). A Review for Medical Students and Student Doctors on Detecting and Reporting Suspected Child Abuse and Neglect (SCAN) from Clinical and Forensic

- Observations., *The FASEB Journal*, C. 34, Sayı S1, 1–1. doi:10.1096/fasebj.2020.34.s1.07600
- [97] Ojalvo, S.P., Sylla, S., Komorowski, J. (2019). Pharmacokinetics of a Novel Form of Biotin, Magnesium Biotinate, in Healthy Subjects (P06-027-19), *Current Developments in Nutrition*, C. 3, Sayı Supplement_1. doi:10.1093/cdn/nzz031.P06-027-19
- [98] Newman, D.J., Cragg, G.M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019., *Journal of Natural Products*, C. 83, Sayı 3, 770–803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
- [99] Sengupta, S., Mehta, G. (2018). Natural Products as Modulators of the Cyclic-AMP Pathway: Evaluation and Synthesis of Lead Compounds., *Organic & Biomolecular Chemistry*, C. 16, Sayı 35, 6372–6390. doi:10.1039/c8ob01388h
- [100] Jin, X., Liu, M.-Y., Zhang, D.-F., Zhong, X., Du, K., Qian, P., Gao, H., Wei, M.-J. (2019). Natural Products as a Potential Modulator of Microglial Polarization in Neurodegenerative Diseases., *Pharmacological Research*, C. 145, 104253. doi:10.1016/j.phrs.2019.104253
- [101] Mohd Sairazi, N.S., Sirajudeen, K.N.S. (2020). Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, C. 2020, 1–30. doi:10.1155/2020/6565396
- [102] Zarneshan, S.N., Fakhri, S., Farzaei, M.H., Khan, H., Saso, L. (2020). Astaxanthin Targets PI3K/Akt Signaling Pathway toward Potential Therapeutic Applications, *Food and Chemical Toxicology*, C. 145, 111714. doi:10.1016/j.fct.2020.111714
- [103] Fakhri, S., Iranpanah, A., Gravandi, M.M., Moradi, S.Z., Ranjbari, M., Majnooni, M.B., Echeverría, J., Qi, Y., Wang, M., Liao, P., Farzaei, M.H., Xiao, J. (2021). Natural Products Attenuate PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway: A Promising Strategy in Regulating Neurodegeneration, *Phytomedicine*, C. 91, 153664. doi:10.1016/j.phymed.2021.153664
- [104] Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J. (2015). PI3K in Cancer: Divergent Roles of Isoforms, Modes of Activation and Therapeutic Targeting, *Nature Reviews Cancer*, C. 15, Sayı 1, 7–24. doi:10.1038/nrc3860
- [105] Dobbin, Z., Landen, C. (2013). The Importance of the PI3K/AKT/MTOR Pathway in the Progression of Ovarian Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 14, Sayı 4, 8213–8227. doi:10.3390/ijms14048213
- [106] Sugiyama, M.G., Fairn, G.D., Antonescu, C.N. (2019). Akt-Ing Up Just About Everywhere: Compartment-Specific Akt Activation and Function in Receptor Tyrosine Kinase Signaling, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, C. 7, 70. doi:10.3389/fcell.2019.00070
- [107] Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A. (2004). Structure, Regulation and Function of PKB/AKT—a Major Therapeutic Target, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, C. 1697, Sayı 1–2, 3–16. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.009
- [108] Linnerth-Petrik, N.M., Santry, L.A., Moorehead, R., Jücker, M., Wootton, S.K., Petrik, J. (2016). Akt Isoform Specific Effects in Ovarian Cancer Progression, *Oncotarget*, C. 7, Sayı 46, 74820–74833. doi:10.18632/oncotarget.11204
- [109] Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D., Coleman, K.G. (2003). Severe Diabetes, Age-Dependent Loss of Adipose Tissue, and Mild Growth Deficiency in Mice Lacking Akt2/PKB β , *Journal of Clinical Investigation*, C. 112, Sayı 2, 197–208. doi:10.1172/JCI16885
- [110] Ghoneum, A., Said, N. (2019). PI3K-AKT-MTOR and NF κ B Pathways in Ovarian Cancer: Implications for Targeted Therapeutics, *Cancers*, C. 11, Sayı 7, 949. doi:10.3390/cancers11070949
- [111] Wei, Y., Zhou, J., Yu, H., Jin, X. (2019). AKT Phosphorylation Sites of Ser473 and Thr308 Regulate AKT Degradation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, C. 83, Sayı 3, 429–435. doi:10.1080/09168451.2018.1549974
- [112] Zeng, Z., Sarbassov, D.D., Samudio, I.J., Yee, K.W.L., Munsell, M.F., Ellen Jackson, C., Giles, F.J., Sabatini, D.M., Andreeff, M., Konopleva, M. (2007). Rapamycin Derivatives Reduce MTORC2 Signaling and Inhibit AKT Activation in AML, *Blood*, C. 109, Sayı 8, 3509–3512. doi:10.1182/blood-2006-06-030833

- [113] Memmott, R.M., Dennis, P.A. (2009). Akt-Dependent and -Independent Mechanisms of MTOR Regulation in Cancer, *Cellular Signalling*, C. 21, Sayı 5, 656–664. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.004
- [114] Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., Testa, J.R. (2005). Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting., *Advances in Cancer Research*, C. 94, 29–86. doi:10.1016/S0065-230X(05)94002-5
- [115] Matsuda, S., Nakagawa, Y., Tsuji, A., Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Murai, T. (2018). Implications of PI3K/AKT/PTEN Signaling on Superoxide Dismutases Expression and in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Diseases*, C. 6, Sayı 2, 28. doi:10.3390/diseases6020028
- [116] Bertacchini, J., Heidari, N., Mediani, L., Capitani, S., Shahjahani, M., Ahmadzadeh, A., Saki, N. (2015). Targeting PI3K/AKT/MTOR Network for Treatment of Leukemia, *Cellular and Molecular Life Sciences*, C. 72, Sayı 12, 2337–2347. doi:10.1007/s00018-015-1867-5
- [117] Matsuo, F.S., Andrade, M.F., Loyola, A.M., da Silva, S.J., Silva, M.J.B., Cardoso, S.V., de Faria, P.R. (2018). Pathologic Significance of AKT, MTOR, and GSK3 β Proteins in Oral Squamous Cell Carcinoma-Affected Patients, *Virchows Archiv*, C. 472, Sayı 6, 983–997. doi:10.1007/s00428-018-2318-0
- [118] Liang, J., Wu, Y., Yuan, H., Yang, Y., Xiong, Q., Liang, C., Li, Z., Li, C., Zhang, G., Lai, X., Hu, Y., Hou, S. (2019). Dendrobium Officinale Polysaccharides Attenuate Learning and Memory Disabilities via Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Actions, *International Journal of Biological Macromolecules*, C. 126, 414–426. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.230
- [119] Seminotti, B., Grings, M., Tucci, P., Leipnitz, G., Saso, L. (2021). Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2 Signaling in the Neuropathophysiology of Inherited Metabolic Disorders, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, C. 15. doi:10.3389/fncel.2021.785057
- [120] Adelusi, T.I., Du, L., Hao, M., Zhou, X., Xuan, Q., Apu, C., Sun, Y., Lu, Q., Yin, X. (2020). Keap1/Nrf2/ARE Signaling Unfolds Therapeutic Targets for Redox Imbalanced-Mediated Diseases and Diabetic Nephropathy, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, C. 123, 109732. doi:10.1016/j.biopha.2019.109732
- [121] Panieri, E., Buha, A., Telkoparan-Akillilar, P., Cevik, D., Kouretas, D., Veskokoukis, A., Skaperda, Z., Tsatsakis, A., Wallace, D., Suzen, S., Saso, L. (2020). Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy, *Antioxidants*, C. 9, Sayı 3, 193. doi:10.3390/antiox9030193
- [122] Scuderi, S.A., Ardizzone, A., Paterniti, I., Esposito, E., Campolo, M. (2020). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of Nrf2 Inducer Dimethyl Fumarate in Neurodegenerative Diseases, *Antioxidants*, C. 9, Sayı 7, 630. doi:10.3390/antiox9070630
- [123] Yang, X., Yao, W., Shi, H., Liu, H., Li, Y., Gao, Y., Liu, R., Xu, L. (2016). Paeoniflorin Protects Schwann Cells against High Glucose Induced Oxidative Injury by Activating Nrf2/ARE Pathway and Inhibiting Apoptosis, *Journal of Ethnopharmacology*, C. 185, 361–369. doi:10.1016/j.jep.2016.03.031
- [124] Canning, P., Sorrell, F.J., Bullock, A.N. (2015). Structural Basis of Keap1 Interactions with Nrf2, *Free Radical Biology and Medicine*, C. 88, 101–107. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034
- [125] Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X. (2017). Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles in Inflammation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, C. 1863, Sayı 2, 585–597. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.005
- [126] Cuadrado, A., Rojo, A.I., Wells, G., Hayes, J.D., Cousin, S.P., Rumsey, W.L., Attucks, O.C., Franklin, S., Levonen, A.-L., Kensler, T.W., Dinkova-Kostova, A.T. (2019). Therapeutic Targeting of the NRF2 and KEAP1 Partnership in Chronic Diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, C. 18, Sayı 4, 295–317. doi:10.1038/s41573-018-0008-x
- [127] Yamamoto, M., Kensler, T.W., Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: A Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis, *Physiological Reviews*, C. 98, Sayı 3, 1169–1203. doi:10.1152/physrev.00023.2017
- [128] Li, W., Yu, S.-W., Kong, A.-N.T. (2006). Nrf2 Possesses a Redox-Sensitive Nuclear Exporting Signal in the Neh5 Transactivation Domain, *Journal of Biological Chemistry*, C. 281, Sayı 37, 27251–27263. doi:10.1074/jbc.M602746200

