T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA MİYELİN BAZİK PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya TOPUZ ATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr.Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman

Doç.Dr. Aslıhan GÜNEL

Mart, 2020

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA MİYELİN BAZİK PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya TOPUZ ATA tarafından hazırlanan tez çalışması 13.03.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr.Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL
Ahi Evran Üniversitesi
Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Dr.Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ, Üye
Trakya Üniversitesi _____

Danışmanım Dr.Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan 'Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalarında Miyelin Bazik Protein Düzeylerinin Araştırılması' başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim

Derya TOPUZ ATA

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 3519 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde bilgileri ile beni aydınlatan ve her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Şenay Vural KORKUT'a ve eş danışmanım Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL'e saygı ve minnetimi sunarım.

Nörodejeneratif hastalıklar ile yaptığımız bu çalışmada bilgisi ile destek sağlayan ve gerekli kaynakları edinmemize yardımcı olan değerli hocamız Prof. Dr. Halil Atilla İDRİSOĞLU'na ve tez çalışmam sürecinde yardımlarıyla sürece katkı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Reşit ÇELİK'e teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında tecrübeleri ile her zaman manevi desteği ile beni yalnız bırakmayan Munise YURTSEVER hocama teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca sevgisi ve ilgisi ile her daim bana destek olan ve her zaman kendimi ileriye taşımam gerektiğini öğreten sevgili annem Sevgi TOPUZ'a ve babam Bayram TOPUZ'a çok teşekkür ederim. Beni her zaman olduğu gibi bu süreçte yalnız bırakamayan ve destekleri ile beni mutlu eden ablam Fatma CEYLAN'a ve eşi Alper CEYLAN'a teşekkür ederim. En zor günlerimde yanımda olan, sevgisi ile motive eden ve sabrın ile moral veren, benimle mutlu olup benimle hüzünlenen sevgili eşim Anıl ATA'ya çok teşekkür ederim.

DERYA TOPUZ ATA

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 2

1.3 Hipotez 3

2 GENEL BİLGİLER 5

2.1 Nöron 5

2.1.1 Miyelin Kılıf 5

2.1.2 Miyelin Bazik Protein 6

2.1.3 Miyelin Bazik Protein Etkileşimleri 8

2.2 Nörodejeneratif Hastalıklar 10

2.2.1 Multiple Skleroz 10

2.2.2 Amyotrofik Lateral Skleroz 11

2.3 Biyobelirteçler 12

2.3.1 Beyin Omurilik Sıvısı Biyomarker 13

2.3.2 Kan Biyomarkerları 13

2.4 Enzim Bağlı İmmünosorbent (Elısa) 14

2.4.1 Doğrudan Elısa 15

2.4.2 Dolaylı Elısa 15

2.4.3 Sandviç Elısa 16

2.4.4 Yarışmalı Elısa 18

3 MATERYAL VE METHOD 20

3.1 Materyal 20

3.1.1 Genel Laboratuvar Malzemeleri 20
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....20
3.1.3 MBP ELISA Kit.....21
3.1.4 Kullanılan Bilgisayar Programları.....22
3.1.5 Etik Kurul Raporu 22
3.1.6 ALS Hasta Grubu.....22
3.1.7. MS Hasta Grubu.....23
3.1.8 Sağlıklı Kontrol 24
3.2 Method 24
3.2.1 Kan Plazmalarının Elde Edilmesi.....24
3.2.2 MBP ELISA Kit uygulaması.....25
3.2.3 İstatiksel Hesaplamalar 27
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 28
4.1 Sonuç.....28
4.2 Öneriler.....32
A PLATE HASTA NUMARALARI 34
B OD DEĞERLERİ 35
C ORTALAMA MBP DEĞERİ HESAPLAMA VE STANDART GRAFİK 36
D HASTA VERİLERİ 37
KAYNAKÇA 42
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 48

SİMGE LİSTESİ

bp	Baz çifti
kDa	Kilo Dalton
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
pg/mL	Pikogram/Mililitre
°C	Santigrat Derece
cc	Santimetre Küp

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Sığır Serum Albumin
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
C9ORF72	Kromozom 9 Açık Okuma Çerçevesi 72
DCTN1	İnsan Dinaktin Alt Birim 1
GOLLİ	Oligodendrosit Genleri
HRP	Yaban Turpu Peroksidaz
LMN	Alt Motor Nöron
MBP	Miyelin Bazik Protein
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sisteminde
NF-L	Nörofilament Hafif Zincir
NF-H	Nörofilament Ağır Zincir
NF-M	Nörofilament Orta Zincir
OPTN	Optineurin
P0	Protein 0
PFN1	Profilin 1
PMP-22	Miyelin Protein-22
PLP	Proteolipid Protein
PSS	Periferik Sinir Sistemi
SOD1	Superoksit Dismutaz 1
UBQLN	Ubiquilin 2
UMN	Üst Motor Nöron
VCP	Valosin İçeren Protein
TARDBP	TAR DNA-Bağlayıcı Protein

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 MSS ve PSS miyelin kılıf 6
Şekil 2.2 Miyelin ana bileşenleri 7
Şekil 2.3 A) Akson görünümü B) 3 boyutlu miyelin kılıf C) Üç lipit sınıfı 9
Şekil 2.4 ELISA tipleri 15
Şekil 2.5 Doğrudan ELISA 15
Şekil 2.6 Dolaylı ELISA.....16
Şekil 2.7 Sandviç ELISA a)Direk sandviç ELISA b)Dolaylı sandviç ELISA 18
Şekil 2.8 Yarışmalı ELISA 19
Şekil 4.1 MBP frekansı.....29
Şekil 4.2 Kruskal-Wallis testi sonucu (0:sağlıklı kontrol 1:ALS hasta grubu2:MS hasta grubu) 29
Şekil 4.3 MBP değerleri 30
Şekil 4.4 Mann-Whitney testi sonucu 30
Şekil 4.5 ALS hastalarının yaş grafiği 31

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Laboratuvar genel malzemeleri 20
Tablo 3.2 Laboratuvarda kullanılan cihazlar 20
Tablo 3.3 ELISA kit içeriği.....21
Tablo 3.4 Laboratuvarda kullanılan bilgisayar programları.....22
Tablo 3.5 ALS grubu demografik bilgileri.....22
Tablo 3.6 MS grubu demografik bilgileri.....23
Tablo 3.7 Sağlıklı kontrol demografik bilgileri 24
Tablo 3.8 MBP standart çözeltilerinin hazırlanması 25
Tablo 3.9 MBP 96 kuyucuklu plate.....26

ÖZET

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA MİYELİN BAZİK PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya TOPUZ ATA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman: Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

Amytrofik lateral skleroz (ALS) hem üst motor nöronlar da hem de alt motor nöronlar da dejenerasyona sebep olan ilerleyici nöromüsküler bir hastalıktır. Sporadik ve ailesel olmak üzere iki farklı şekilde ortaya çıkabilir. Sporadik ALS % 90-95 oranla vakaların büyük çoğunluğunu oluştururken, geriye kalan % 5-10'luk kısım ailesel ALS olarak adlandırılmaktadır. ALS'nin etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Oksidatif stres, mitokondriyal disfonsksiyon, endoplazmik retulum stresi ve aksonal transport bozukluğu gibi birçok mekanizmanın sebep olduğu multifaktöriyel etyopatogenezi nedeniyle tanısı zor konulan bir hastalıktır.

Biyobelirteç, belirli bir hastalığın klinik belirtileri ve sonuçları ile doğrudan bağlantılı bir biyolojik sürecin varlığının veya sonucunun bir göstergesidir. Hastalık sürecinde erken teşhisi mümkün kılmanın bir olası yolu ALS'ye özgün olan biyobelirteçleri tanımlamaktır. Ayrıca hastalığın seviyesini belirlemek, hastalığın ilerleme ve tedavi sürecini takip etmek için biyobelirteçler önemlidir.

Bu çalışmada biyobelirteç adayı olan miyelin bazik protein (MBP) miktarının ALS, MS ve sağlıklı bireylerin plazma örneklerinde karşılaştırılması amaçlandı. Plazma örneklerinde protein ölçümü sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapıldı. Sonuçların analizi SPSS 23.0 programı ile gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, sağlıklı bireyler ile ALS ve MS hastalarının plazma örnekleri arasında MBP seviyelerinde istatiksel olarak önemli farklılıklar bulunmadı. ALS hastaları ile yapılan değerlendirmeler sonucu yaş grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi. ($p<0.05$,$p<0.10$).

Anahtar Kelimeler: Miyelin bazik protein, elisa, als

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MYELIN BASIC PROTEIN LEVELS IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Derya TOPUZ ATA

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL

Amytrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neuromuscular disease that causes degeneration of both upper motor neurons and lower motor neurons. It has two different types, including sporadic and familial. Sporadic ALS constitutes the majority of cases with 90-95%, while 5-10% is called familial ALS. The etiology of ALS is not fully known. It is difficult to diagnose due to multifactorial etiopathogenesis caused by many mechanisms such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, endoplasmic retulum stress and axonal transport disorder.

A biomarker is an indication of the presence or outcome of a biological process that is directly linked to the clinical signs and consequences of a particular disease. One possible way to make early diagnosis possible in the course of the disease is to identify ALS-specific biomarkers. In addition, biomarkers are important to determine the level of the disease and monitor the progression treatment of the disease.

The aim of this study is to compare the amount of Myelin Basic Protein (MBP) as a candidate biomarker for in plasma samples of ALS, MS and controls. Protein measurement was carried out by using sandwich ELISA method in plasma samples. Analysis of results was performed through using SPSS 23.0 program. As a result of the analysis, there were no statistically significant differences in MBP levels between plasma samples of healthy individuals and ALS and MS patients. Significant differences were found between age groups as a result of evaluations with ALS patients. ($p<0.05$, $p<0.10$).

Key Words: Myelin basic protein, elisa, als

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Nöronlar, beyni ve omuriliği bünyesinde barındıran sinir sisteminin yapı taşlarıdır. Bu yapıtaşlarının ilerleyici kaybı ile giden ve bu kayba bağlı olarak sinir sistemi fonksiyonlarının yitimine neden olan hastalık grubuna nörodejeneratif hastalıklar ismi verilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar arasında amyotrofik lateral skleroz, multiple skleroz, alzheimer, parkinson sayılabilir.

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), omurilik, beyin sapı ve serebral korteks'te progresif motor nöron kaybı ile karakterizedir. Genel popülasyonda ALS prevalansı 1: 20.000'dir, 50 ila 55 yaş arasındaki risk daha fazladır [1].

ALS hastalığında yaşam süresini uzatmak, erken ve spesifik tanı yöntemlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Şu anda, ALS için kesin bir teşhis testi veya biyobelirteç yoktur. Nörologlar tanı için klinik kriterleri kullanmaktadır. Hastalığın ilerleyişini objektif olarak değerlendirmek için yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesi önem taşımaktadır [2]. Biyobelirteçler farklı kaynaklardan elde edilebilir. Biyobelirteçlerin belirlenmesinde hastalığın ilerlemesiyle öngörülebilir şekilde değişim göstermesi, hastalardan elde edilebilirliğinin kolay olması, değerlendirilmesinin uygun ve basit olması, hastalık başlangıç sürecinde belirlenebilmesi gibi nitelikler göz önüne alınır [3]. ALS ile ilgili biyobelirteçlerin araştırılması, merkezi sinir sistemi ile olan sıkı etkileşimi nedeniyle, ağırlıklı olarak beyin-omurilik sıvısı (BOS) kullanılarak yapılmıştır [4]. Ancak BOS materyali alımının hastalar için acı verici olması ve etik kurul raporlarının temin zorluğu sebebiyle plazma veya serum örnekleri biyobelirteç taranması için daha uygun kaynaklar olabileceği gösterilmiştir [5].

Miyelinin işlevlerinden biri, aksonu izole etmek ve sodyum kanallarını Ranvier düğümlerine kümelemek ve bu sayede hareket potansiyelinin bir düğümden

diğerine atlamasını sağlamaktır. Bu görevleri sayesinde impuls iletimini hızlandırırlar. Miyelinin protein ve lipid bileşimi gelişim sırasında değişir. Protein bileşimi, miyelin bazik protein (MBP) ve proteolipid protein (PLP) gibi proteinlerin artışı ile şekillenir [6].

MBP son derece baziktir ve pozitif yüke sahiptir. MBP, yeterli derecede esnekliğe sahip olduğundan negatif yüklü lipitler, aktin filamentleri, polianyonik proteinler ve mikrotübüller gibi çeşitli bağlayıcı ortaklarla etkileşime girebilir [7]. Bu etkileşimler, miyelinin nöronlar arası iletimi doğru ve hızlı bir şekilde yapmasına olanak sağlar.

Kantitatif Enzim-Bağlı İmmün Assay (ELISA) çeşitli hastalıklarda aday biyobelirteçleri tespit etmede yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır [8]. Bu yöntemle en çok çalışılan ALS aday protein biyobelirteçleri arasında fosforlanmış nörofilament ağır zinciri (P-NHF) bulunur. Bu proteinin ALS hastalarının beyin omirilik sıvısında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Sadece bu proteinin konsantrasyonunun ölçümü, ALS tanısında yetersiz olabilir, ancak ELISA bazlı teknolojideki ilerlemeler, araştırmaların daha hassas olmasını sağlayabilir [9]. Multiple skleroz (MS) hastalarında BOS örneklerinde MBP'in hastalık sebebiyle artış gösterdiği bulunmuştur [10].