- [129] Hennig, P., Garstkiewicz, M., Grossi, S., Di Filippo, M., French, L., Beer, H.-D. (2018). The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 19, Sayı 2, 562. doi:10.3390/ijms19020562
- [130] Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., Hayes, J.D. (2013). Nrf2 Is Controlled by Two Distinct β -TrCP Recognition Motifs in Its Neh6 Domain, One of Which Can Be Modulated by GSK-3 Activity, *Oncogene*, C. 32, Sayı 32, 3765–3781. doi:10.1038/onc.2012.388
- [131] Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M. (2010). The Selective Autophagy Substrate P62 Activates the Stress Responsive Transcription Factor Nrf2 through Inactivation of Keap1, *Nature Cell Biology*, C. 12, Sayı 3, 213–223. doi:10.1038/ncb2021
- [132] Belenguer, P., Duarte, J.M.N., Schuck, P.F., Ferreira, G.C. (2019). Mitochondria and the Brain: Bioenergetics and Beyond, *Neurotoxicity Research*, C. 36, Sayı 2, 219–238. doi:10.1007/s12640-019-00061-7
- [133] Bolaños, J.P. (2016). Bioenergetics and Redox Adaptations of Astrocytes to Neuronal Activity, *Journal of Neurochemistry*, C. 139, Sayı S2, 115–125. doi:10.1111/jnc.13486
- [134] Díaz, M., Mesa-Herrera, F., Marín, R. (2021). DHA and Its Elaborated Modulation of Antioxidant Defenses of the Brain: Implications in Aging and AD Neurodegeneration, *Antioxidants*, C. 10, Sayı 6, 907. doi:10.3390/antiox10060907
- [135] Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castaño, P., Gonzalez, A., Almeida, A., Bolaños, J.P. (2015). Astrocyte NMDA Receptors' Activity Sustains Neuronal Survival through a Cdk5–Nrf2 Pathway, *Cell Death & Differentiation*, C. 22, Sayı 11, 1877–1889. doi:10.1038/cdd.2015.49
- [136] Rosito, M., Testi, C., Parisi, G., Cortese, B., Baiocco, P., Di Angelantonio, S. (2020). Exploring the Use of Dimethyl Fumarate as Microglia Modulator for Neurodegenerative Diseases Treatment, *Antioxidants*, C. 9, Sayı 8, 700. doi:10.3390/antiox9080700
- [137] Kahroba, H., Ramezani, B., Maadi, H., Sadeghi, M.R., Jaberie, H., Ramezani, F. (2021). The Role of Nrf2 in Neural Stem/Progenitors Cells: From Maintaining Stemness and Self-Renewal to Promoting Differentiation Capability and Facilitating Therapeutic Application in Neurodegenerative Disease, *Ageing Research Reviews*, C. 65, 101211. doi:10.1016/j.arr.2020.101211
- [138] Paoli, M., Marles-Wright, J., Smith, A. (2002). Structure–Function Relationships in Heme-Proteins, *DNA and Cell Biology*, C. 21, Sayı 4, 271–280. doi:10.1089/104454902753759690
- [139] Gozzelino, R., Jeney, V., Soares, M.P. (2010). Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, C. 50, Sayı 1, 323–354. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600
- [140] Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R. (1968). The Enzymatic Conversion of Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 61, Sayı 2, 748–755. doi:10.1073/pnas.61.2.748
- [141] Yamaguchi, T., Komoda, Y., Nakajima, H. (1994). Biliverdin-IX Alpha Reductase and Biliverdin-IX Beta Reductase from Human Liver. Purification and Characterization., *The Journal of Biological Chemistry*, C. 269, Sayı 39, 24343–8
- [142] Campbell, N.K., Fitzgerald, H.K., Dunne, A. (2021). Regulation of Inflammation by the Antioxidant Haem Oxygenase 1, *Nature Reviews Immunology*, C. 21, Sayı 7, 411–425. doi:10.1038/s41577-020-00491-x
- [143] Maines, M.D. (1997). The Heme Oxygenase System: A Regulator of Second Messenger Gases., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, C. 37, Sayı 1, 517–54. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517
- [144] Maines, M.D., Kappas, A. (1974). Cobalt Induction of Hepatic Heme Oxygenase; with Evidence That Cytochrome P -450 Is Not Essential for This Enzyme Activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 71, Sayı 11, 4293–4297. doi:10.1073/pnas.71.11.4293
- [145] Otterbein, L.E., Kolls, J.K., Mantell, L.L., Cook, J.L., Alam, J., Choi, A.M.K. (1999). Exogenous Administration of Heme Oxygenase-1 by Gene Transfer Provides Protection against Hyperoxia-

- Induced Lung Injury, *Journal of Clinical Investigation*, C. 103, Sayı 7, 1047–1054. doi:10.1172/JCI5342
- [146] Fagone, P., Patti, F., Mangano, K., Mammana, S., Coco, M., Touil-Boukoffa, C., Chikovani, T., Di Marco, R., Nicoletti, F. (2013). Heme Oxygenase-1 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlates with Disease Activity in Multiple Sclerosis, *Journal of Neuroimmunology*, C. 261, Sayı 1–2, 82–86. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.04.013
- [147] Applegate, L.A., Luscher, P., Tyrrell, R.M. (1991). Induction of Heme Oxygenase: A General Response to Oxidant Stress in Cultured Mammalian Cells., *Cancer Research*, C. 51, Sayı 3, 974–8
- [148] Neis, V.B., Rosa, P.B., Moretti, M., Rodrigues, A.L.S. (2018). Involvement of Heme Oxygenase-1 in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Diseases, *Current Pharmaceutical Design*, C. 24, Sayı 20, 2283–2302. doi:10.2174/1381612824666180717160623
- [149] Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-KB Signaling Pathways, *Nature Immunology*, C. 12, Sayı 8, 695–708. doi:10.1038/ni.2065
- [150] Sher, N.M., Nazli, R., Zafar, H., Fatima, S. (2021). Effects of Lipid Based Multiple Micronutrients Supplement on the Birth Outcome of Underweight Pre-Eclamptic Women: A Randomized Clinical Trial, *Pakistan Journal of Medical Sciences*, C. 38, Sayı 1. doi:10.12669/pjms.38.1.4396
- [151] Mc Guire, C., Prinz, M., Beyaert, R., van Loo, G. (2013). Nuclear Factor Kappa B (NF-KB) in Multiple Sclerosis Pathology, *Trends in Molecular Medicine*, C. 19, Sayı 10, 604–613. doi:10.1016/j.molmed.2013.08.001
- [152] Zhang, Q., Lenardo, M.J., Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF-KB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology, *Cell*, C. 168, Sayı 1–2, 37–57. doi:10.1016/j.cell.2016.12.012
- [153] Sun, S.-C. (2011). Non-Canonical NF-KB Signaling Pathway, *Cell Research*, C. 21, Sayı 1, 71–85. doi:10.1038/cr.2010.177
- [154] Luo, Y., Wu, W., Gu, J., Zhang, X., Dang, J., Wang, J., Zheng, Y., Huang, F., Yuan, J., Xue, Y., Fu, Q., Kandalam, U., Colello, J., Zheng, S.G. (2019). Human Gingival Tissue-Derived MSC Suppress Osteoclastogenesis and Bone Erosion via CD39-Adenosine Signal Pathway in Autoimmune Arthritis, *EBioMedicine*, C. 43, 620–631. doi:10.1016/j.ebiom.2019.04.058
- [155] Cildir, G., Low, K.C., Tergaonkar, V. (2016). Noncanonical NF-KB Signaling in Health and Disease, *Trends in Molecular Medicine*, C. 22, Sayı 5, 414–429. doi:10.1016/j.molmed.2016.03.002
- [156] Zhou, Y., Cui, C., Ma, X., Luo, W., Zheng, S.G., Qiu, W. (2020). Nuclear Factor KB (NF-KB)–Mediated Inflammation in Multiple Sclerosis, *Frontiers in Immunology*, C. 11, 391. doi:10.3389/fimmu.2020.00391
- [157] Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., Bethea, J.R. (2009). Transgenic Inhibition of Astroglial NF-KB Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation, *The Journal of Immunology*, C. 182, Sayı 5, 2628–2640. doi:10.4049/jimmunol.0802954
- [158] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Widespread Implications in Tissue Kinetics, *British Journal of Cancer*, C. 26, Sayı 4, 239–257. doi:10.1038/bjc.1972.33
- [159] Park, H.-A., Hayden, M.M., Bannerman, S., Jansen, J., Crowe-White, K.M. (2020). Anti-Apoptotic Effects of Carotenoids in Neurodegeneration, *Molecules*, C. 25, Sayı 15, 3453. doi:10.3390/molecules25153453
- [160] Kole, A.J., Annis, R.P., Deshmukh, M. (2013). Mature Neurons: Equipped for Survival, *Cell Death & Disease*, C. 4, Sayı 6, e689–e689. doi:10.1038/cddis.2013.220
- [161] Oppenheim, R.W. (1991). Cell Death During Development of the Nervous System, *Annual Review of Neuroscience*, C. 14, Sayı 1, 453–501. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002321
- [162] Sigrist, S.J., Carmona-Gutierrez, D., Gupta, V.K., Bhukel, A., Mertel, S., Eisenberg, T., Madeo, F. (2014). Spermidine-Triggered Autophagy Ameliorates Memory during Aging, *Autophagy*, C. 10, Sayı 1, 178–179. doi:10.4161/auto.26918

- [163] Chu, C.T., Bayır, H., Kagan, V.E. (2014). LC3 Binds Externalized Cardiolipin on Injured Mitochondria to Signal Mitophagy in Neurons, *Autophagy*, C. 10, Sayı 2, 376–378. doi:10.4161/auto.27191
- [164] Kim, W.R., Sun, W. (2011). Programmed Cell Death during Postnatal Development of the Rodent Nervous System, *Development, Growth & Differentiation*, C. 53, Sayı 2, 225–235. doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01226.x
- [165] Buss, R.R., Sun, W., Oppenheim, R.W. (2006). Adaptive Roles of Programmed Cell Death during Nervous System Development., *Annual Review of Neuroscience*, C. 29, Sayı 1, 1–35. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800
- [166] Adams, C.M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., Eischen, C.M. (2019). Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma, *Frontiers in Oncology*, C. 8. doi:10.3389/fonc.2018.00636
- [167] Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W. (2018). BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death, *Cell Death & Differentiation*, C. 25, Sayı 1, 65–80. doi:10.1038/cdd.2017.186
- [168] Spitz, A.Z., Gavathiotis, E. (2022). Physiological and Pharmacological Modulation of BAX, *Trends in Pharmacological Sciences*, C. 43, Sayı 3, 206–220. doi:10.1016/j.tips.2021.11.001
- [169] Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). Regulation of Apoptosis in Health and Disease: The Balancing Act of BCL-2 Family Proteins, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 20, Sayı 3, 175–193. doi:10.1038/s41580-018-0089-8
- [170] Chen, H.-C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H.-C., Huang, Y., Ren, D., Kim, H., Takeda, S., Reyna, D.E., Chan, P.M., Ganesan, Y.T., Liao, C.-P., Gavathiotis, E., Hsieh, J.J., Cheng, E.H. (2015). An Interconnected Hierarchical Model of Cell Death Regulation by the BCL-2 Family, *Nature Cell Biology*, C. 17, Sayı 10, 1270–1281. doi:10.1038/ncb3236
- [171] Bleicken, S., Assafa, T.E., Stegmüller, C., Wittig, A., Garcia-Saez, A.J., Bordignon, E. (2018). Topology of Active, Membrane-Embedded Bax in the Context of a Toroidal Pore, *Cell Death & Differentiation*, C. 25, Sayı 10, 1717–1731. doi:10.1038/s41418-018-0184-6
- [172] Bleicken, S., Jeschke, G., Stegmüller, C., Salvador-Gallego, R., García-Sáez, A.J., Bordignon, E. (2014). Structural Model of Active Bax at the Membrane, *Molecular Cell*, C. 56, Sayı 4, 496–505. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.022
- [173] Mignard, V., Lalier, L., Paris, F., Vallette, F.M. (2014). Bioactive Lipids and the Control of Bax Pro-Apoptotic Activity, *Cell Death & Disease*, C. 5, Sayı 5, e1266–e1266. doi:10.1038/cddis.2014.226
- [174] Luo, X., O'Neill, K.L., Huang, K. (2020). The Third Model of Bax/Bak Activation: A Bcl-2 Family Feud Finally Resolved?, *F1000Research*, C. 9, 935. doi:10.12688/f1000research.25607.1
- [175] Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X., Huang, W., Yan, C., Scheres, S.H.W., Shi, Y. (2015). Atomic Structure of the Apoptosome: Mechanism of Cytochrome c - and DATP-Mediated Activation of Apaf-1, *Genes & Development*, C. 29, Sayı 22, 2349–2361. doi:10.1101/gad.272278.115
- [176] McArthur, K., Whitehead, L.W., Heddlestone, J.M., Li, L., Padman, B.S., Oorschot, V., Geoghegan, N.D., Chappaz, S., Davidson, S., San Chin, H., Lane, R.M., Dramicanin, M., Saunders, T.L., Sugiana, C., Lessene, R., Osellame, L.D., Chew, T.-L., Dewson, G., Lazarou, M., Ramm, G., Lessene, G., Ryan, M.T., Rogers, K.L., van Delft, M.F., Kile, B.T. (2018). BAK/BAX Macropores Facilitate Mitochondrial Herniation and MtDNA Efflux during Apoptosis, *Science*, C. 359, Sayı 6378. doi:10.1126/science.aao6047
- [177] Warren, C.F.A., Wong-Brown, M.W., Bowden, N.A. (2019). BCL-2 Family Isoforms in Apoptosis and Cancer, *Cell Death & Disease*, C. 10, Sayı 3, 177. doi:10.1038/s41419-019-1407-6
- [178] Klanova, M., Klener, P. (2020). BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas, *Cancers*, C. 12, Sayı 4, 938. doi:10.3390/cancers12040938
- [179] Callens, M., Kraskovskaya, N., Derevtsova, K., Annaert, W., Bultynck, G., Bezprozvanny, I., Vervliet, T. (2021). The Role of Bcl-2 Proteins in Modulating Neuronal Ca²⁺ Signaling in Health and in Alzheimer's Disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, C. 1868, Sayı 6, 118997. doi:10.1016/j.bbamer.2021.118997
- [180] Pivovarova, N.B., Andrews, S.B. (2010). Calcium-Dependent Mitochondrial Function and