1.2 Tezin Amacı

ALS ile ilişkili en büyük zorluklardan biri, sayısız patolojik mekanizma ile ilişkili karmaşık bir hastalık olmasıdır. ALS'de motor sistemi içinde meydana gelen biyokimyasal değişiklikler, hastalığın klinik semptom ve bulgularından sorumlu olan alt ve üst motor nöronlarının dejenerasyonuna yol açar. Mevcut teşhisler, klinik muayene ve elektrofizyolojik ölçümlere dayanmaktadır. ALS erken teşhisin önemli olduğu bir hastalıktır. Erken teşhisi iyileştirmenin olası yolu, ALS'ye özgü biyobelirteçlerin belirlenmesidir [5]

Son yıllarda, hastalıkların nöropatolojik, biyokimyasal ve genetik biyobelirteçlerini tanımlamak için araştırılmalar yapılmaktadır. Biyobelirteçler belli bir hastalığın varlığını veya başlangıcını belirtmek için kullanılabilecek temel biyolojik maddelerdir. Biyobelirteçler sadece hastalıkların başlangıcını tahmin etmede yardımcı olmak için değil, aynı zamanda ilerleme oranını

denetlemede veya tedavi sürecinde hastalık seyrinin takip edilmesine yardımcı olmak için kullanılabilirler [11].

Miyelin, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde sinir aksonlarının etrafında yalıtkan bir kılıf oluşturan oligodendrositlerden ve Schwann hücrelerinden uzanan membran işlemlerinin lipit bakımından zengin çok katmanlı grubudur. Merkezi sinir sisteminde, miyelinin sitoplazmik yüzeylerinin yapışması MBP ile sağlanır. MBP-membran etkileşimleri, miyelin kılıflarında görülen uygun çok katmanlı yapıyı bir araya getirmek için MBP'nin bazik kalıntıları ile ikili lipit tabakanın asitli grupları arasındaki etkileşimler dengesine dayanır [12]. MBP miyelinizasyon sırasında iki sitoplazmik zarı birbirine yakınlaştırır ve protein zarlar arası yapıştırıcı görevi görür. Zarlar arasındaki etkileşimin bozulması demiyelinizasyona sebep olur. Miyelin hasarları MS gibi kronik nörolojik durumlar ile sonuçlanabilir [13].

MS hastalarının % 81'inde BOS'da MBP otoantikorları saptanmıştır. ELISA yöntemi ile BOS’nın % 44'ünde ve serumların % 8'inde MBP antikorları saptanmıştır [14]. Yapılan çalışmalar ışığında nörodejeneratif hastalıklarda MBP kullanılarak erken teşhisi kolaylaştırmak için araştırmalar yapılmaktadır. Erken tanının önemli olduğu bu hastalıklarda biyobelirteçler önem kazanmaktadır. Yaygın nörodejeneratif hastalıklardan olan ALS’da hastalığın tanısını ve ilerlemesini değerlendirmek amacıyla hastaların plazma örneklerinde MBP’nin düzeyi araştırılmıştır. MBP'nin bir ALS biyolojik belirleyicisi olarak etkinliğini değerlendirmek için ELISA kullanılmıştır.

1.3 Hipotez

Nörodejenerasyon sonucu miyelin kılıf zarar görmektedir. MBP; miyelin kılıfın bütünlüğünün korunmasında ve sinir iletiminin hızlı bir şekilde gerçekleşmesinde görev almaktadır. MBP’nin sağlıklı ve nörodejeneratif hastalıklara sahip bireylerde farklı miktarlarda bulunduğu bu konu üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilmiştir. MS hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada demiyelinizasyon plak bölgelerinde miyelin spesifik otoantikorların varlığı saptanmıştır. MBP hedefli otoantikorların; MBP tespiti, miktarının

saptanması ve prognostik amaçlar için kullanılabileceği gösterilmiştir [15]. Çalışmamızda ALS, MS ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinden plazma sıvısı elde edilmesinin ardından MBP-ELISA kitleri kullanılarak MBP seviyesinin tespiti hedeflenmiştir. Literatür taramalarına dayanarak MBP düzeyinin gruplar arasında değişiklik göstermesi beklenmiştir. Bu farklılıklar gözetilerek MBP'nin ALS tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilme durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2
GENEL BİLGİLER

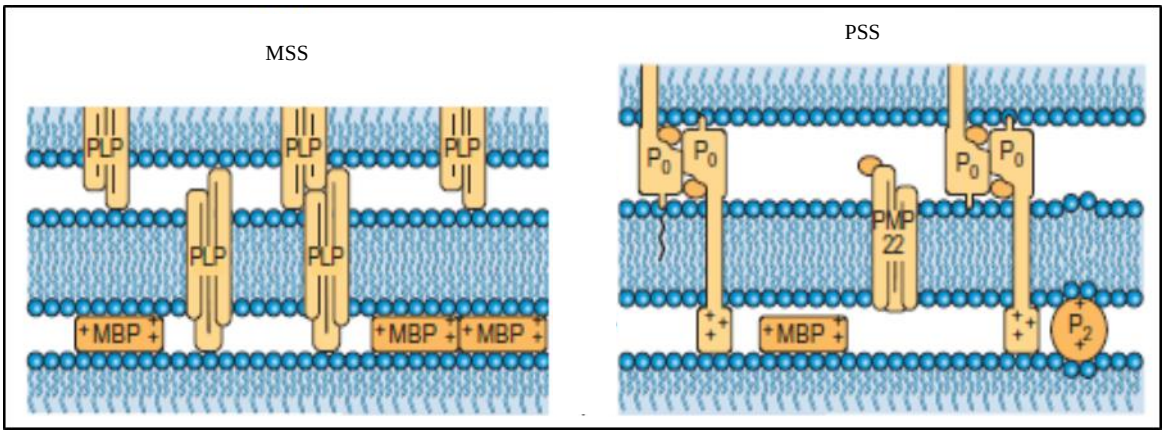
2.1 Nöron

Sinir sisteminin fonksiyonel birimi olan nöronlar, insan beyninde 100 milyardan fazla bulunmaktadır. Çeşitli nöron tiplerinin morfolojisi bazı farklılıklar gösterse de, hepsi dört bölge içerir: hücre gövdesi, dendritler, akson ve akson terminalleri. Hücre gövdesi nöronun genomik ve metabolik merkezidir. Dendritler, nöronlar arasındaki iletişim için sinir sinyallerinin ana alıcılarıdır ve kritik işleme kompleksleri içerir. Aksonlar çoğu zaman bölünmüş ve dallanmış gözlemlenebilirler. Dalların uç kısımlarında bulunan bölgeler akson terminalleri olarak isimlendirilirler ve sinir iletiminde önemli göreve sahiptirler [16]. Aksonlar, sinir sistemi içindeki nöronlar arasında ve nöronlar ile periferik hedef dokular arasında elektriksel uyarılarak bilgi aktarımı sağlayan kısımlardır. Merkezi ve periferik sinir sistemlerinde aksonlar, elektriksel impulsların hızlı iletimini kolaylaştıran ve aksonların korunmasını sağlayan miyelin kılıf tarafından sarılıdır [17].

2.1.1 Miyelin Kılıf

Miyelin kılıf, sinir aksonunun etrafına spiral bir şekilde sarılmış, büyük ölçüde genişletilmiş ve modifiye edilmiş bir plazma membranıdır. Miyelin membranları, periferik sinir sistemindeki (PSS) Schwann hücrelerinden ve merkezi sinir sistemindeki (MSS) oligodendroglial hücrelerden kaynaklanır [18]. Sinir aksonlarını çevreleyen miyelin kılıfın benzersiz çok lamelli yapısı vardır. Kompakt internodal miyelinde plazma membranının sitosolik yüzeylerinin yapışmasıyla ana yoğun çizgi, hücre dışı yüzeylerin yapışmasıyla ise intraperiod hattı oluşur [18]. Bu sıkıştırılmış çok katmanlı yapının bütünlüğü, akson boyunca aksiyon potansiyellerinin iletilme hızını belirler. Sitosolün bölgeleri ve çeşitli enzimler, kompakt miyelin, sıkıştırılmamış bölgelerdeki hücre iskeleti ve sinyal iletim proteinleri, miyelinin dinamik fonksiyonlarını yerine getirmesinde

ve akson ile iletişim kurmasında etkilidir. Miyelin, polarize ışık ile incelendiğinde, lipitlerden ve proteinlerden kaynaklı bir çift kırılım sergiler. Miyelinin düşük açılı X-ışını kırınım çalışmaları, üç pik (her biri protein artı lipit polar grupları) ve iki çukur (lipit hidrokarbon zincirleri) gösteren tekrar eden birimin elektron yoğunluk grafiklerini vermektedir. Bu iki teknikten elde edilen sonuçlar, lipit kısmının bimoleküler yaprak olduğu ve bitişik protein tabakalarının farklılık gösterdiği bir protein-lipid-protein-lipit-protein yapısı ile açıklanmıştır [19]. Miyelinin ana bileşenleri proteinler ve lipitler, bilginin beyne hızlı iletilmesini ve entegrasyonunu sağlamaktadır [20]. MSS ve PSS miyelini farklı lipit ve protein bileşimlerinde sahiptir [21] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 MSS ve PSS miyelin kılıf [21].

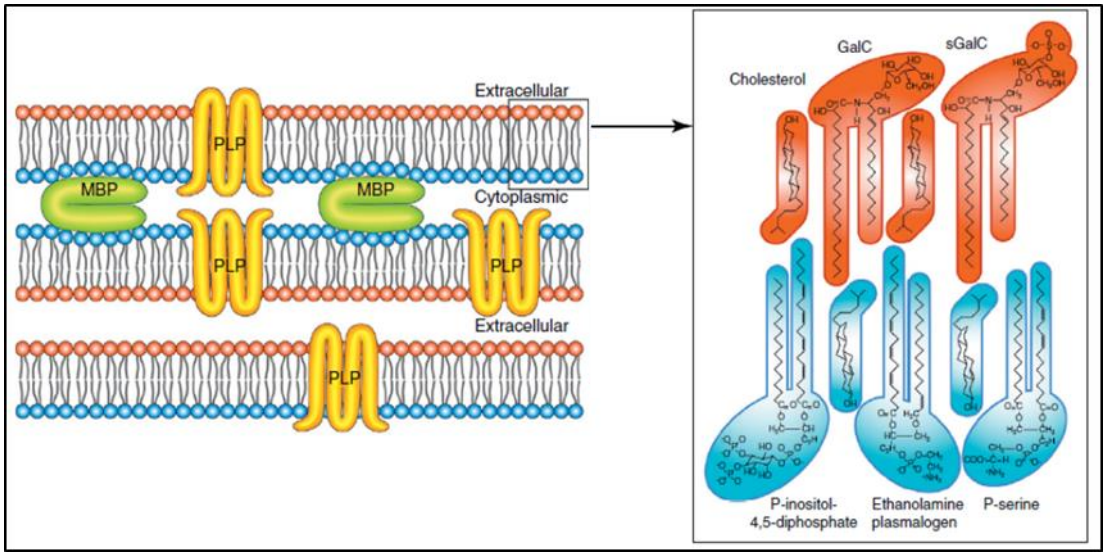
2.1.2 Miyelin Bazik Protein

Periferik aksonlardaki miyelinin % 50- 60'ını oluşturan protein0'ın mevcudiyeti ile MSS miyelininden ayırt edilebilir. P0, PSS'nde MBP eksikliğini telafi edebilecek proteinlerden biridir. Transfekte edilmiş hücrelerde P0 ekspresyonu, proteinin homofilik bağlanma ile PSS miyelinin intraperiod çizgisini stabilize ettiğini gösterir [22]. PSS majör P0 glikoproteine ek olarak, toplam proteinin % 5'inden daha azını oluşturan periferal miyelin protein-22 (PMP-22) adı verilen 22kDa ağırlığında proteini içerir [23] [24].

MSS'de proteolipid proteinin (PLP) intraperiod hattının stabilize edilmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [25]. PLP geni, gelişimin çok erken bir döneminde eksprese edilir, embriyolarda ve premiyelinizasyon

oligodendrositlerinde miyelin oluşumundan önce, gelişim sırasında ortaya çıkar. Oligodendrosit migrasyonunda veya miyelinde yapısal bir role ek olarak farklılaşmasında da rol oynayabileceği düşünülmektedir [26]. MSS miyelinde PLP'den sonra en bol bulunan ikinci protein MBP'dir ve toplam proteinin % 30'unu ve miyelinin kuru ağırlığının yaklaşık % 10'unu oluşturur. MSS miyelinin oluşumu için şimdiye kadar gerekli bulunan tek yapısal proteindir ve "miyelinin yürütücü molekülü" olarak adlandırılmıştır [27].

Miyelin iki tabakalı bir asimetrik lipit bileşimine sahiptir (Şekil 2.2) [28]. MBP'nin fonksiyonu, miyelin membranının karşıt sitoplazmik yüzeylerini birbirine yaklaştırmaktır. MBP, miyelin membranın karşılıklı iki negatif yüklü sitoplazmik yaprakçıklarına bağlandığında pozitif yükü sayesinde nötralizasyon gerçekleşir. Bu süreç, çözünür ve serbestçe dağılmış MBP moleküllerini yoğunlaştırılmış duruma dönüştürür ve sıkıştırılmış çok katmanlı membran yığınlarının üretimini sağlar. Böylece iki tabakanın birbirine tutunması gerçekleşir ve seçici bariyer oluşur [29, 30]. Miyelin içinde bulunan MBP, toplamda insanda 10 ekson olan Oligodendrosit Genleri (Golli) adlı daha büyük bir gen kompleksinin ürünüdür. Miyelin hücreleri, immün ve hemopoietik hücreler çeşitli Golli proteinleri tarafından üretilir. [31].



Şekil 2.2 Miyelin ana bileşenleri [28].

MBP'nin çeşitli büyüklükteki izoformları, mRNA transkriptinin alternatif kırpılma mekanizması ile oluşturulur. Bunlar insanda 21.5, 20.2, 18.5, ve 17.2 kDa'dur.

Yetişkin insan MSS'sinde majör MBP izoformu 18.5 kDa'dır [32, 33]. 18.5 kDa MBP, deamidasyon, Ser/Thr fosforilasyon ve arjinin sitrüline dönüşümü dahil olmak üzere net pozitif yükünü azaltan çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle C1, C2, C3, C4, C5, C6 ve C8 olarak adlandırılan bir dizi yük izomeri olarak ortaya çıkar. Bu izoformların ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenir, hücrelerde ve miyelinde farklı konumlara sahiptirler.[34].

C8 izomeri arjinin aminoasidinin peptidilarginin deiminazları ile sitrüline dönüşmesi sonucunda meydana gelmektedir. Arjinin aminoasidi pozitif yüke sahipken sitrülin yüksüzdür bu durum MBP'nin katyon değerinin azalmasına sebep olur [35]. MBP'nin posttranslasyonel modifikasyonunun neden olduğu azalmış miyelin sıkışmasının, miyelini bozunmaya duyarlı hale getiren bir süreci başlatabileceği ileri sürülmüştür. MBP fonksiyon kaybının miyelin oluşumunu etkilediği gösterilmiştir [36]. Fosforilasyon, metilasyon, deaminasyon posttranslasyonel mekanizmaları MBP'nin yükünde değişikliklere sebep olabilir.

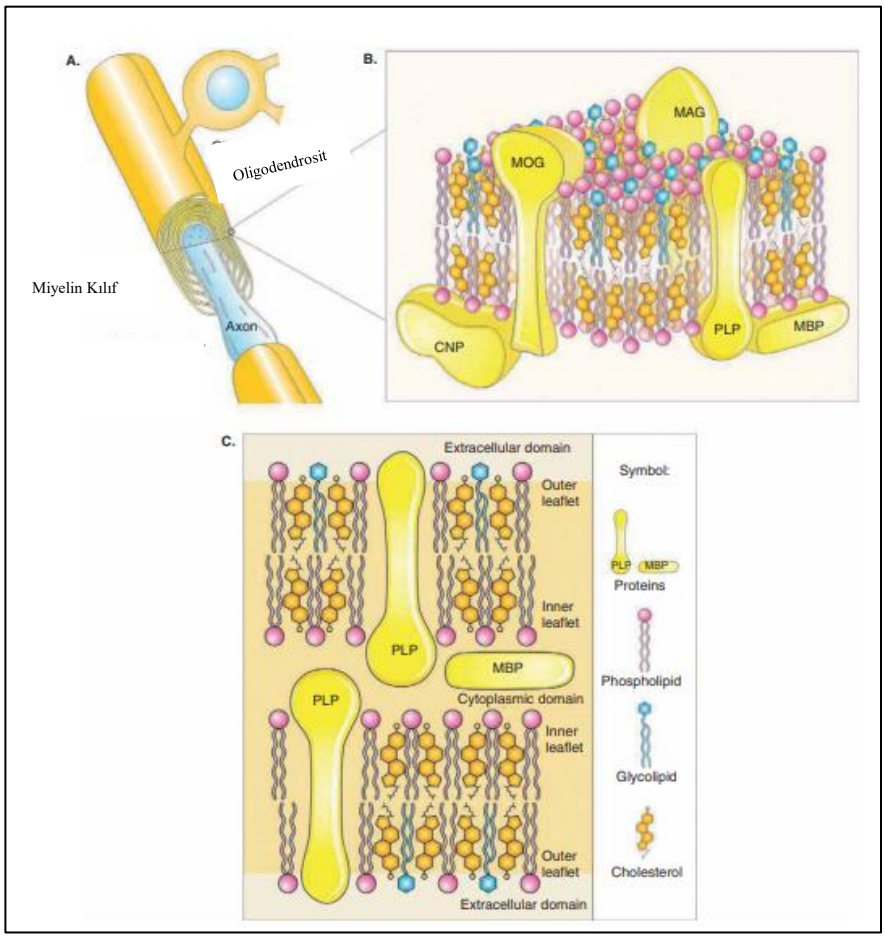
MBP'nin başka bir işlevi, miyelinin sitozolik yüzeylerinin yapışmasına aracılık etmenin yanı sıra hücre iskelet organizasyonuyla ilişkili Ca^{+2} -kalmodulin ve aktin, tübülin SH3-domeni proteinleri, gibi çok sayıda protein ile etkileşime sahiptir. MBP'nin hem in vitro hem de in vivo mikrotüplerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Aktin üzerindeki etkilerine benzer şekilde tübülin polimerizasyonuna neden olur ve mikrotübülleri demetlerini oluşturur. Mikrotübüllerin in vitro ve kültürlenmiş oligodendrositlerde depolimerize olmasını stabilize eder [37].

2.1.3 Miyelin Bazik Protein Etkileşimleri

2.1.3.1 Protein-Lipid Etkileşimleri

Miyelin kılıfının bütünlüğü, sinyalin akson boyunca hızlı bir şekilde aktarılması için temeldir, bu bütünlüğün korunmasında MBP'nin lipitler ile etkileşimi önemlidir. Lipit-protein etkileşimleri kovalent olmayan, özellikle elektrostatik ve hidrofobik olan etkileşimlerin miyelinin yapı ve stabilitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. MSS miyelin üç ana lipit sınıfı içerir: kolesterol, glikosfingolipidler ve fosfolipidlerdir (Şekil 2.3) [38]. MBP çift katman fosfolipit tabakasının

arasında yer alır. MBP, anyonik lipitlerin kutup başlarıyla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir [39].



Şekil 2.3 A) Akson görünümü B) 3 boyutlu miyelin kılıf C) Üç lipit sınıfı [40].

2.1.3.2 Protein-İyon Etkileşimleri

Miyelin, hem merkezi hem de periferik sinir sisteminin aksonal izolasyon katkıda bulunur. MBP'nin iki değerlikli katyonları Hg^{+2} >Cu^{+2}> Zn^{+2}> Mg^{+2}> Cd^{+2}> Co^{+2} azalan afinite sırasında bağlar [40]. Zn iyonu diğer iyonlardan daha yüksektir. MSS'de Zn iyonun spesifik olarak bağlanması ve stabilize olması MBP'nin miyelin membranı ile ilişkisini etkiler [41].

2.1.3.3 Protein-Ligand Etkileşimleri

MBP'nin üç boyutlu yapısının bir modeli, MBP'nin, hücre zarı ile temas eden yüklü amino asit tortuları bakımından zengin, geniş ilmek bölgeleriyle çevrili merkezi bir tabaka bölgeli açık bir C'ye benzer bir konformasyon gösterdiğini

bulunmuştur [42]. İntegrinler, hücre-hücre, hücre-hücre dışı matris ve hücre-patojen yapışmasına aracılık eden hücre yüzeyi reseptörleridir [43]. Gelişim ve homeostazideki kilit rollerinin yanı sıra, integrinler lökositlerin ticareti ve işlevleri için çok önemlidir. İntegrinler bir α-zinciri ve bir β-zincirinden oluşur [43]. Yapılan çalışmalarda integrin'nin MBP için güçlü ve spesifik bir ligand olduğu gösterilmiştir [42]. Miyelin kılıfın zarar görmesi MBP'nin hücre dışı ortama maruz kalmasına sebep olur. Miyelin membran ile gevşek bir şekilde ilişkide kalan katlanmamış bölgelere sahip olan MBP fagositik hücreler tarafından taşınan integrin tarafından tanınabilir ve fagosite edilebilir [44].

MBP'de etkili olan diğer bir ligand kalmodulin olarak belirlenmiştir. C-terminaline yakın bölge ile kalmodulinin, etkileşimi incelenmiştir ve etkileşim sonucunda proteinde düşük seviyede konformasyonel bir değişiklik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Miyelin oluşumu ve düzenlenmesinde, hedef tanımada kalmodulin önemli bir yapısal faktördür [45] .

2.2 Nörodejeneratif Hastalıklar

2.2.1 Multiple Skleroz

MS, miyelin bileşenine karşı nörodejeneratif olaylar ve otoimmün yanıt ile karakterize edilen multifaktöriyel demiyelinizan bir hastalıktır [46]. MS miyelin ve aksonları değişen derecelerde yok ederek, MSS'ni etkiler [47]. Yapılan çalışmalarda, serebral MS lezyonlarında aksonal hasar ve inflamasyon derecesi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir [47]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılındaki raporlarına göre, dünyada 2-2.5 milyon MS hastalığı kaydedilmiştir ve 1990'da 12 000 ve 2012 yılında dünya genelinde yaklaşık 20 000 MS hastasının ölümünün gerçekleştiği belirtilmiştir. MS, 20–50 yaşlarındaki kişilerde daha sık görülmekte ve kayıtlar kadın MS hastalarının erkeklerden iki kat daha fazla olduğunu göstermektedir [48].

MBP deneysel alerjik ensefalomiyelitin uyarılmasından sorumlu antijen olarak tanımlanıştır [49]. Ensefalomiyelit, merkezi sinir sisteminin enflamatuar, demiyelinizan bir hastalığıdır. MBP demiyelinizan hastalıklarda, özellikle multipl skleroz ve alerjik ensefalit ile ilişkilendirilmiştir. Bir insan otoanjeni olarak karakterize, birkaç çalışma multipl skleroz patogenezinde MBP'ye karşı

otoantikorlar için bir rol göstermiştir. MBP ile multipl skleroz arasındaki ilişkiye ilgi, bu MBP post-translasyonel değişikliklerin potansiyel rolüne odaklanmıştır [50]. Tanımlanmasının ardından, vücuttaki antikorları saptamak ve nicelleştirmek için BOS ve kan örneklerinde radyoimmünoassay yöntemi kullanılarak MBP'ye karşı oluşan otokantikorlar bildirilmiştir [47]. Ancak BOS çalışmalarının sonucu çok değerli olsa da, hızlı bir kan testinin birçok avantajı olacaktır. BOS elde etmek, hasta için rahatsız edici ve nörolog için zaman alıcıdır. Bu sebeplerden dolayı MS hastalarında serum otoantikorlarını tespit etmek için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Hem serum hem de plazma örneklerinin incelenmesi sonucunda MBP otoantikorlarını yüksek hassasiyet ve özgüllükte ölçmek için kullanılabileceği gösterilmiştir [46].

MBP'nin anormal posttranslasyonel modifikasyonunun neden olduğu azalmış miyelin sıkışmasının, miyelini bozulmaya duyarlı hale getiren bir süreç başlatabileceği ileri sürülmüştür. MS hastalarında, hastalık sırasında sırayla BOS'ta MBP'yi izleyerek klinik durumun aktif miyelin yıkımı ile ilişkisi gösterilmiştir. BOS'ta MBP varlığı ile hastalığın zirvesi arasında zamansal ilişki olduğunu gösterilmiştir. [51]. Ek olarak MBP seviyesinin yaşla birlikte artış gösterdiği belirtilmiştir [52]. 84 MS hastası, 55 diğer nörodejeneratif hastalıklar ve 45 sağlıklı birey BOS ile gerçekleştirilen ELISA çalışması sonucunda MBP seviyesinin MS hastalarında sağlıklı bireylere oranla yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir [53].

2.2.2 Amyotrofik Lateral Skleroz

ALS, hem üst motor nöronlarda hem de alt motor nöronlarda dejenerasyona sebep olan ilerleyici nöromüsküler bir hastalıktır. Dünyada yaklaşık 90-100 bin, Türkiye'de ise 3500-5000 ALS hastası olduğu düşünülmektedir. ALS nin insidensi yaşla artar; 40 yaştan önce düşük, 75 yaş civarında ise en yüksektir. Sporadik ALS % 90-95 oranla vakaların büyük çoğunluğunu oluştururken, geriye kalan % 5-10 kısım kalıtsal veya ailesel ALS olarak adlandırılmaktadır. Sporadik vakaların % 20'sinde mutasyon vardır. Vakaların büyük çoğunluğu 1-2 yıl içinde ortaya çıkar. ALS'ye sebep olan mutasyonlardan ilk keşfedilen Superoksit dismutaz 1(SOD1) geninde keşfedilen mutasyodur. Ailesel ALS'ye sebep olan

mutasyonlar TAR DNA-bağlayıcı protein (TARDBP), Sarkom içinde kaynaşmış (FUS), Optineurin (OPTN), Valosin-içeren protein (VCP), Ubiquilin 2 (UBQLN2), Heksanükleotit tekrar genişlemesi (C9ORF72), Profilin 1 (PFN1), İnsan dinaktin alt birim 1(DCTN)'dir. Önceleri ALS'nin tek bir mekanizmaya bağlı geliştiği düşünülmekteydi. Son yıllarda hastalık multifaktöriyel etyopatogenez ile açıklanmaktadır [54, 55]. Oksidatif stres, mitokondriyal disfonsksiyon, endoplazmik retulum stresi ve aksonal transport bozukluğu gibi birçok mekanizmanın sebep olduğu multifaktöriyel etyopatogenezi nedeniyle tanısı zor konulan bir hastalıktır.