- Dysfunction in Neurons, *FEBS Journal*, C. 277, Sayı 18, 3622–3636. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07754.x
- [181] O'Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C.S., Strasser, A. (2001). Tissue Expression and Subcellular Localization of the Pro-Survival Molecule Bcl-W, *Cell Death & Differentiation*, C. 8, Sayı 5, 486–494. doi:10.1038/sj.cdd.4400835
- [182] Rotschafer, S.E., Allen-Sharpley, M.R., Cramer, K.S. (2016). Axonal Cleaved Caspase-3 Regulates Axon Targeting and Morphogenesis in the Developing Auditory Brainstem, *Frontiers in Neural Circuits*, C. 10. doi:10.3389/fncir.2016.00084
- [183] Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. Elegans CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3, *Cell*, C. 90, Sayı 3, 405–413. doi:10.1016/S0092-8674(00)80501-2
- [184] Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C.-Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A. (1996). Decreased Apoptosis in the Brain and Premature Lethality in CPP32-Deficient Mice, *Nature*, C. 384, Sayı 6607, 368–372. doi:10.1038/384368a0
- [185] Dalmau, I., Vela, J.M., González, B., Finsen, B., Castellano, B. (2003). Dynamics of Microglia in the Developing Rat Brain, *Journal of Comparative Neurology*, C. 458, Sayı 2, 144–157. doi:10.1002/cne.10572
- [186] Erturk, A., Wang, Y., Sheng, M. (2014). Local Pruning of Dendrites and Spines by Caspase-3-Dependent and Proteasome-Limited Mechanisms, *Journal of Neuroscience*, C. 34, Sayı 5, 1672–1688. doi:10.1523/JNEUROSCI.3121-13.2014
- [187] Fan, W., Dai, Y., Xu, H., Zhu, X., Cai, P., Wang, L., Sun, C., Hu, C., Zheng, P., Zhao, B. (2014). Caspase-3 Modulates Regenerative Response After Stroke, *Stem Cells*, C. 32, Sayı 2, 473–486. doi:10.1002/stem.1503
- [188] Martinez, B., Peplow, P. (2021). MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration: Advances and Limitations, *Neural Regeneration Research*, C. 16, Sayı 3, 440. doi:10.4103/1673-5374.293131
- [189] Xu, J., Zheng, Y., Wang, L., Liu, Y., Wang, X., Li, Y., Chi, G. (2021). MiR-124: A Promising Therapeutic Target for Central Nervous System Injuries and Diseases, *Cellular and Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s10571-021-01091-6
- [190] Ha, M., Kim, V.N. (2014). Regulation of MicroRNA Biogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 15, Sayı 8, 509–524. doi:10.1038/nrm3838
- [191] Michlewski, G., Cáceres, J.F. (2019). Post-Transcriptional Control of MiRNA Biogenesis, *RNA*, C. 25, Sayı 1, 1–16. doi:10.1261/rna.068692.118
- [192] Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2019). Regulation of MicroRNA Biogenesis and Its Crosstalk with Other Cellular Pathways, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 20, Sayı 1, 5–20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1
- [193] Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., Wong, G. (2019). Trends in the Development of MiRNA Bioinformatics Tools, *Briefings in Bioinformatics*, C. 20, Sayı 5, 1836–1852. doi:10.1093/bib/bby054
- [194] Liu, J., Zhou, F., Guan, Y., Meng, F., Zhao, Z., Su, Q., Bao, W., Wang, X., Zhao, J., Huo, Z., Zhang, L., Zhou, S., Chen, Y., Wang, X. (2022). The Biogenesis of MiRNAs and Their Role in the Development of Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Cells*, C. 11, Sayı 3, 572. doi:10.3390/cells11030572
- [195] Slota, Booth. (2019). MicroRNAs in Neuroinflammation: Implications in Disease Pathogenesis, Biomarker Discovery and Therapeutic Applications, *Non-Coding RNA*, C. 5, Sayı 2, 35. doi:10.3390/ncrna5020035
- [196] Sheedy, F.J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E.J., Martin, C., O'Leary, J.J., Ruan, Q., Johnson, D.S., Chen, Y., O'Neill, L.A.J. (2010). Negative Regulation of TLR4 via Targeting of the Proinflammatory Tumor Suppressor PDCD4 by the MicroRNA MiR-21, *Nature Immunology*, C. 11, Sayı 2, 141–147. doi:10.1038/ni.1828
- [197] Wang, S., Wan, X., Ruan, Q. (2016). The MicroRNA-21 in Autoimmune Diseases, *International*

- [198] Ji, W., Jiao, J., Cheng, C., Shao, J. (2018). MicroRNA-21 in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury, *Neurochemical Research*, C. 43, Sayı 10, 1863–1868. doi:10.1007/s11064-018-2602-z
- [199] Lopez, M.S., Dempsey, R.J., Vemuganti, R. (2017). The MicroRNA MiR-21 Conditions the Brain to Protect against Ischemic and Traumatic Injuries., *Conditioning Medicine*, C. 1, Sayı 1, 35–46
- [200] Jiang, L., Zhang, Y., Guo, L., Liu, C., Wang, P., Ren, W. (2021). Exosomal MicroRNA-107 Reverses Chemotherapeutic Drug Resistance of Gastric Cancer Cells through HMGA2/MTOR/P-Gp Pathway, *BMC Cancer*, C. 21, Sayı 1, 1290. doi:10.1186/s12885-021-09020-y
- [201] Fan, Q., Wu, M., Li, C., Li, J. (2022). MiR-107 Aggravates Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation (OGD/R)-Induced Injury Through Inactivating PI3K-AKT Signalling Pathway by Targeting FGF9/FGF12 in PC12 Cells, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, C. 31, Sayı 4, 106295. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106295
- [202] Sabaie, H., Amirinejad, N., Asadi, M.R., Jalaiei, A., Daneshmandpour, Y., Rezaei, O., Taheri, M., Rezazadeh, M. (2021). Molecular Insight Into the Therapeutic Potential of Long Non-Coding RNA-Associated Competing Endogenous RNA Axes in Alzheimer’s Disease: A Systematic Scoping Review, *Frontiers in Aging Neuroscience*, C. 13. doi:10.3389/fnagi.2021.742242
- [203] Ghafouri-Fard, S., Glassy, M.C., Abak, A., Hussen, B.M., Niazi, V., Taheri, M. (2021). The Interaction between MiRNAs/LncRNAs and Notch Pathway in Human Disorders, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, C. 138, 111496. doi:10.1016/j.biopha.2021.111496
- [204] Xu, J., Hao, Y., Gao, X., Wu, Y., Ding, Y., Wang, B. (2022). CircSLC7A6 Promotes the Progression of Wilms’ Tumor via MicroRNA-107/ ABL Proto-Oncogene 2 Axis, *Bioengineered*, C. 13, Sayı 1, 308–318. doi:10.1080/21655979.2021.2001204
- [205] Tomasello, U., Klingler, E., Niquille, M., Mule, N., Santinha, A.J., de Vevey, L., Prados, J., Platt, R.J., Borrell, V., Jabaudon, D., Dayer, A. (2022). MiR-137 and MiR-122, Two Outer Subventricular Zone Non-Coding RNAs, Regulate Basal Progenitor Expansion and Neuronal Differentiation, *Cell Reports*, C. 38, Sayı 7, 110381. doi:10.1016/j.celrep.2022.110381
- [206] Martinez, B., Peplow, P. (2021). Altered MicroRNA Expression in Animal Models of Huntington’s Disease and Potential Therapeutic Strategies, *Neural Regeneration Research*, C. 16, Sayı 11, 2159. doi:10.4103/1673-5374.310673
- [207] Jickling, G.C., Ander, B.P., Zhan, X., Noblett, D., Stamova, B., Liu, D. (2014). MicroRNA Expression in Peripheral Blood Cells Following Acute Ischemic Stroke and Their Predicted Gene Targets, *PLoS ONE*, C. 9, Sayı 6, e99283. doi:10.1371/journal.pone.0099283
- [208] Mousavi Majd, A., Ebrahim Tabar, F., Afghani, A., Ashrafpour, S., Dehghan, S., Gol, M., Ashrafpour, M., Pourabdolhossein, F. (2018). Inhibition of GABA A Receptor Improved Spatial Memory Impairment in the Local Model of Demyelination in Rat Hippocampus, *Behavioural Brain Research*, C. 336, 111–121. doi:10.1016/j.bbr.2017.08.046
- [209] Gitler, A.D., Dhillon, P., Shorter, J. (2017). Neurodegenerative Disease: Models, Mechanisms, and a New Hope, *Disease Models & Mechanisms*, C. 10, Sayı 5, 499–502. doi:10.1242/dmm.030205
- [210] Ahmadi, A., Fallah Vastani, Z., Abounoori, M., Azizi, M., Labani-Motlagh, A., Mami, S., Mami, S. (2022). The Role of NK and NKT Cells in the Pathogenesis and Improvement of Multiple Sclerosis Following Disease-Modifying Therapies, *Health Science Reports*, C. 5, Sayı 1. doi:10.1002/hsr2.489
- [211] Chiurchiù, V., van der Stelt, M., Centonze, D., Maccarrone, M. (2018). The Endocannabinoid System and Its Therapeutic Exploitation in Multiple Sclerosis: Clues for Other Neuroinflammatory Diseases, *Progress in Neurobiology*, C. 160, 82–100. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.10.007
- [212] Durães, F., Pinto, M., Sousa, E. (2018). Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases, *Pharmaceuticals*, C. 11, Sayı 2, 44. doi:10.3390/ph11020044
- [213] Rayssiguier, Y., Libako, P., Nowacki, W., Rock, E. (2010). Magnesium Deficiency and Metabolic Syndrome: Stress and Inflammation May Reflect Calcium Activation., *Magnesium Research*, C. 23, Sayı 2, 73–80. doi:10.1684/mrh.2010.0208
- [214] Cazzola, R., Della Porta, M., Manoni, M., Iotti, S., Pinotti, L., Maier, J.A. (2020). Going to the Roots

- of Reduced Magnesium Dietary Intake: A Tradeoff between Climate Changes and Sources, *Heliyon*, C. 6, Sayı 11, e05390. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05390
- [215] Alam, A.B., Lutsey, P.L., Gottesman, R.F., Tin, A., Alonso, A. (2020). Low Serum Magnesium Is Associated with Incident Dementia in the ARIC-NCS Cohort, *Nutrients*, C. 12, Sayı 10, 3074. doi:10.3390/nu12103074
- [216] Kieboom, B.C.T., Licher, S., Wolters, F.J., Ikram, M.K., Hoorn, E.J., Zietse, R., Stricker, B.H., Ikram, M.A. (2017). Serum Magnesium Is Associated with the Risk of Dementia, *Neurology*, C. 89, Sayı 16, 1716–1722. doi:10.1212/WNL.0000000000004517
- [217] Li, W., Yu, J., Liu, Y., Huang, X., Abumaria, N., Zhu, Y., Huang, X., Xiong, W., Ren, C., Liu, X.-G., Chui, D., Liu, G. (2014). Elevation of Brain Magnesium Prevents Synaptic Loss and Reverses Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Mouse Model, *Molecular Brain*, C. 7, Sayı 1, 65. doi:10.1186/s13041-014-0065-y
- [218] Huang, Y., Huang, X., Zhang, L., Han, F., Pang, K.-L., Li, X., Shen, J.-Y. (2018). Magnesium Boosts the Memory Restorative Effect of Environmental Enrichment in Alzheimer's Disease Mice, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, C. 24, Sayı 1, 70–79. doi:10.1111/cns.12775
- [219] Espiritu, A.I., Remalante-Rayco, P.P.M. (2021). High-Dose Biotin for Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, C. 55, 103159. doi:10.1016/j.msard.2021.103159
- [220] Cummins, J.M., Velculescu, V.E. (2006). Implications of Micro-RNA Profiling for Cancer Diagnosis, *Oncogene*, C. 25, Sayı 46, 6220–6227. doi:10.1038/sj.onc.1209914
- [221] Kosik, K.S., Krichevsky, A.M. (2005). The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective, *Neuron*, C. 47, Sayı 6, 779–782. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.019
- [222] Wang, L., Zhang, L. (2020). Circulating Exosomal MiRNA as Diagnostic Biomarkers of Neurodegenerative Diseases, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, C. 13. doi:10.3389/fnmol.2020.00053
- [223] Ahmed, F.E. (2007). Role of MiRNA in Carcinogenesis and Biomarker Selection: A Methodological View, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, C. 7, Sayı 5, 569–603. doi:10.1586/14737159.7.5.569
- [224] Wei, J.-J., Soteropoulos, P. (2008). MicroRNA: A New Tool for Biomedical Risk Assessment and Target Identification in Human Uterine Leiomyomas, *Seminars in Reproductive Medicine*, C. 26, Sayı 06, 515–521. doi:10.1055/s-0028-1096131
- [225] Konovalova, Gerasymchuk, Parkkinen, Chmielarz, Domanskyi. (2019). Interplay between MicroRNAs and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 20, Sayı 23, 6055. doi:10.3390/ijms20236055
- [226] Backes, C., Meese, E., Keller, A. (2016). Specific MiRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects, *Molecular Diagnosis & Therapy*, C. 20, Sayı 6, 509–518. doi:10.1007/s40291-016-0221-4
- [227] Junker, A., Krumbholz, M., Eisele, S., Mohan, H., Augstein, F., Bittner, R., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Meinl, E. (2009). MicroRNA Profiling of Multiple Sclerosis Lesions Identifies Modulators of the Regulatory Protein CD47, *Brain*, C. 132, Sayı 12, 3342–3352. doi:10.1093/brain/awp300
- [228] Redell, J.B., Zhao, J., Dash, P.K. (2011). Altered Expression of MiRNA-21 and Its Targets in the Hippocampus after Traumatic Brain Injury, *Journal of Neuroscience Research*, C. 89, Sayı 2, 212–221. doi:10.1002/jnr.22539
- [229] Hu, T., Zhou, F.-J., Chang, Y.-F., Li, Y.-S., Liu, G.-C., Hong, Y., Chen, H.-L., Xiyang, Y.-B., Bao, T. (2015). MiR21 Is Associated with the Cognitive Improvement Following Voluntary Running Wheel Exercise in TBI Mice, *Journal of Molecular Neuroscience*, C. 57, Sayı 1, 114–122. doi:10.1007/s12031-015-0584-8
- [230] Harrison, E.B., Hochfelder, C.G., Lamberty, B.G., Meays, B.M., Morsey, B.M., Kelso, M.L., Fox, H.S., Yelamanchili, S. V. (2016). Traumatic Brain Injury Increases Levels of MiR-21 in Extracellular Vesicles: Implications for Neuroinflammation, *FEBS Open Bio*, C. 6, Sayı 8, 835–846.

doi:10.1002/2211-5463.12092

- [231] Chatterjee, N., Sanphui, P., Kemeny, S., Greene, L.A., Biswas, S.C. (2016). Role and Regulation of Cdc25A Phosphatase in Neuron Death Induced by NGF Deprivation or β -Amyloid, *Cell Death Discovery*, C. 2, Sayı 1, 16083. doi:10.1038/cddiscovery.2016.83
- [232] Ma, X., Zhou, J., Zhong, Y., Jiang, L., Mu, P., Li, Y., Singh, N., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. (2014). Expression, Regulation and Function of MicroRNAs in Multiple Sclerosis, *International Journal of Medical Sciences*, C. 11, Sayı 8, 810–818. doi:10.7150/ijms.8647
- [233] Martinez, B., Peplow, P. (2020). MicroRNAs in Blood and Cerebrospinal Fluid as Diagnostic Biomarkers of Multiple Sclerosis and to Monitor Disease Progression, *Neural Regeneration Research*, C. 15, Sayı 4, 606. doi:10.4103/1673-5374.266905
- [234] Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N. (2008). Widespread Changes in Protein Synthesis Induced by MicroRNAs, *Nature*, C. 455, Sayı 7209, 58–63. doi:10.1038/nature07228
- [235] Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2009). Most Mammalian MRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs, *Genome Research*, C. 19, Sayı 1, 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
- [236] Tan, J.Y., Marques, A.C. (2014). The MiRNA-Mediated Cross-Talk between Transcripts Provides a Novel Layer of Posttranscriptional Regulation., *Advances in Genetics*, C. 85, 149–99. doi:10.1016/B978-0-12-800271-1.00003-2
- [237] Xu, Z., Feng, X., Zhu, W., Qiu, M. (2021). Identification of Key Genes and MicroRNAs for Multiple Sclerosis Using Bioinformatics Analysis, *Medicine*, C. 100, Sayı 48, e27667. doi:10.1097/MD.00000000000027667
- [238] Nelson, P.T., Wang, W.-X. (2010). MiR-107 Is Reduced in Alzheimer's Disease Brain Neocortex: Validation Study, *Journal of Alzheimer's Disease*, C. 21, Sayı 1, 75–79. doi:10.3233/JAD-2010-091603
- [239] Wang, W.-X., Wilfred, B.R., Madathil, S.K., Tang, G., Hu, Y., Dimayuga, J., Stromberg, A.J., Huang, Q., Saatman, K.E., Nelson, P.T. (2010). MiR-107 Regulates Granulin/Progranulin with Implications for Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease, *The American Journal of Pathology*, C. 177, Sayı 1, 334–345. doi:10.2353/ajpath.2010.091202
- [240] Wang, W.-X., Rajeev, B.W., Stromberg, A.J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I., Nelson, P.T. (2008). The Expression of MicroRNA MiR-107 Decreases Early in Alzheimer's Disease and May Accelerate Disease Progression through Regulation of β -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1, *Journal of Neuroscience*, C. 28, Sayı 5, 1213–1223. doi:10.1523/JNEUROSCI.5065-07.2008
- [241] Selmaj, I., Cichalewska, M., Namiecinska, M., Galazka, G., Horzelski, W., Selmaj, K.W., Mycko, M.P. (2017). Global Exosome Transcriptome Profiling Reveals Biomarkers for Multiple Sclerosis, *Annals of Neurology*, C. 81, Sayı 5, 703–717. doi:10.1002/ana.24931
- [242] Al-Ghezi, Z.Z., Miranda, K., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S. (2019). Combination of Cannabinoids, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, Ameliorates Experimental Multiple Sclerosis by Suppressing Neuroinflammation Through Regulation of MiRNA-Mediated Signaling Pathways, *Frontiers in Immunology*, C. 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01921
- [243] Liu, D.Z., Jickling, G.C., Ander, B.P., Hull, H., Zhan, X., Cox, C., Shroff, N., Dykstra-Aiello, C., Stamova, B., Sharp, F.R. (2016). Elevating MicroRNA-122 in Blood Improves Outcomes after Temporary Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, C. 36, Sayı 8, 1374–1383. doi:10.1177/0271678X15610786
- [244] He, W., Chen, S., Chen, X., Li, S., Chen, W. (2016). Bioinformatic Analysis of Potential MicroRNAs in Ischemic Stroke, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, C. 25, Sayı 7, 1753–1759. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.023
- [245] Orhan, C., Tuzcu, M., Deeh Defo, P.B., Sahin, N., Ojalvo, S.P., Sylla, S., Komorowski, J.R., Sahin, K. (2022). Effects of a Novel Magnesium Complex on Metabolic and Cognitive Functions and the Expression of Synapse-Associated Proteins in Rats Fed a High-Fat Diet, *Biological Trace Element*