Hastaların genetik öykülerinin tespiti, tanı kriterlerinin değerlendirilmesi, süreç içerisindeki davranış değişikliklerinin takibi sebebiyle ALS tanısı koymak için genellikle uzun süreler gerekmektedir. Bu süreci kısaltmak amacıyla hastalığı teşhis etmek için çeşitli klinik ve moleküler biyobelirteçler önerilmektedir [56, 57].

2.3 Biyobelirteçler

Biyobelirteçler, nesnel olarak normal biyolojik ve patojenik işlemlerin veya terapötik müdahaleye farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak ölçülen ve değerlendirme için kullanılan biyolojik moleküllerdir[58]. Biyobelirteçler, ölçülebilir biyolojik süreçler ve klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi anlamak, hastalıklara yönelik tedavileri genişletmek ve sağlıklı fizyoloji anlayışımızı derinleştirmek için çok önemlidir.

ALS oksidatif stress, mitokondriyal disfonksiyon, oligodendirosit dejenerasyonu, enerji metabolizmasın değişiklikleri gibi farklı genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan heterojen karaktere sahip bir hastalıktır [59]. Güncel tanı ölçütleri klinik muayene ve elektrofizyolojik ölçümlere dayanmaktadır. Potansiyel tedavilerin daha etkili olması için erken teşhis önem kazanmaktadır. Erken teşhisi mümkün kılmanın bir olası yolu, ALS'ye özgü biyobelirteçleri hastalık sürecinin erken dönemlerinde tanımlanabilecek şekilde kullanmaktır [60]. Bugüne kadar, BOS, kan, idrar ve tükürük dahil olmak üzere çeşitli biyo-akışkanlar kullanılarak biyobelirteç keşif çalışmaları yapılmıştır. ALS hastalarında hastalığın seviyesini belirlemek ve hastalığın ilerlemesi takip etmek

için biyobelirteçler önem kazanmıştır. ALS biyobelirteçlerinin araştırılmasında BOS, serum ve plazma örneklerinde çalışmalar ön planda yapılmıştır [61].

2.3.1 Beyin Omurilik Sıvısı Biyomarker

ALS ile ilgili biyobelirteçlerin araştırılmasında, merkezi sinir sisteminde nörodejenerasyonun sonucunda meydana gelen biyokimyasal değişiklikler biyolojik belirteç keşfi için ideal bir ortam oluşturmaktadır. ALS ile ilgili biyobelirteçlerin araştırılması, merkezi sinir sistemi ile olan sıkı etkileşimi nedeniyle, ağırlıklı olarak beyin omurilik sıvısı kullanılarak yapılmıştır.

Nörofilamentler, nöronlarda eksprese edilen ve ALS ve diğer nörolojik hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılan hücre iskeletinin yapısal proteinleridir. Nörofilament proteinlerinin birikimi, motor nöronların dejenerasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Aksonal yaralanma sonucunda bu proteinler BOS'a geçer [62]. Kontroller ve ALS'li hastaların BOS'unda fosforile edilmiş nörofilament ağır zinciri (p-NFH) karşılaştırıldığında arttığını tespit edilmiştir [5].

Tau proteini aksonların mikrotübüllerinde yapısal olarak bulunur. Alzheimer hastalığında yapılan çalışmalarda BOS'ında hastalığın seyri ile artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın ardından diğer nörodejeneratif hastalıklarda tau protein seviyesi ölçümleri ile biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği gözlemlenmiştir [63]. Ek olarak, hastalık şiddeti veya progresyonu ile korelasyon gösteren hiçbir tau çalışması bulunmadığından, nörofilament şu anda nöroaksonal dejenerasyonun daha iyi belirtecidir [64].

2.3.2 Kan Biyomarkerları

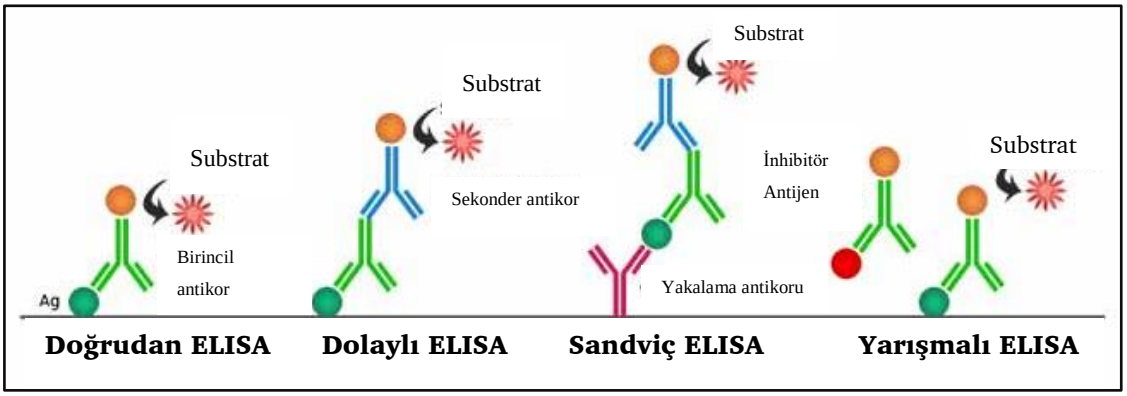
Kan örneklerinin minimal invaziv bir prosedürle kolayca elde edilmesi bu örneklerde biyomarker tespitini önemli hale getirmektedir.

ALS hastalarının BOS örneklerinde aksonal hasar ve nöronal dejenerasyonun biyobelirteci olarak artışı tespit edilen pNF-H, BOS ile birlikte kana da serbest bırakılır. pNF-H seviyesinin ALS'li hastaların kanında da benzer bir değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. ELISA yöntemi ile tespit edilen protein seviyesinin hastalığın ilerlemesi sürecinde artış gösterdiği gösterilmiştir [65].

TDP-43'ün, hayatta kalma motor nöron proteini ile etkileşimi ve iskele görevi gördüğü gösterilmiştir. Beyinde, TDP-43 nöronların ve bazı glial hücrelerin çekirdeğine lokalizedir. Yapılan bir çalışmada nöronal plastisitenin düzenlenmesinde rol alan bir nöronal aktivite-cevap faktörü olarak işlev görebileceği de öne sürülmüştür [66]. Bu çalışmalardan yola çıkılarak TDP-43'ün nöredejeneratif hastalıklarda biyobelirteç olabileceği üzerinde durulmuştur. ALS'de yapılan önceki çalışmalarda, hastaların BOS'ında TDP-43 düzeylerinde artış olduğunu gösterilmiştir. TDP-43 plazma seviyeleri ELISA kullanılarak ölçülmüş ve ALS'li hastalar ile kontroller arasında karşılaştırılma yapılmıştır. TDP-43 düzeyinin ALS'li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [67].

2.4 Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA)

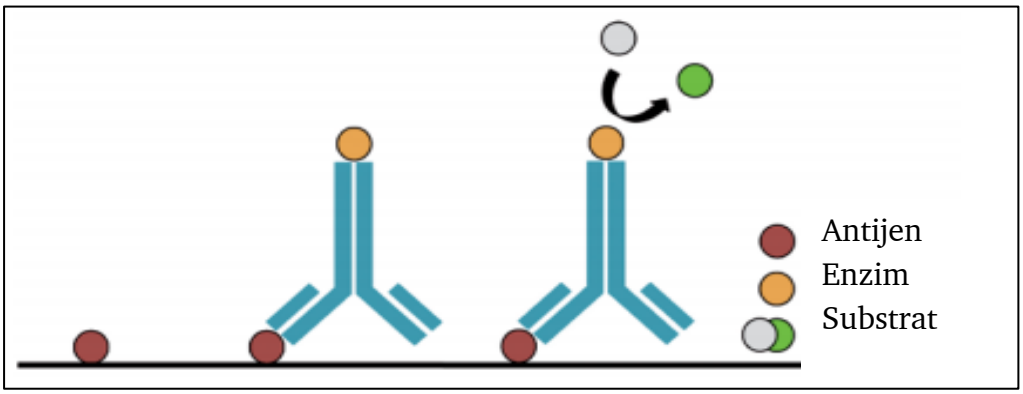
ELISA yöntemi, kompleks bir karışımdaki belirli bir proteinin saptanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntemdir. Engvall ve Perlmann (1971) tarafından tarif edilen yöntem, protein örneklerinin analiz edilmesini sağlar. Sıvı fazındaki antijen, genellikle 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarında immobilize edilir. Daha sonra antijenin, enzim bağlı spesifik bir antikora bağlanmasına izin verilir. Enzim için kromojenik bir substrat, antijenin varlığını gösteren görünür bir renk değişimi veya floresans verir. Nicel veya nitel önlemler bu kolorimetrik okumaya dayanarak değerlendirilebilir. Substratlar daha yüksek hassasiyete sahiptir ve örnekteki antijen konsantrasyonu seviyelerini doğru bir şekilde ölçebilir [68]. Bir antijenin birçok farklı epitopunu tanıyabilen poliklonal antikorlar ve tek bir epitopa özgü olan monoklonal antikorlar ELISA yönteminde kullanılabilmektedirler. Poliklonal antikorlar ikincil antikor olarak kullanılabilmektedir. ELISA yöntemi antijenin nasıl sabitlendiğine ve tespit edildiğine bağlı olarak farklı kategorilere ayrılır [69]. Şekil 2.4'de ELISA yönteminin dört farklı çeşidi reaksiyon süreçleri ile gösterilmiştir. Bu süreçler konunun alt başlıklarında ayrıntılandırılmıştır.



Şekil 2.4 ELISA tipleri [69].

2.4.1 Doğrudan Elisa

Doğrudan ELISA, antijenleri tespit etmek için kullanılan adımların en basitlerini temsil eder. Spesifik bir antijen için analiz edilmesi gereken bir numune, bir mikrotitre plakasının kuyucuklarına yapışır. Bağlanmayan tüm yerleri doyurmak için genellikle bir karbonatebikarbonat kaplama tamponu kullanılır. Bu bir sodyum karbonat, sodyum bikarbonat ve damıtılmış su çözeltisi içerir ve antijenlerin plakaya pasif emilimini kolaylaştırır. Doğrudan ELISA'daki antikor monoklonal veya poliklonal olabilir. Bir renk değişikliği oluşturmak veya antijenin varlığını gösteren ışık yayan bir substrat eklenir. Diğer ELISA yöntemlerine kıyasla daha az sürede gerçekleştirilebilir [70] (Şekil 2.5).

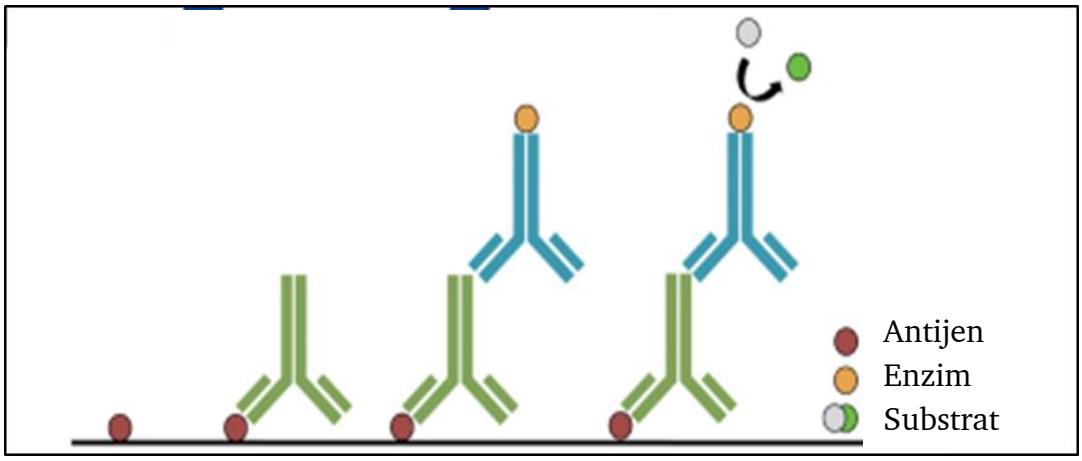


Şekil 2.5 Doğrudan ELISA [69].

2.4.2 Dolaylı Elisa

Doğrudan bir ELISA'ya benzer olmakla birlikte, dolaylı ELISA’da ikinci bir konjüge antikor kullanılır. Dolaylı ELISA, birincil antikorun ve etiketli ikincil

antikorun bağlanma işlemini içeren iki aşamalı bir ELISA'dır. Birincil antikor, antijen ile inkübe edilir ve yıkama işlemi yapılır. Tamamlanan yıkama işlemin ardından spesifik olmayan bağlanmaları önlemek sığır serum albümini (BSA) kullanılarak bloklama işlemi yapılır. Bir sonraki aşamada ikincil antikor ile inkübasyon yapılır ve yıkama işlemi tekrarlanır. Bir substrat eklenir ve antikor üzerindeki enzimler bir kromojenik veya flüoresan sinyali verir [69] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Dolaylı ELISA [69].

2.4.3 Sandviç Elisa

Sandviç tekniği, spesifik bir numune antijenini tanımlamak için kullanılır. Kendi içerisinde iki yönteme ayrılmaktadır.

2.4.3.1 Direk sandviç Elisa

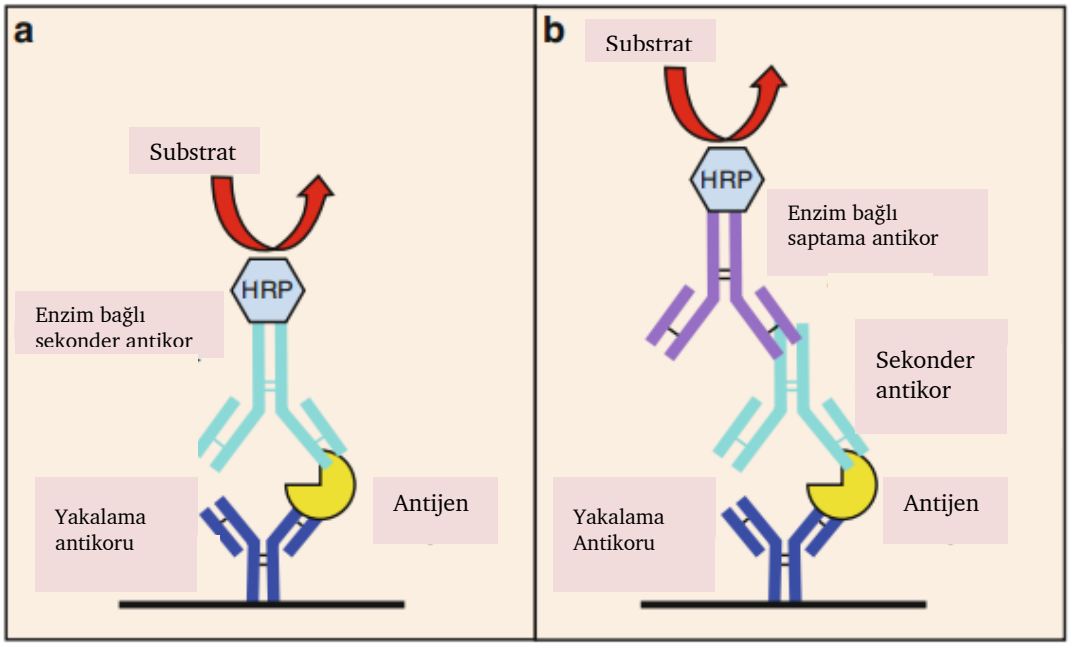
Mikroplate bilinen miktarda antijene özgü antikor ile kaplanır, numuneler eklenir ve antijn-antikor birleşmeleri sağlanır. Bağlanma olmayan içerikler yıkanır. Antijeni sandviçleyen enzim bağlı antikor eklenir ve enzime uygun substrat kullanılır. Enzim-substrat birleşiminin ardından ortaya çıkan renk değişimi gözlenir [71] (Şekil 2.7).

2.4.3.2 Dolaylı sandviç Elisa

Kuyu yüzeyi, istenen antijeni yakalamak için bilinen bir miktarda bağlı antikor ile hazırlanır. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri BSA kullanılarak bloke edildikten sonra, antijen içeren numune plakaya uygulanır. Daha sonra antijeni

sandviçleyen spesifik bir birincil antikor eklenir. Birincil antikora bağlanan enzime bağlı ikincil antikorlar uygulanır. Bağlı olmayan antikor-enzim konjugatları yıkanır. Substrat eklenir ve enzimatik olarak daha sonra nicelendirilebilecek bir renge dönüştürülür [72] (Şekil 2.7). Antijeni yakalamak için saflaştırılmış spesifik bir antikor kullanmanın bir avantajı, antijeni diğer antijenlerin bir karışımından arındırma ihtiyacını ortadan kaldırması, böylece testi basitleştirmesi ve özgüllüğünü ve hassasiyetini arttırmasıdır.

Yakalama antikoru numunedeki spesifik antijeni hareketsizleştirir, bu nedenle numunenin doğrudan ve dolaylı ELISA'ların aksine önceden saflaştırılması gerekmez. İki antikor tanıma aşaması kullanılarak antijen, birincil ve ikincil antikorlar arasında etkili bir şekilde sandviçlenir. Bir sandviç ELISA'nın ana dezavantajı, belirli birincil ve ikincil antikorların kullanılması gerektiğidir. Birincil ve ikincil antikorlar, antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanır ve antijen bağlanma sahalarında rekabeti önlemek için birlikte çalışacak şekilde doğrulanmalıdır. Sandviç ELISA yönetimi gerçekletirilirken uygulanan basamak sayının fazla olması ve daha fazla malzemeye ihtiyaç duyulmasından dolayı doğrudan ve dolaylı ELISA'dan daha fazla zaman almakta ve daha maliyetli olmaktadır [69].

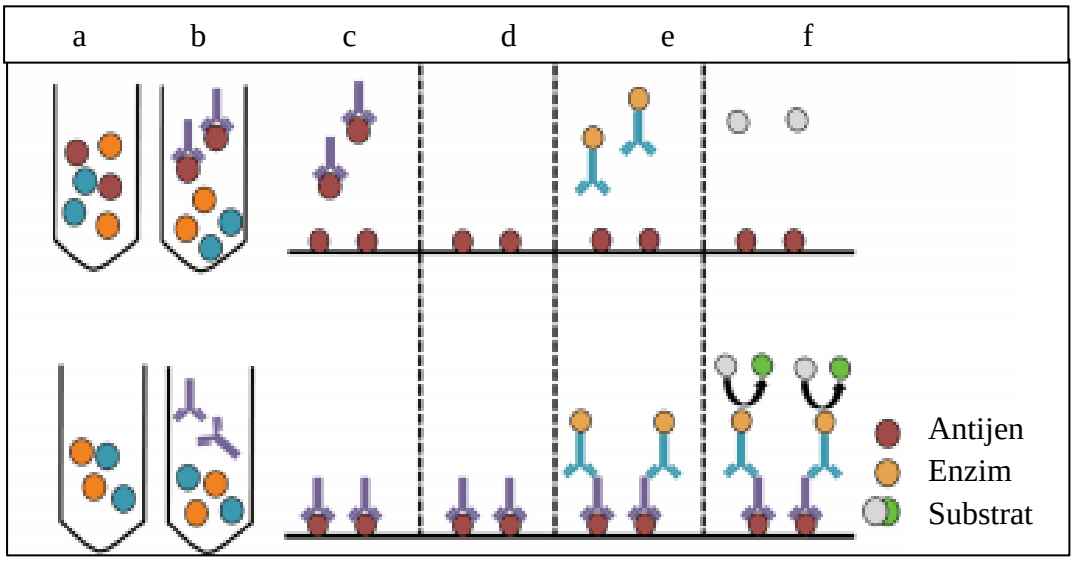


Şekil 2.7 Sandviç ELISA a)Direk sandviç ELISA b)Dolaylı sandviç ELISA [70].

2.4.4 Yarışmalı Elisa

Yarışmalı bir ELISA, yarışmalı bir bağlama işlemi kullandığı için doğrudan, dolaylı ve sandviç ELISA'dan farklıdır. Birincil antikor, saflaştırılmamış bir örnekle (Şekil 2.8-a) inkübe edilir ve örnekte bulunan herhangi bir antijene bağlanır (Şekil 2.8-b). Numunede ne kadar fazla antijen varsa, o kadar fazla antijen-antikor kompleksi oluşur. Antijen-antikor kompleksleri daha sonra antijen ile önceden kaplanmış 96 kuyucuklu bir plakaya eklenir. Herhangi bir bağlanmamış antikor, kuyudaki antijene bağlanır (Şekil 2.8-c). Daha fazla antijen-antikor kompleksi oluştuğu zaman, kuyucuklarda ki antijene bağlanmak için daha az antikor mevcut olacaktır. Dolayısıyla, numunedeki antijenler ile antikorlar için kuyucuğa önceden kaplanmış antijenler arasında rekabet vardır. Plaka, belirli bir süre boyunca inkübe edilir ve daha sonra herhangi bir bağlanmamış antikoru çıkarmak için yıkanır ve bloklama tamponu ilave edilir (Şekil 2.8-d). Bir enzimle konjüge edilmiş ikincil bir antikor eklenir ve bağlanır primer antikora (Şekil 2.8-e). Basamaklar arasında plaka yıkanmalıdır. Son olarak, bir substrat eklenir ve bir renk değişikliğini tespit etmek için bir mikroplaka okuyucu kullanılır (Şekil 2.12-f). Yarışmalı ELISA, örnekteki yüksek

miktarda antijen daha düşük bir sinyal verecek şekilde ters bir eğri üretir. saflaştırılmamış numunelerde Sandviç ELISA'dan daha geniş bir antijen aralığını ölçebilen yarışmalı ELISA birden fazla epitopu olmayan küçük molekülleri tespit etmek için kullanılır [69].



Şekil 2.8 Yarışmalı ELISA [69].

3
MATERYAL VE METHOD

3.1 Materyal

3.1.1 Genel Laboratuvar Malzemeleri

Tablo 3.1 Laboratuvar genel malzemeleri

Sarf Malzeme	Üretici Firma
10-50- 100- 1000 µl'lik mikropipetler	İzolab
1000 -200-10-0,1 µl'lik pipet ucu	İzolab
Santrifüj Tüpü 1,5- 2 mL	İzolab
25 ml Falkon Tüpü	İzolab
Tüp standı	İzolab
Kurutma Kağıdı	İzolab

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2 Laboratuvarda kullanılan cihazlar

Ekipman	Üretici firma
+4^{0}C Dolap	Arçelik
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrofotometre)	Biotek

Tablo 3.2 Laboratuvarda kullanılan cihazlar (devamı)

Masaüstü Santrifüj	Hettich
Otoklav	Hırayama
-80^{0}C Derin Dondurucu Dolap	Thermo
Bilgisayar	IBM
İnkübatör	Biosan
Distile Su Cihazı	Sartorius

3.1.3 MBP ELISA Kit

Tablo 3.3 ELISA kit içeriği

Malzemeler	Adet	Üretici Firma
Antijen Kaplı ELISA 96 Kuyucuklu Plate	1	ABBKİNE
MBP Standart Solüsyon	0.5ml	ABBKİNE
Konjuge İnsan Mbp Tespit Antibodisi-HRP	6ml	ABBKİNE
Standart Solüsyon	1.5ml	ABBKİNE
Örnek Solüsyon	6ml	ABBKİNE
Kromojonik Solüsyon A	6ml	ABBKİNE
Kromojonik Solüsyon B	6ml	ABBKİNE
Durdurma Solüsyonu	6ml	ABBKİNE
Yıkama Solüsyonu (x30)	20ml	ABBKİNE

3.1.4 Kullanılan Bilgisayar Programları

Tablo 3.4 Laboratuvarda kullanılan bilgisayar programları

Program	Üretici Firma
Excel Çalışma Sayfası	Microsoft Co.
SPSS 23.0	IBM
Gen 5 1.08	Biotek

3.1.5 Etik Kurul Raporu

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 689 sayılı kararına göre etik kurul onayı verildi.

3.1.6 ALS Hasta Grubu

Çalışmamız da yer alan hastaların teşhisi ve tedavisi Prof. Dr. Halil Atilla İdrisoğlu tarafından yapılmıştır. Hastalardan üç adet EDTA bulunan tüpe 10'ar cc örnek alınmıştır. Hastalara ayrıntılı bilgi verilmiştir. Hastalar hastalığın başlangıç yerine göre 7 farklı bölgeye ayrılmıştır. Bulbar, üst motor nöron (UMN),alt motor nöron (LMN), bulbar+ UMN, bulbar+LMN, LMN+UMN, BULBAR+UM+LMN.

Tablo 3.5 ALS grubu demografik bilgileri

	N
ALS	53
KADIN	22
ERKEK	31
<30	4
31-40	7
41-50	14

Tablo 3.5 ALS grubu demografik bilgileri (devamı)

51-60	14
>61	14
EKSİK	3
BULBAR	5
UMN	14
LMN	0
UMN- LMN	22
UMN-BULBAR	5
LMN-BULBAR	1
LMN-UMN-BULBAR	3

3.1.7. MS Hasta Grubu

Hastaların teşhisi ve tedavisi Prof. Dr. Halil Atilla İdrisoğlu tarafından yapılmaktadır. Nörolojik kontrol grubu olarak MS hastaları seçilmiştir. EDTA bulunan üç adet tüpe 10'ar cc tam kan alındı. Hastalara gerekli bilgiler verilmiştir.

Tablo 3.6 MS grubu demografik bilgileri

	N
MS	18
KADIN	11
ERKEK	7
<30	4
31-40	8
41-50	4
51-60	2
>60	0

3.1.8 Sağlıklı Kontrol

Gönüllü sağlıklı kişilerden üç adet EDTA içeren tüpe 10 cc tam kan alındı. Gönüllülere bilgi verilmiştir.

Tablo 3.7 Sağlıklı kontrol demografik bilgileri

	N
KONTROL	18
KADIN	12
ERKEK	6
<30	11
31-40	1
41-50	4
51-60	2
>60	0

3.2 Method

3.2.1 Kan Plazmalarının Elde Edilmesi

EDTA içeren tüplere alınan örnekler buz içerisinde Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'na getirildi. Tüpler 1000 xg 24^{0}C 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj süresinde 10 adet 1,5 mL tüp hazırlandı. Gelen hasta için kayıt numarası oluşturuldu. Oluşturulan kayıt numaraları 1,5 mL'lik tüplerin üzerine yazıldı. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra 3 tüpte bulunan plazma 15 mL'lik falkon içerisinde toplandı. Her hastanın plazması kendisi için hazırlanan 1,5 mL'lik tüplere 500 µl olarak dağıtıldı. Bu işlemden sonra -80^{0}C'lik derin dondurucuda bir sonra ki aşamaya kadar saklandı.