- Research*, C. 200, Sayı 1, 247–260. doi:10.1007/s12011-021-02619-z
- [246] Su, N.-Y., Peng, T.-C., Tsai, P.-S., Huang, C.-J. (2013). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway Is Involved in Mediating the Anti-Inflammation Effects of Magnesium Sulfate, *Journal of Surgical Research*, C. 185, Sayı 2, 726–732. doi:10.1016/j.jss.2013.06.030
- [247] Heras-Sandoval, D., Avila-Muñoz, E., Arias, C. (2011). The Phosphatidylinositol 3-Kinase/MTor Pathway as a Therapeutic Target for Brain Aging and Neurodegeneration, *Pharmaceuticals*, C. 4, Sayı 8, 1070–1087. doi:10.3390/ph4081070
- [248] Rosenberger, A.F.N., Hilhorst, R., Coart, E., García Barrado, L., Naji, F., Rozemuller, A.J.M., van der Flier, W.M., Scheltens, P., Hoozemans, J.J.M., van der Vies, S.M. (2015). Protein Kinase Activity Decreases with Higher Braak Stages of Alzheimer's Disease Pathology, *Journal of Alzheimer's Disease*, C. 49, Sayı 4, 927–943. doi:10.3233/JAD-150429
- [249] Choi, K.-H., Park, M.-S., Kim, H.-S., Kim, K.-T., Kim, H.-S., Kim, J.-T., Kim, B.-C., Kim, M.-K., Park, J.-T., Cho, K.-H. (2015). Alpha-Lipoic Acid Treatment Is Neurorestorative and Promotes Functional Recovery after Stroke in Rats, *Molecular Brain*, C. 8, Sayı 1, 9. doi:10.1186/s13041-015-0101-6
- [250] Kaur, S., Bansal, Y., Kumar, R., Bansal, G. (2020). A Panoramic Review of IL-6: Structure, Pathophysiological Roles and Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, C. 28, Sayı 5, 115327. doi:10.1016/j.bmc.2020.115327
- [251] Pompura, S.L., Dominguez-Villar, M. (2018). The PI3K/AKT Signaling Pathway in Regulatory T-Cell Development, Stability, and Function, *Journal of Leukocyte Biology*, C. 103, Sayı 6, 1065–1076. doi:10.1002/JLB.2MIR0817-349R
- [252] Yang, X., Wang, M., Zhou, Q., Bai, Y., Liu, J., Yang, J., Li, L., Li, G., Luo, L. (2022). Macamide B Pretreatment Attenuates Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage of Mice Induced Apoptosis and Regulates Autophagy via the PI3K/AKT Signaling Pathway, *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-022-02751-4
- [253] Feng, Y., Ju, Y., Yan, Z., Ji, M., Yang, M., Wu, Q., Wang, L., Sun, G. (2022). Protective Role of Wogonin Following Traumatic Brain Injury by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis via the PI3K/Nrf2/HO-1 Pathway, *International Journal of Molecular Medicine*, C. 49, Sayı 4, 53. doi:10.3892/ijmm.2022.5109
- [254] Khan, H., Singh, A., Thapa, K., Garg, N., Grewal, A.K., Singh, T.G. (2021). Therapeutic Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K) Pathway in Cerebral Ischemic Injury, *Brain Research*, C. 1761, 147399. doi:10.1016/j.brainres.2021.147399
- [255] Dal-Cim, T., Molz, S., Egea, J., Parada, E., Romero, A., Budni, J., Martín de Saavedra, M.D., Barrio, L. del, Tasca, C.I., López, M.G. (2012). Guanosine Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells against Mitochondrial Oxidative Stress by Inducing Heme Oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway, *Neurochemistry International*, C. 61, Sayı 3, 397–404. doi:10.1016/j.neuint.2012.05.021
- [256] Zhang, L., Ding, K., Wang, H., Wu, Y., Xu, J. (2016). Traumatic Brain Injury-Induced Neuronal Apoptosis Is Reduced Through Modulation of PI3K and Autophagy Pathways in Mouse by FTY720, *Cellular and Molecular Neurobiology*, C. 36, Sayı 1, 131–142. doi:10.1007/s10571-015-0227-1
- [257] Petri, S., Körner, S., Kiaei, M. (2012). Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS, *Neurology Research International*, C. 2012, 1–7. doi:10.1155/2012/878030
- [258] Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R., Chen, P.-C. (2008). The Nrf2-ARE Pathway, *Annals of the New York Academy of Sciences*, C. 1147, Sayı 1, 61–69. doi:10.1196/annals.1427.036
- [259] Orhan, C., Er, B., Deeh, P.B.D., Bilgic, A.A., Ojalvo, S.P., Komorowski, J.R., Sahin, K. (2021). Different Sources of Dietary Magnesium Supplementation Reduces Oxidative Stress by Regulation Nrf2 and NF-KB Signaling Pathways in High-Fat Diet Rats, *Biological Trace Element Research*, C. 199, Sayı 11, 4162–4170. doi:10.1007/s12011-020-02526-9
- [260] Shal, B., Khan, A., Khan, A.U., Ullah, R., Ali, G., Islam, S.U., Haq, I. ul, Ali, H., Seo, E.-K., Khan, S. (2021). Alleviation of Memory Deficit by Bergenin via the Regulation of Reelin and Nrf-2/NF-

- KB Pathway in Transgenic Mouse Model, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 22, Sayı 12, 6603. doi:10.3390/ijms22126603
- [261] Lee, D.-H., Gold, R., Linker, R.A. (2012). Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 13, Sayı 12, 11783–11803. doi:10.3390/ijms130911783
- [262] Nguyen, C.D., Yoo, J., Hwang, S.-Y., Cho, S.-Y., Kim, M., Jang, H., No, K.O., Shin, J.C., Kim, J.-H., Lee, G. (2022). Bee Venom Activates the Nrf2/HO-1 and TrkB/CREB/BDNF Pathways in Neuronal Cell Responses against Oxidative Stress Induced by A β 1–42, *International Journal of Molecular Sciences*, C. 23, Sayı 3, 1193. doi:10.3390/ijms23031193
- [263] Saha, S., Buttari, B., Profumo, E., Tucci, P., Saso, L. (2022). A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, C. 15. doi:10.3389/fncel.2021.787258
- [264] Ramsey, C.P., Glass, C.A., Montgomery, M.B., Lindl, K.A., Ritson, G.P., Chia, L.A., Hamilton, R.L., Chu, C.T., Jordan-Sciutto, K.L. (2007). Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, C. 66, Sayı 1, 75–85. doi:10.1097/nen.0b013e31802d6da9
- [265] Rojo, A.I., Pajares, M., Rada, P., Nuñez, A., Nevado-Holgado, A.J., Killik, R., Van Leuven, F., Ribe, E., Lovestone, S., Yamamoto, M., Cuadrado, A. (2017). NRF2 Deficiency Replicates Transcriptomic Changes in Alzheimer's Patients and Worsens APP and TAU Pathology, *Redox Biology*, C. 13, 444–451. doi:10.1016/j.redox.2017.07.006
- [266] Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., Heurtaux, T. (2016). Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant, *PLOS ONE*, C. 11, Sayı 9, e0162717. doi:10.1371/journal.pone.0162717
- [267] Alam, S.-I., Kim, M.-W., Shah, F.A., Saeed, K., Ullah, R., Kim, M.-O. (2021). Alpha-Linolenic Acid Impedes Cadmium-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in Mouse Brain, *Cells*, C. 10, Sayı 9, 2274. doi:10.3390/cells10092274
- [268] Khan, A., Ikram, M., Muhammad, T., Park, J., Kim, M.O. (2019). Caffeine Modulates Cadmium-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Cognitive Impairments by Regulating Nrf-2/HO-1 In Vivo and In Vitro, *Journal of Clinical Medicine*, C. 8, Sayı 5, 680. doi:10.3390/jcm8050680
- [269] Khan, I., Saeed, K., Jo, M.G., Kim, M.O. (2021). 17- β Estradiol Rescued Immature Rat Brain against Glutamate-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration via Regulating Nrf2/HO-1 and MAP-Kinase Signaling Pathway, *Antioxidants*, C. 10, Sayı 6, 892. doi:10.3390/antiox10060892
- [270] Chen, N., Wang, J., He, Y., Xu, Y., Zhang, Y., Gong, Q., Yu, C., Gao, J. (2020). Trilobatin Protects Against A β 25–35-Induced Hippocampal HT22 Cells Apoptosis Through Mediating ROS/P38/Caspase 3-Dependent Pathway, *Frontiers in Pharmacology*, C. 11. doi:10.3389/fphar.2020.00584
- [271] Lee, J.A., Kwon, Y.-W., Kim, H.R., Shin, N., Son, H.J., Cheong, C.S., Kim, D.J., Hwang, O. (2022). A Novel Pyrazolo[3,4- d]Pyrimidine Induces Heme Oxygenase-1 and Exerts Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects, *Molecules and Cells*, C. 45, Sayı 3, 134–147. doi:10.14348/molcells.2021.0074
- [272] Zhao, Q., Qu, R., Teng, L., Yin, C., Yuan, Y. (2019). HO-1 Protects the Nerves of Rats with Cerebral Hemorrhage by Regulating the PI3K/AKT Signaling Pathway, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, C. Volume 15, 1459–1468. doi:10.2147/NDT.S197030
- [273] Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., Bettuzzi, S. (2018). Molecular Targets of Epigallocatechin—Gallate (EGCG): A Special Focus on Signal Transduction and Cancer, *Nutrients*, C. 10, Sayı 12, 1936. doi:10.3390/nu10121936
- [274] Kim, B.-W., Koppula, S., Hong, S.-S., Jeon, S.-B., Kwon, J.-H., Hwang, B.-Y., Park, E.-J., Choi, D.-K. (2013). Regulation of Microglia Activity by Glucocalyxin-A: Attenuation of Lipopolysaccharide-Stimulated Neuroinflammation through NF-KB and P38 MAPK Signaling Pathways, *PLoS ONE*, C. 8, Sayı 2, e55792. doi:10.1371/journal.pone.0055792