3.2.2 MBP ELISA Kit uygulaması

Sandviç ELISA yöntemine dayanan kit temininin ardından +4^{0}C'de muhafaza edildi. Deney hazırlığı aşamasında kit ve kullanılacak plazma örneklerinden her hasta için bir tüp oda sıcaklığına çıkarıldı. Deney protokolüne başlamadan önce yıkama solüsyonu ve standartlar hazırlandı. Yıkama solüsyonu 96 kuyucuklu plate için 1:30 standart dilüsyon ile seyreltildi. Standartlar Tablo 3.8' de yer alan değerlere göre hazırlandı.

Tablo 3.8 MBP standart çözeltilerinin hazırlanması

TÜP NUMARALARI	MBP STANDART KONSANTRASYONLARI	HAZIRLAMA
STANDART NO: 1	8000 pg/ml	150 µl orijinal standart
STANDART NO: 2	4000 pg/ml	150 µl standart no: 1 150 µl standart dilüsyon
STANDART NO: 3	2000 pg/ml	150 µl standart no: 2 150 µl standart dilüsyon
STANDART NO: 4	1000 pg/ml	150 µl standart no: 3 150 µl standart dilüsyon
STANDART NO: 5	500 pg/ml	150 µl standart no: 4 150 µl standart dilüsyon
STANDART NO: 6	250 pg/ml	150 µl standart no: 5 150 µl standart dilüsyon

Tablo 3.9 MBP 96 kuyucuklu plate

	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12
A	Sample Diluent										
B	ST 1	ST 1									
C	ST 2	ST 2									
D	ST 3	ST 3									
E	ST 4	ST 4									
F	ST 5	ST 5									
G	ST 6	ST 6									
H											

Standartlar 96 kuyucuklu platede 12 kuyuya iki tekrarlı olarak 50 µl ekledi. Bir adet kuyucuk kör örnek olarak bırakıldı ve bu kuyucuklara plazma örneği eklenmedi. Kalan kuyucuklara 40 µl örnek solüsyonu eklendi ve plazma örneklerinden 10 µl ilave edilerek plate kapağı ile kaplandı. Her bir plazma sıvısından iki tekrar yapıldı. 45 dakika 37^{0}C'de inkübe edildi. Pipetleme işleminin ardından 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem dört kez tekrarlandı. Daha iyi performans alabilmek için her aşamada uzaklaştırma işlemi tüm sıvı alınana kadar gerçekleştirildi. Kör kuyucuklar hariç örnek ve standart solüsyon bulunan kuyucuklara 50 µl HRP-İnsan MBP konjuge antikor eklendi. Tekrar plate kapağı kapatılarak 30 dakika 37^{0}C'de inkübe edildi. Yıkama prosedürü beş kez tekrar uygulandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 50 µl kromojen A solüsyonundan eklendi. Daha sonra her kuyucuğa kromojen B solüsyonundan ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı ve renk oluşumunu sağlamak için ışıktan uzak tutularak 15 dakika 37 ^{0}C'de inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyon durdurulduktan sonra Biotek marka ELISA Reader

cihazı ile 450 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilerek OD değerleri tespit edildi. Bilgisayarda bulunan Gen programı ile okuma yapıldıktan sonra veriler Excel dosyasına aktarıldı ve pg/mL cinsinden sonuçlar için hesaplamalar yapıldı.

3.2.3 İstatiksel Hesaplamalar

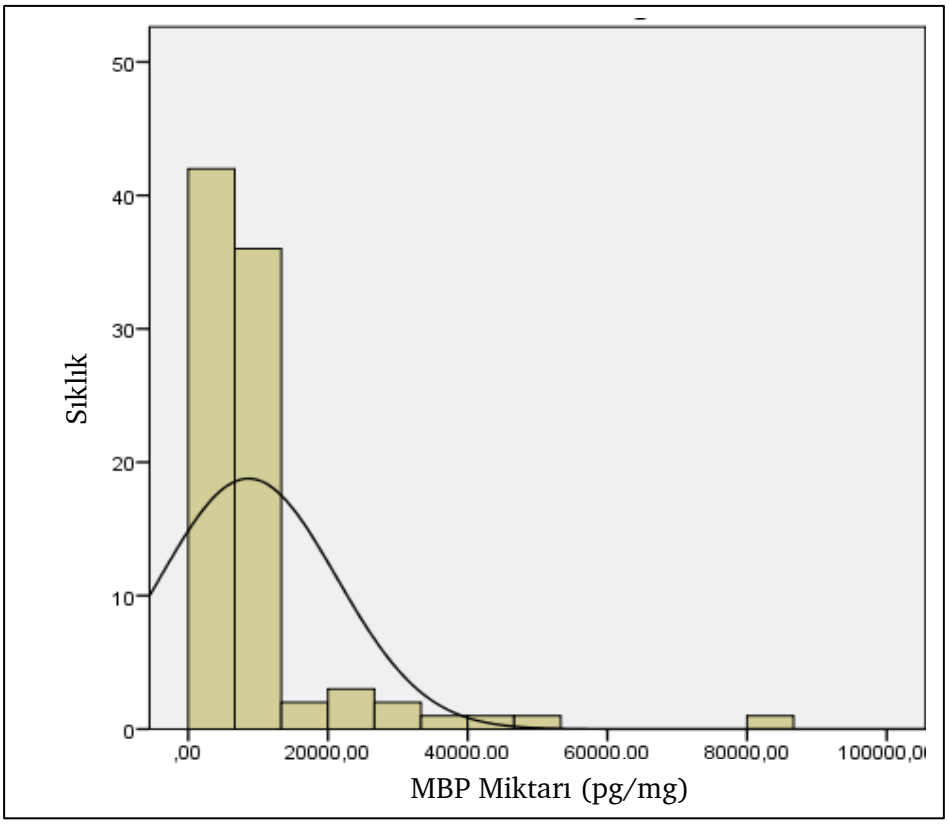
İstatiksel hesaplamalar ALS, MS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirildi. ALS hastaları arasında hastalığın başlangıç yerine göre yedi gruba ayrıldı: üst motor nöron (UMN), alt motor nöron (LMN), BULBAR, UMN-LMN, UMN-BULBAR, LMN-BULBAR ve UMN-LMN-BULBAR. MBP aynı zamanda cinsiyetler arasında değerlendirildi. Protein verileri normal dağılım ile uyum göstermediği için parametrik testlerin alternatif parametrik olmayan testleri ile değerlendirildi. MBP miktar karşılaştırılmalarına Kruskal-Wallis testi uygulandı. Mann-Whitney U testi Kruskal-Wallis testi sonucuna göre hangi grupların farklı olduğunu tespit etmek için de kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Yapılan istatiksel analizler $p<0.05$ ve $p<0.10$ anlamlılığına göre değerlendirildi.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuç

53 ALS, 18 MS ve 18 sağlıklı kontrol kan örneklerinin tamamlanmasıyla birlikle Abkkine direk sandviç ELISA kiti yardımıyla MBP düzeyleri kan örneklerinde tespit edildi. Proteine özgü antikor ile kaplanmış mikroplaka kullanıldı. Kan plazma örneklerinde bulunan MBP kuyucuktaki yakalama antikor ile bağlanır. Yakalama antikorlarları antijenlerin bağlanma mikatarını arttırmak amacıyla poliklonal tercih edilir. Yıkama işlemi bağlanmamış maddeler uzaklaştırıldı. HRP bağlı saptama antikor reaksiyona katıldı. HRP uygun kromojenik substratlar ile reaksiyona girdiği zaman ışıma gerçekleştiren ve renkli ürünlere dönüştürülmesini katalize eder ve kemilüminesan substratlar ile etkileşime girdiği zaman ışık oluşumunu sağlar. Kit içerisinde yer alan uygun kromojenik substrat tepkimeye eklendiğinde substrat enzim etkleşimi sonunda renk oluşumu gözlemlendi. Son aşamada durdurucu solüsyon ile reaksiyon tamamlandı.Tamamlanan reaksiyon 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Ek-b'de yer alan OD değerleri elde edildi. Değerler ek-c'de yer alan standart grafiğe bağlı olarak pg/ml cinsinden hesaplandı. Hesaplanan ortalama değerler ve hasta verileri ek-d'de yer almaktadır.

MBP için elde edilen ortalama ELISA değerlerinin normal dağılıma uymadığı belirlendi. Bu sebeple parametrik olmayan testler ile değerlendirmeler gerçekleştirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 MBP frekansı

ALS, MS ve sağlıklı bireyler arasında Kruskal-Wallis testi yapılarak MBP düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 4.2).

Ranks

Hastalık		N	ORT Değer
MBP	,0	18	51,53
	1,0	53	40,77
	2,0	18	50,92
	Total	89	

Test Statistics[a,b]

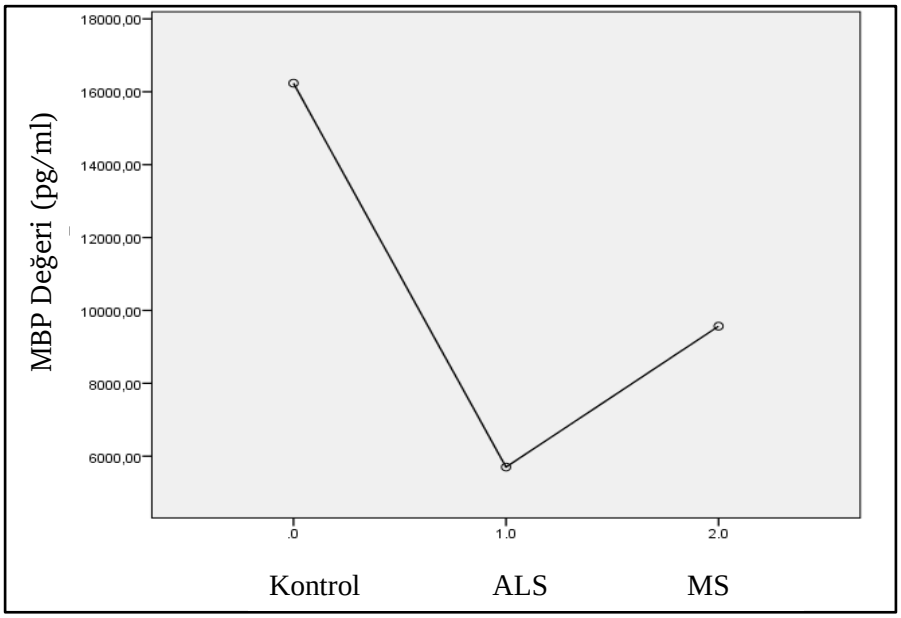
	MBP pg/ml
Chi-Square	3,512
df	2
Asymp. Sig.	,173

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: DISEASES

Şekil 4.2 Kruskal-Wallis testi sonucu (0:sağlıklı kontrol 1:ALS hasta grubu 2:MS hasta grubu)

Çalışmaya katılan tüm bireyler arasında yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda yaş grupları, Mann-Whitney testi sonucunda cinsiyete bağlı gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 MBP değerleri

Ranks

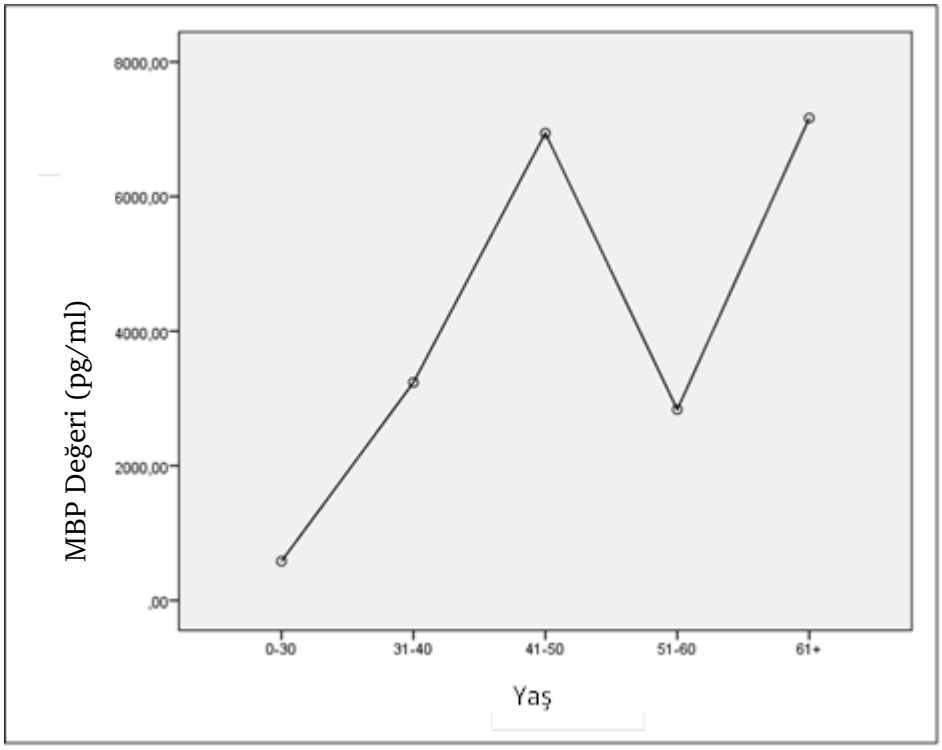
Cinsiyet		N	Ort Değer	Toplam Değer
MBP	ERKEK	45	42,19	1898,50
	KADIN	44	47,88	2106,50
	Total	89		

Test Statistics[a]

	MBP pg/ml
Mann-Whitney U	863,500
Wilcoxon W	1898,500
Z	-1,038
Asymp. Sig. (2-tailed)	,299

Şekil 4.4 Mann-Whitney testi sonucu

Hastalık başlangıç yeri bilinen 50 ALS hastası yedi gruba ayrıldı ve bu gruplar arasında MBP değeri karşılaştırıldı. Hastalığın başlangıç yerine ve cinsiyete bağlı gruplandırmada MBP düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Yaş grupları ile yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda yaş grupları arasında anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir ve Post Hoc testi kullanılarak 0-30 ve 41-50 yaş grubu arasında $p<0.05$ anlamlılığa göre fark tespit edilmiştir. $p<0.10$ anlamlılıkta değerlendirme gerçekleştirildiğinde ve 0-30, 41-50 ve 61+ yaş grubu arasında anlamlı derecede farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 ALS hastalarının yaş grafiği

4.2 Öneriler

ALS belirsiz patogenezi olan yıkıcı bir hastalıktır. Hastalığın tedavisi bulunmamakla birlikte klinik teşhisinde kullanılan biyobelirteç sayısı azdır. Biyobelirteç çalışmalarında çeşitli vücut sıvıları kullanılabilir ancak en çok tercih edilen kan ve BOS örneğidir. Kan örneği hastalardan daha kolay elde edilmesi ve protein değişiminin kolay gözlemlenebilirliğinden dolayı tercih edilmektedir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma kan plazma örneklerinde MBP düzeylerinin biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağının analizi yapıldı. ALS hastalarında, MS hastalarından ve sağlıklı bireylerden kan plazma örnekleri alındı. 53 ALS hastası, 18 MS hastası ve 18 sağlıklı örnek de sandviç ELISA yöntemi kullanılarak MBP analizi yapıldı. Elde edilen veriler SPSS 23.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Değerlerimiz normal dağılım göstermediği için parametrik olmayan testlerle analiz yapıldı ve $p<0.05$ ve $p<0.10$ anlamlılığına göre değerlendirmeler gerçekleştirildi. ALS, MS ve sağlıklı gruplar arasında protein düzeyi değerlendirilmesi yapıldı ve yaş, cinsiyet kriterleri değerlendirildi. Yalnızca ALS hastaları arasında hastalığın başlangıç yerine göre protein değerlendirilmeleri yapıldı. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında MBP düzeyi karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ancak ALS hastaları arasında yapılan yaş gruplarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

84 MS hastası, 55 diğer nörolojik hastalıklar ve 45 sağlıklı bireyin BOS'unda gerçekleştirilen ELISA çalışmalarında aktif MS ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Bu değerlere göre MBP'nin BOS'nda aktif MS hastalığına ve diğer nörolojik hastalıklara sahip kişilerde artış gösterdiği gözlemlenmiştir [10]. 94 MS hastası ve 98 sağlıklı bireyin plazma örneklerinde MBP'e özgü otoantikor tespiti yapılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre MS hastalarında otoantikor seviyesi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) [14].

Kan bazlı biyobelirteçler, ALS sırasında etkilenen, periferik kan hücreleri veya dejenere edici kas gibi diğer organ sistemleri tarafından da üretilebilir. Bu nedenle, kan ALS için biyobelirteçlerin keşfedilmesi ve doğrulanması için mükemmel bir biyo-akışkandır [5]. Kan plazmasında belirlenen biyobelirteçlere

ek olarak bu çalışmada miyelin kılıfın ana proteinlerinden olan MBP'nin biyobelirteç olarak değerlendirilmesi araştırılmıştır. Yaşa bağlı hastalık değerlendirilmesinde kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

MBP seviyesinin sağlıklı bireylerde düşük, MS ve ALS'ye sahip bireyler de yüksek olması beklenmiştir. Ancak hastaların farklı ilaç kullanmaları, hastalık hikayelerinin değişkenlik göstermesi, hastalık sürelerinin farklı olmasından ve sağlıklı kontrollerde protein seviyesinin yüksek olması ve MBP'nin kana yeterince karışmaması sebebiyle anlamlı farklılıklar gözlemlenememiştir. Ancak proteinin etkisinin daha ayrıntılı açıklanabilmesi için uzun süreli takibi ve hastalık sürecinin devamlı kontrolü gereklidir. MBP'nin ALS hastalığında biyobelirteç olarak kullanıp kullanılamayacağına dair ek veriler elde etmek için daha fazla hasta sayısı, hastalık sürecinin uzun süreli takibi ve protein etkileşimlerinin incelenmesi için hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilebilir.

A

PLATE HASTA NUMARALARI

Tablo A.1 ELISA Hasta Numaraları 1

Sample Diluent	94	32	32	71	71	7	7	26	26	2	2
8000	8000	33	33	93	93	11	11	29	29	3	3
4000	4000	35	35	95	95	18	18	41	41	4	4
2000	2000	36	36	96	96	19	19	54	54	5	5
1000	1000	39	39	97	97	22	22	56	56	6	6
500	500	65	65	98	98	23	23	62	62	8	8
250	250	66	66	47	47	25	25	63	63	9	9
67	67	69	69	70	70	X	28	1	1	10	10

Tablo A.2 ELISA Hasta Numaraları 2

	28	21	21	42	42	51	51	68	68	82	82
M10	M10	24	24	43	43	53	53	72	72	83	83
M6	M6	27	27	44	44	57	57	73	73	91	91
M7	M7	30	30	45	45	58	58	76	76	85	85
12	12	31	31	46	46	59	59	77	77	86	86
16	16	37	37	47	47	60	60	79	79	87	87
17	17	38	38	48	48	61	61	80	80	88	88
20	20	40	40	50	50	64	64	81	81	90	90

B

OD DEĞERLERİ

Tablo B.1 PLATE 1 OD Değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,05	1,108	0,211	0,288	0,242	0,25	0,259	0,282	0,212	0,217	0,291	0,172	450
B	1,811	2,118	0,219	0,276	0,332	0,291	0,28	0,251	0,256	0,226	0,322	0,181	450
C	1,403	1,027	0,782	1,003	0,195	0,193	0,51	0,083	0,26	0,306	0,214	0,213	450
D	0,657	0,466	0,361	0,37	1,681	1,931	0,828	0,049	0,293	0,319	0,192	0,227	450
E	0,33	0,244	0,242	0,204	0,291	0,295	0,332	0,047	0,301	0,29	0,235	0,215	450
F	0,198	0,173	1,089	0,785	0,262	0,238	0,198	0,055	0,243	0,241	0,238	0,236	450
G	0,099	0,14	0,779	0,521	1,187	1,482	0,433	0,058	0,571	0,56	0,261	0,245	450
H	0,048	0,226	0,185	0,15	0,565	0,625	0,559	0,051	0,264	0,175	0,269	0,267	450

Tablo B.2 PLATE 2 OD Değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,058	0,284	0,301	0,237	0,316	0,248	0,223	0,279	0,317	0,228	0,252	0,228	450
B	0,259	0,22	0,239	0,197	0,248	0,28	0,235	0,25	0,471	0,446	0,319	0,27	450
C	0,268	0,24	0,685	0,785	0,282	0,338	0,204	0,193	0,354	0,239	0,444	0,369	450
D	0,239	0,246	0,203	0,214	0,238	0,248	0,225	0,275	0,231	0,366	0,433	0,451	450
E	0,264	0,265	0,23	0,245	0,887	0,832	0,241	0,232	0,263	0,201	0,331	0,281	450
F	0,291	0,311	0,255	0,215	0,27	0,194	1,559	1,768	0,255	0,296	0,239	0,197	450
G	0,141	0,176	0,253	0,248	0,209	0,238	0,265	0,208	0,248	0,284	0,289	0,258	450
H	0,253	0,226	0,211	0,259	0,246	0,204	0,281	0,297	0,214	0,296	0,307	0,287	450

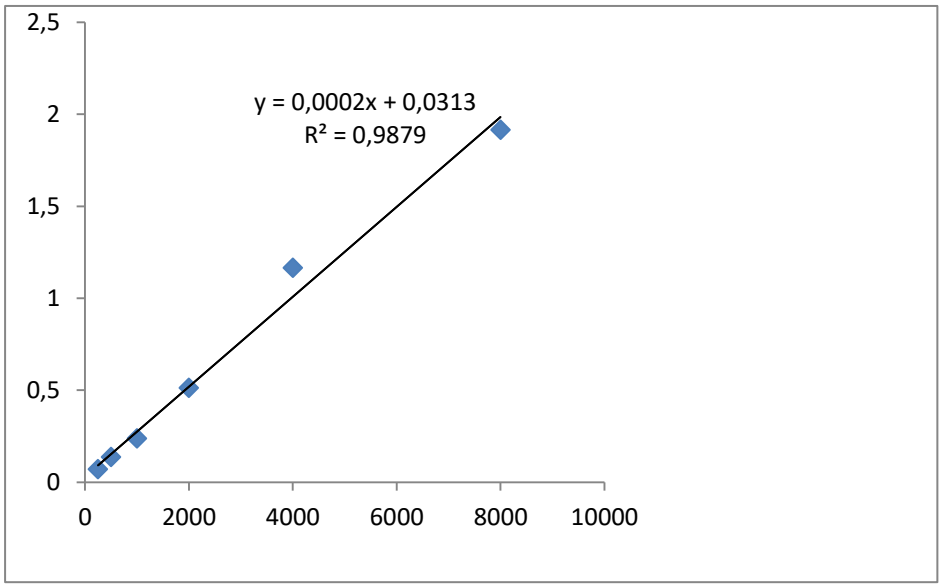
C

ORTALAMA MBP DEĞERİ HESAPLAMA VE STANDART GRAFİK

Tablo C.1 Değerler ve Hesaplamalar

STANDART DEĞERLER	1.ÖLÇÜM	2.ÖLÇÜM	ORTALAMA DEĞER	NET DEĞER (ORT-Sample Diluent ÖRNEK)
8000	1,811	2,118	1,9645	1,9145
4000	1,403	1,027	1,215	1,165
2000	0,657	0,466	0,5615	0,5115
1000	0,33	0,244	0,287	0,237
500	0,198	0,173	0,1855	0,1355
250	0,099	0,14	0,1195	0,0695

Tablo C.2 Standart Eğri Grafiği



$$\frac{(\text{OD Değerleri– Sample Diluent})-0{,}0313}{0{,}0002} = \text{MBP Değeri (pg/ml)}$$

D
HASTA VERİLERİ

Tablo D.1 Hasta Verileri

NUMARA	HASTALIK	YAŞ	CİNSİYET	TUTULUM TİPİ	İLAÇ KULLANMA DURUMU	Sonuç (pg/mL)
1	ALS	70	E	UMN	RİLUTEK	278,5
2	ALS	54	E	UMN	EDARAVONE+RİLUTEK	5133,5
3	ALS	67	K	BULBAR+UMN +LMN	RİLUTEK+ EDARAVONE	841
4	ALS	63	E		RİLUTEK + TİYOPAH	831
5	ALS	56	E	UMN+LMN	RİLUTEK	4056
6	ALS	50	K	BULBAR+UMN +LMN	RİLUTEK + TİYOPAH	1421
7	MS	45	E		IMMUNMODULAT	708,5
8	ALS	78	E	BULBAR	RİLUTEK + TİYOPAH	4278,5
9	ALS	48	E	UMN	RİLUTEK+TİYOPAH	2843,5
10	ALS	47	K	UMN +LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	431
11	MS	39	E	UMN	IMMUNMODULAT +ACTHTİYOPAH	823,5
12	ALS	39	E	UMN+LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	1151
16	ALS	35	K	UMN+LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	563,5

Tablo D.1 Hasta Verileri (devamı)

17	ALS	24	E	UMN+LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	8623,5
18	MS	46	E		IMMUNMODULAT	1058,5
19	MS	58	K		IMMUNMODULAT	843,5
20	ALS	64	K	UMN+LMN	RİLUTEK	6266
21	ALS	42	K	BULBAR+UMN	RİLUTEK	2568,5
22	MS	32	K		IMMUNMODULAT	946
23	MS	38	E		IMMUNMODULAT	921
24	ALS	47	E	UMN+LMN	RİLUTEK	2143,5
25	MS	23	K		IMMUNMODULAT	3733,5
26	MS	38	K		IMMUNMODULAT	1253,5
27	ALS	65	E	UMN+LMN	RİLUTEK	583,5
28	MS	31	K		IMMUNMODULAT	1758,5
29	MS	30	K		IMMUNMODULAT	2388,5
30	ALS	45	E	UMN+LMN	RİLUTEK	666
31	ALS	67	K	BULBAR+LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	798,5
32	SAĞLIKLI	45	K			1008,5
33	SAĞLIKLI	55	K			1123,5
35	SAĞLIKLI	24	E			1071
36	SAĞLIKLI	25	K			803,5

Tablo D.1 Hasta Verileri (devamı)