- [275] Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M., Young, L.S. (1997). Epstein – Barr Virus-Encoded LMP1 and CD40 Mediate IL-6 Production in Epithelial Cells via an NF-KB Pathway Involving TNF Receptor-Associated Factors, *Oncogene*, C. 14, Sayı 24, 2899–2916. doi:10.1038/sj.onc.1201258
- [276] Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Kadri, M., Guiraud, P. (2012). Cadmium-Induced Apoptosis in the BJAB Human B Cell Line: Involvement of PKC/ERK1/2/JNK Signaling Pathways in HO-1 Expression, *Toxicology*, C. 300, Sayı 3, 103–111. doi:10.1016/j.tox.2012.05.003
- [277] Camandola, S., Mattson, M.P. (2007). NF-KB as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, C. 11, Sayı 2, 123–132. doi:10.1517/14728222.11.2.123
- [278] Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998). NF-KB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses, *Annual Review of Immunology*, C. 16, Sayı 1, 225–260. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225
- [279] Guyton, M.K., Brahmachari, S., Das, A., Samantaray, S., Inoue, J., Azuma, M., Ray, S.K., Banik, N.L. (2009). Inhibition of Calpain Attenuates Encephalitogenicity of MBP-Specific T Cells, *Journal of Neurochemistry*, C. 110, Sayı 6, 1895–1907. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06287.x
- [280] Akhtar, R.S., Ness, J.M., Roth, K.A. (2004). Bcl-2 Family Regulation of Neuronal Development and Neurodegeneration, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, C. 1644, Sayı 2–3, 189–203. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.10.013
- [281] Li, J., Yuan, J. (2008). Caspases in Apoptosis and Beyond, *Oncogene*, C. 27, Sayı 48, 6194–6206. doi:10.1038/onc.2008.297
- [282] Feng, X., Hou, H., Zou, Y., Guo, L. (2017). Defective Autophagy Is Associated with Neuronal Injury in a Mouse Model of Multiple Sclerosis, *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. doi:10.17305/bjbms.2017.1696
- [283] Sung, Y.-H., Shin, M.-S., Cho, S., Baik, H.-H., Jin, B.-K., Chang, H.-K., Lee, E.-K., Kim, C.-J. (2010). Depression-like State in Maternal Rats Induced by Repeated Separation of Pups Is Accompanied by a Decrease of Cell Proliferation and an Increase of Apoptosis in the Hippocampus, *Neuroscience Letters*, C. 470, Sayı 1, 86–90. doi:10.1016/j.neulet.2009.12.063
- [284] Liu, Y., Ma, S., Qu, R. (2010). SCLM, Total Saponins Extracted from Chaihu-Jia-Longgu-Muli-Tang , Reduces Chronic Mild Stress-Induced Apoptosis in the Hippocampus in Mice, *Pharmaceutical Biology*, C. 48, Sayı 8, 840–848. doi:10.3109/13880200903296154
- [285] Tian, R.-H., Bai, Y., Li, J.-Y., Guo, K.-M. (2019). Reducing PRLR Expression and JAK2 Activity Results in an Increase in BDNF Expression and Inhibits the Apoptosis of CA3 Hippocampal Neurons in a Chronic Mild Stress Model of Depression, *Brain Research*, C. 1725, 146472. doi:10.1016/j.brainres.2019.146472
- [286] Baek, S.-B., Bahn, G., Moon, S.-J., Lee, J., Kim, K.-H., Ko, I.-G., Kim, S.-E., Sung, Y.-H., Kim, B.-K., Kim, T.-S., Kim, C.-J., Shin, M.-S. (2011). The Phosphodiesterase Type-5 Inhibitor, Tadalafil, Improves Depressive Symptoms, Ameliorates Memory Impairment, as Well as Suppresses Apoptosis and Enhances Cell Proliferation in the Hippocampus of Maternal-Separated Rat Pups, *Neuroscience Letters*, C. 488, Sayı 1, 26–30. doi:10.1016/j.neulet.2010.10.074
- [287] Xu, C., Wang, X., Gu, C., Zhang, H., Zhang, R., Dong, X., Liu, C., Hu, X., Ji, X., Huang, S., Chen, L. (2017). Celastrol Ameliorates Cd-Induced Neuronal Apoptosis by Targeting NOX2-Derived ROS-Dependent PP5-JNK Signaling Pathway, *Journal of Neurochemistry*, C. 141, Sayı 1, 48–62. doi:10.1111/jnc.13966
- [288] Wei, W., Lan, X., Liu, N., Yang, J., Du, J., Ma, L., Zhang, W., Niu, J., Sun, T., Yu, J. (2019). Echinacoside Alleviates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat by Enhancing Antioxidant Capacity and Inhibiting Apoptosis, *Neurochemical Research*, C. 44, Sayı 7, 1582–1592. doi:10.1007/s11064-019-02782-9
- [289] Liu, Y., Huang, J., Zheng, X., Yang, X., Ding, Y., Fang, T., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, X., Luo, X., Guo, A., Newell, K.A., Yu, Y., Huang, X.-F. (2017). Luteolin, a Natural Flavonoid, Inhibits Methylglyoxal Induced Apoptosis via the MTOR/4E-BP1 Signaling Pathway, *Scientific Reports*, C. 7, Sayı 1, 7877. doi:10.1038/s41598-017-08204-6

- [290] Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., Moskowitz, M.A. (1998). Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia., *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, C. 18, Sayı 10, 3659–68
- [291] Shi, C.-X., Qi, Q.-H., Xu, J., Zhao, W.-W. (2020). Protective Effect of Magnesium Sulfate on Cranial Nerves in Preeclampsia Rats through NF-KB/ICAM-1 Pathway., *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, C. 24, Sayı 6, 2785–2794. doi:10.26355/eurev_202003_20639
- [292] Jiang, W., Guo, H., Su, D., Xu, H., Gu, H., Hao, K. (2019). Ameliorative Effect of Magnesium Isoglycyrrhizinate on Hepatic Encephalopathy by Epirubicin, *International Immunopharmacology*, C. 75, 105774. doi:10.1016/j.intimp.2019.105774
- [293] Bagheri, G., Rezaee, R., Tsarouhas, K., Docea, A., Shahraki, J., Shahriari, M., Wilks, M., Jahantigh, H., Tabrizian, K., Moghadam, A., Bagheri, S., Spandidos, D., Tsatsakis, A., Hashemzaei, M. (2018). Magnesium Sulfate Ameliorates Carbon Monoxide-induced Cerebral Injury in Male Rats, *Molecular Medicine Reports*. doi:10.3892/mmr.2018.9771



ÖZGEÇMİŞ

Beşir ER

Category	Value
Category 1	Value 1
Category 2	Value 2
Category 3	Value 3
Category 4	Value 4
Category 5	Value 5
Category 6	Value 6
Category 7	Value 7

[illegible]

- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
■ [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
■ [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
■ [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
■ [REDACTED]
[REDACTED]

AKADEMİK FAALİYETLER

Makaleler:

1. Gul, S., Cicek, D., Sahin, K., Ozercan, I.H., Orhan, C., Demir, B., Er, B. (2021). Effect of boron element on photo aging in rats. *Journal of Photochemistry Photobiology, B: Biology* doi:10.1016/j.jphotobiol.2022.112440
2. Demir, B., Cicek, D., Orhan, C., Er, B., Erten, F., Tuzcu, M., Ozercan, I. H., Sahin, N., Komorowski, J., Ojalvo, S. P., Sylla, S., Sahin, K. (2022). Effects of a Combination of Arginine Silicate Inositol Complex and a Novel Form of Biotin on Hair and Nail Growth in a Rodent Model. *Biological trace element research*, 1–15. Advance online publication. doi: 10.1007/s12011-022-03176-9
3. Muz, O. E., Orhan, C., Tuzcu, M., Er, B., Morde, A. A., Padigar, M., Ozercan, I. H., Sahin, K. (2022). Protective Effect of Allyl Isothiocyanate in an Experimentally Induced Rat Model for Dry Eye Syndrome. *Current eye research*, 47(5), 704–714. doi: 10.1080/02713683.2021.2021538
4. Sahin, E., Orhan, C., Erten, F., Er, B., Acharya, M., Morde, A. A., Padigar, M., Sahin, K. (2021). Next-Generation Ultrasol Curcumin Boosts Muscle Endurance and Reduces Muscle Damage in Treadmill-Exhausted Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1692. doi: 10.3390/antiox10111692
5. Sahin, N., Orhan, C., Gencoglu, H., Er, B., Ozercan, I. H., Komorowski, J. R., Sahin, K. (2021). Effects of maca (*Lepidium meyenii*) on nutrient digestibility and major nutrient transporters in rats fed a high-fat diet. *Food science nutrition*, 9(10), 5765–5773. doi: 10.1002/fsn3.2545.
6. Orhan, C., Erten, F., Er, B., Tuzcu, M., Şahin, N., Durmaz Kurşun, Ö. E., Juturu, V., Şahin, K. (2021). Lutein/zeaxanthin isomers regulate neurotrophic factors and synaptic plasticity in trained rats. *Turkish journal of medical sciences*, 51(4), 2167–2176. <https://doi.org/10.3906/sag-2101-264>
7. Orhan, C., Sahin, E., Er, B., Tuzcu, M., Lopes, A. P., Sahin, N., Juturu, V., Sahin, K. (2021). Effects of Exercise Combined with Undenatured Type II Collagen on Endurance Capacity, Antioxidant Status, Muscle Lipogenic Genes and E3 Ubiquitin Ligases in Rats. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(3), 851. <https://doi.org/10.3390/ani11030851>. doi: 10.3390/ani11030851.
8. Yabas, M., Orhan, C., Er, B., Tuzcu, M., Durmus, A. S., Ozercan, I. H., Sahin, N., Bhanuse, P., Morde, A. A., Padigar, M., Sahin, K. (2021). A Next Generation Formulation of Curcumin Ameliorates Experimentally Induced Osteoarthritis in Rats via Regulation of Inflammatory Mediators. *Frontiers in immunology*, 12, 609629. doi: 10.3389/fimmu.2021.609629.
9. Erten, F., Yenice, E., Orhan, C., Er, B., Demirel Öner, P., Defo Deeh, P. B., Şahin, K. (2021). Genistein suppresses the inflammation and GSK-3 pathway in an animal model of spontaneous ovarian cancer. *Turkish journal of medical sciences*, 51(3), 1465–1471. doi: 10.3906/sag-2007-254.
10. Orhan, C., Er, B., Deeh, P., Bilgic, A. A., Ojalvo, S. P., Komorowski, J. R., Sahin, K. (2021). Different Sources of Dietary Magnesium Supplementation Reduces Oxidative Stress by Regulation Nrf2 and NF-κB Signaling Pathways in High-Fat Diet Rats. *Biological trace element research*, 199(11), 4162–4170. doi: 10.1007/s12011-020-02526-9.
11. Erten, F., Orhan, C., Tuzcu, M., Er, B., Defo Deeh, P. B., Sahin, N., Özercan, I. H., Juturu, V., Sahin, K. (2020). Salacia chinensis exerts its antidiabetic effect by modulating glucose-

regulated proteins and transcription factors in high-fat diet fed-streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of food biochemistry*, 44(12), e13513. doi: 10.1111/jfbc.13513.

12. Sahin, K., Orhan, C., Kucuk, O., Sahin, N., Tuzcu, M., Er, B., Durkee, S., Bellamine, A. (2020). A Dose-Dependent Effect of Carnipure® Tartrate Supplementation on Endurance Capacity, Recovery, and Body Composition in an Exercise Rat Model. *Nutrients*, 12(5), 1519. doi: 10.3390/nu12051519.
13. Pala, R., Sari, M. A., Erten, F., Er, B., Tuzcu, M., Orhan, C., Deeh, P., Sahin, N., Cinar, V., Komorowski, J. R., Sahin, K. (2020). The effects of chromium picolinate on glucose and lipid metabolism in running rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 58, 126434. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126434.
14. Pala, R., Beyaz, F., Tuzcu, M., Er, B., Sahin, N., Cinar, V., Sahin, K. (2018). The effects of coenzyme Q10 on oxidative stress and heat shock proteins in rats subjected to acute and chronic exercise. *Journal of exercise nutrition biochemistry*, 22(3), 14–20. doi:10.20463/jenb.2018.0019
15. Pala, R., Genc, E., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Er, B., Cinar, V., Sahin, K. (2018). L-Carnitine supplementation increases expression of PPAR- γ and glucose transporters in skeletal muscle of chronically and acutely exercised rats. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 64(1), 1–6. doi:10.14715/cmb/2018.64.1.1
16. Erten, F., Er, B., Şahin, K. (2022). Lutein/Zeaksantin İzomerlerinin (L/Zi) Musklin Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi, *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* 36 (1): 72 – 76.
17. Tuzcu Z, Er B, Balcı, T, A., Erdoğan M, Tuzcu, M. (2022). Metotreksat Uygulanan Ratlarda Arjinin Silikat İnositol Kompleksinin Kemik Hasarı Üzerine Etkileri. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*; 36 (1): 42 – 48.

Bildiriler:

1. Er, B., Erten, F., Şahin, K. (2020). Propiyonik asit ile indüklenen otizimli sıçanlarda magnezyum biyotinatin 8-OH-dG ve 8-izoprostan üzerine etkisi. *Presented at the 4th International Zeugma Conference On Scientific Researches*, Gaziantep.
2. Erten, F., Er, B., Şahin, K. (2020). The Effect of magnesium picolinate supplementation on serum 8-OHdG and 8-isoprostane levels in rats fed with a high-fat diet . Presented at the *3rd International Biltek Conference On Science, Technology Current Developments In Social Sciences*, Adana.
3. Erten, F., Er, B., Gençoğlu, H., Şahin, K. (2020). Magnezyum biyotinat uygulaması sıçanlarda UVB ışığa bağlı oluşan deri hasarında NRF2/HO-1 ve KASPAZ-9'u düzenleyebilir, *Balkan zirvesi 2. uluslararası uygulamalı bilimler kongresi*. Edirne
4. Sahin, K., Orhan C, Er, B., Durmus, A. S., Ozercan, I.H., Sahin, N., Padigar, M., Morde, A., Rai, D. (2020). Protective Effect of a Novel Highly Bioavailable Formulation of Curcumin in Experimentally Induced Osteoarthritis Rat Model, *Current Developments in Nutrition, Volume 4, Issue Supplement_2*, 1765, doi:org/10.1093/cdn/nzaa066_020
5. Pala, R., Şenbakar, K., Çinar, V., Sarı, M.S., Er, B., Telceken, H. (2019). The effects of chromium picolinate on liver metabolism in exercised rats. *umteb international congress onvocational technical sciences*. Batumi
6. Erten, F., Er, B., Şahin K. (2022). Yüksek Yağlı Diyet İle Beslenen Sıçanlarda Magnezyum, Çinko ve Selenyum Kombinasyonunun Büyüme ve Transkripsiyon Faktörleri Üzerine Etkisi. Muğla/Türkiye

Projeler:

1. KOSGEB: AR-GE, İnovasyon Destek Programı; Lipopolisakkaritle İndüklenen Septik Şok Modelinde Yeni Bir Ürün Geliştirilmesi- Proje No: 689564 Araştırmacı bursiyer
2. KOSGEB: İnovasyon Destek Programı; Yeni bir fonksiyonel yumurta: likopenli yumurta. Proje No: 195363 Araştırmacı bursiyer
3. KOSGEB: İnovasyon Destek Programı; tavuklarda kemik sağlığı ve yumurta kabuk kalitesi koruyucusu: ASİ-MİX Proje: 145570 Araştırmacı bursiyer
4. KOSGEB: İnovasyon Destek Programı; Yeni Bir Magnezyum Formunun Beslemede Kullanım İmkânının Araştırılması. Proje No: 406179 Araştırmacı bursiyer
5. TUBİTAK 1001: İnsan Ovaryum Kanseri İçin Preklinik Bir Model Olan Yumurta Tavuklarında Rasyona Katılan Kurkuminin Moleküler Mekanizması. Proje No: 113O622 Araştırmacı bursiyer