37	ALS	43	E	UMN	RİLUTEK	2421
38	ALS	48	K	UMN	RİLUTEK	691
39	SAĞLIKLI	50	E			751
40	ALS	45	K	LMN+UMN	RİLUTEK	851
41	MS	30	E			661
42	ALS	72	E	BULBAR+UMN	RİLUTEK	641
43	ALS	64	K	BULBAR	RİLUTEK	718,5
44	ALS	66	K	UMN+BULBAR	RİLUTEK	778,5
45	ALS	35	K	UMN	RİLUTEK	858,5
46	ALS	46	E	UMN	RİLUTEK	933,5
47	ALS	60	E	UMN+LMN	RİLUTEK	791
48	ALS	53	K	BULBAR	RİLUTEK	863,5
50	ALS	63	E	UMN	RİLUTEK	806
51	ALS	46	K	UMN	RİLUTEK	916
53	ALS	53	E	UMN+LMN	RELUTKEK	1098,5
54	MS	40	K		IMMUNMODULAT	386
56	MS	38	E		IMMUNMODULAT	791
57	ALS	59	K	LMN+UMN	RİLUTEK	938,5
58	ALS	68	K	UMN+BULBAR	RİLUTEK	683,5
59	ALS	60	K	BULBAR	RİLUTEK	3268,5

Tablo D.1 Hasta Verileri (devamı)

60	ALS	72	K	BULBAR	RİLUTEK	636
61	ALS	27	E	UMN+LMN	RİLUTEK	781
62	MS	35	E		IMMUNMODULAT	768,5
63	MS	45	E		IMMUNMODULAT	846
64	ALS	41	E	UMN+LMN	RİLUTEK	768,5
65	SAĞLIKLI	18	K			1003,5
66	SAĞLIKLI	22	K			913,5
67	SAĞLIKLI	22	K			1143,5
68	ALS	40	E	UMN+LMN+BULBAR	RİLUTEK	808,5
69	SAĞLIKLI	22	K			3891
70	SAĞLIKLI	25	E			753,5
71	SAĞLIKLI	30	E			711
72	ALS	35	E	UMN+LMN	RİLUTEK+TİYOPAH	718,5
73	ALS	60	E	UMN+LMN	RİLUTEK	848,5
76	ALS	39	E	UMN	RİLUTEK	806
77	ALS	55	E	UMN	RİLUTEK	586
79	ALS	50	E	UMN+LMN	RİLUTEK	843,5
80	ALS	45	E	UMN+LMN	RİLUTEK	776
81	ALS	42	E	UMN+LMN	RİLUTEK	7911

Tablo D.1 Hasta Verileri (devamı)

82	ALS	53	E	UMN+LMN	RİLUTEK	776
83	ALS	34	E	UMN	RİLUTEK	1038,5
85	ALS	30	E			956
86	ALS	50	E	UMN	RİLUTEK	1886
87	ALS	55	K			1076
88	ALS	66	K	UMN+BULBAR	RİLUTEK	1086
90	ALS	27	K		IMMUNMUDOLAT	753,5
91	ALS	55	K	UMN+LMN	RİLUTEK	971
93	SAĞLIKLI	26	K			923,5
94	SAĞLIKLI	51	K			868,5
95	SAĞLIKLI	25	E			793,5
96	SAĞLIKLI	25	K			1066
97	SAĞLIKLI	45	K			1626
98	SAĞLIKLI	48	E			1803,5
99	MS	29	K		IMMUNMUDOLAT	1123,5
100	MS	45	K		IMMUNMUDOLAT	683,5
101	MS	60	K		IMMUNMUDOLAT	961
102	SAĞLIKLI	36	K			1078,5

KAYNAKÇA

[1] R. Bowser, M. Cudkowicz, and R. Kaddurah-Daouk, "Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis," *Expert review of molecular diagnostics,* vol. 6, pp. 387-398, 2006.

[2] M. C. Kiernan, S. Vucic, B. C. Cheah, M. R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, *et al.*, "Amyotrophic lateral sclerosis," *The lancet,* vol. 377, pp. 942-955, 2011.

[3] M. R. Turner, M. C. Kiernan, P. N. Leigh, and K. Talbot, "Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis," *The Lancet Neurology,* vol. 8, pp. 94-109, 2009.

[4] C. Rohlff, "Proteomics in molecular medicine: applications in central nervous systems disorders," *ELECTROPHORESIS: An International Journal,* vol. 21, pp. 1227-1234, 2000.

[5] L. T. Vu and R. Bowser, "Fluid-based biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis," *Neurotherapeutics,* vol. 14, pp. 119-134, 2017.

[6] J. Hanig and G. Negi, "Myelin: Structure, Function, Pathology, and Targeted Therapeutics," in *Handbook of Developmental Neurotoxicology,* ed: Elsevier, 2018, pp. 33-52.

[7] J. Zhang, X. Sun, S. Zheng, X. Liu, J. Jin, Y. Ren, *et al.*, "Myelin basic protein induces neuron-specific toxicity by directly damaging the neuronal plasma membrane," *PLoS One,* vol. 9, p. e108646, 2014.

[8] B. Van Weemen and A. Schuurs, "Immunoassay using antigen—enzyme conjugates," *FEBS letters,* vol. 15, pp. 232-236, 1971.

[9] J. Kuhle, A. Regeniter, D. Leppert, M. Mehling, L. Kappos, R. L. Lindberg, *et al.*, "A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for the neurofilament heavy chain protein," *Journal of neuroimmunology,* vol. 220, pp. 114-119, 2010.

[10] M. Ohta, K. Ohta, J. Ma, J. Takeuchi, T. Saida, M. Nishimura, *et al.*, "Clinical and analytical evaluation of an enzyme immunoassay for myelin basic protein in cerebrospinal fluid," *Clinical chemistry,* vol. 46, pp. 1326-1330, 2000.

[11] V. Rachakonda, T. H. Pan, and W. D. Le, "Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they?," *Cell Research,* vol. 14, p. 349, 2004.

[12] G. Harauz, V. Ladizhansky, and J. M. Boggs, "Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein," *Biochemistry,* vol. 48, pp. 8094-8104, 2009.

[13] A. Raasakka, S. Ruskamo, J. Kowal, R. Barker, A. Baumann, A. Martel, *et al.*, "Membrane association landscape of myelin basic protein portrays formation of the myelin major dense line," *Scientific reports,* vol. 7, p. 4974, 2017.

[14] A. Chamczuk, M. Ursell, P. O'Connor, G. Jackowski, and M. Moscarello, "A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis," *Journal of immunological methods,* vol. 262, pp. 21-27, 2002.

[15] A. A. Belogurov, I. N. Kurkova, A. Friboulet, D. Thomas, V. K. Misikov, M. Y. Zakharova, *et al.*, "Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis," *The journal of Immunology,* vol. 180, pp. 1258-1267, 2008.

[16] C. Clarke and R. Lemon, "Nervous system structure and function," *Neurology: A Queen Square Textbook,* pp. 11-67, 2016.

[17] R. M. Stassart, W. Möbius, K.-A. Nave, and J. M. Edgar, "The axon-myelin unit in development and degenerative disease," *Frontiers in neuroscience,* vol. 12, p. 467, 2018.

[18] C. S. Raine, "Morphology of myelin and myelination," in *Myelin*, ed: Springer, 1984, pp. 1-50.

[19] D. Kirschner and A. Blaurock, "Organization, phylogenetic variations, and dynamic transitions of myelin," *Myelin: biology and chemistry,* pp. 3-78, 1992.

[20] D. Hartline and D. Colman, "Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers," *Current Biology,* vol. 17, pp. R29-R35, 2007.

[21] O. Jahn, S. Tenzer, and H. B. Werner, "Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath," *Molecular neurobiology,* vol. 40, pp. 55-72, 2009.

[22] D. A. Kirschner, L. Wrabetz, and M. L. Feltri, "The P0 gene," in *Myelin biology and disorders*, ed: Elsevier, 2004, pp. 523-545.

[23] R. Quarles, "Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* vol. 59, pp. 1851-1871, 2002.

[24] U. Suter, "PMP 22 gene," in *Myelin biology and disorders*, ed: Elsevier, 2004, pp. 547-564.

[25] A. T. Campagnoni and R. P. Skoff, "The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes," *Brain Pathology,* vol. 11, pp. 74-91, 2001.

[26] L. D. Hudson, "Proteolipid protein gene," in *Myelin biology and disorders*, ed: Elsevier, 2004, pp. 401-420.

[27] M. A. Moscarello, "Myelin basic protein, the “executive” molecule of the myelin membrane," in *Cell Biology and Pathology of Myelin*, ed: Springer, 1997, pp. 13-25.

[28] S. Aggarwal, L. Yurlova, and M. Simons, "Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly," *Trends in cell biology,* vol. 21, pp. 585-593, 2011.

[29] A. Roach, K. Boylan, S. Horvath, S. B. Prusiner, and L. E. Hood, "Characterization of cloned cDNA representing rat myelin basic protein: absence of expression in brain of shiverer mutant mice," *Cell,* vol. 34, pp. 799-806, 1983.

[30] S. Aggarwal, N. Snaidero, G. Pähler, S. Frey, P. Sánchez, M. Zweckstetter, *et al.*, "Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork," *PLoS biology,* vol. 11, p. e1001577, 2013.

[31] E. C. Jacobs, T. M. Pribyl, K. Kampf, C. Campagnoni, C. S. Colwell, S. D. Reyes, *et al.*, "Region-specific myelin pathology in mice lacking the golli products of the myelin basic protein gene," *Journal of Neuroscience,* vol. 25, pp. 7004-7013, 2005.

[32] G. Harauz, N. Ishiyama, C. M. Hill, I. R. Bates, D. S. Libich, and C. Fares, "Myelin basic protein—diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis," *Micron,* vol. 35, pp. 503-542, 2004.

[33] F. de Ferra, H. Engh, L. Hudson, J. Kamholz, C. Puckett, S. Molineaux, *et al.*, "Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein," *Cell,* vol. 43, pp. 721-727, 1985.

[34] F. Chou, C. Chou, R. Shapira, and R. F. Kibler, "Basis of microheterogeneity of myelin basic protein," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 251, pp. 2671-2679, 1976.

[35] J. W. Lamensa and M. A. Moscarello, "Deimination of human myelin basic protein by a peptidylarginine deiminase from bovine brain," *Journal of neurochemistry,* vol. 61, pp. 987-996, 1993.

[36] M.-T. Weil, W. Möbius, A. Winkler, T. Ruhwedel, C. Wrzos, E. Romanelli, *et al.*, "Loss of myelin basic protein function triggers myelin breakdown in models of demyelinating diseases," *Cell reports,* vol. 16, pp. 314-322, 2016.

[37] J. M. Boggs, G. Rangaraj, Y.-M. Heng, Y. Liu, and G. Harauz, "Myelin basic protein binds microtubules to a membrane surface and to actin filaments in vitro: effect of phosphorylation and deimination," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,* vol. 1808, pp. 761-773, 2011.

[38] A. M. Papini and E. König, "Novel diagnostic tools and solutions for multiple sclerosis treatment: a patent review (2009–2014)," *Expert opinion on therapeutic patents,* vol. 25, pp. 873-884, 2015.

[39] Y. Hu, I. Doudevski, D. Wood, M. Moscarello, C. Husted, C. Genain, *et al.*, "Synergistic interactions of lipids and myelin basic protein," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 101, pp. 13466-13471, 2004.

[40] H. H. Berlet, H. Bischoff, and F. Weinhardt, "Divalent metals of myelin and their differential binding by myelin basic protein of bovine central nervous system," *Neuroscience letters,* vol. 179, pp. 75-78, 1994.

[41] S. Nuzzo, C. Meneghini, S. Mobilioo, H. Haas, P. Riccio, A. Fasano, *et al.*, "An x-ray absorption spectroscopy study of the zinc environment in Langmuir-Blodgett phospholipid multilayers," *Biophysical journal,* vol. 83, pp. 3507-3512, 2002.

[42] S. Ono, T. Imai, S. Matsubara, K. Takahashi, K. Jinnai, T. Yamano, *et al.*, "Decreased urinary concentrations of type IV collagen in amyotrophic lateral sclerosis," *Acta neurologica scandinavica,* vol. 100, pp. 111-116, 1999.

[43] M. Friess, J. Hammann, P. Unichenko, H. J. Luhmann, R. White, and S. Kirischuk, "Intracellular ion signaling influences myelin basic protein synthesis in oligodendrocyte precursor cells," *Cell Calcium,* vol. 60, pp. 322-330, 2016.

[44] R. Stapulionis, C. L. P. Oliveira, M. C. Gjelstrup, J. S. Pedersen, M. E. Hokland, S. V. Hoffmann, *et al.*, "Structural insight into the function of myelin basic protein as a ligand for integrin αMβ2," *The Journal of Immunology,* vol. 180, pp. 3946-3956, 2008.

[45] V. Majava, M. V. Petoukhov, N. Hayashi, P. Pirilä, D. I. Svergun, and P. Kursula, "Interaction between the C-terminal region of human myelin basic protein and calmodulin: analysis of complex formation and solution structure," *BMC structural biology,* vol. 8, p. 10, 2008.

[46] A. Al-Chalabi, P. M. Andersen, P. Nilsson, B. Chioza, J. L. Andersson, C. Russ, *et al.*, "Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis," *Human molecular genetics,* vol. 8, pp. 157-164, 1999.

[47] N. L. Alderson, B. M. Rembiesa, M. D. Walla, A. Bielawska, J. Bielawski, and H. Hama, "The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 279, pp. 48562-48568, 2004.

[48] M. Bogdanov, R. H. Brown Jr, W. Matson, R. Smart, D. Hayden, H. O'Donnell, *et al.*, "Increased oxidative damage to DNA in ALS patients," *Free Radical Biology and Medicine,* vol. 29, pp. 652-658, 2000.

[49] P. A. Doucette, L. J. Whitson, X. Cao, V. Schirf, B. Demeler, J. S. Valentine, *et al.*, "Dissociation of Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase Dimers Using Chaotrope and Reductant INSIGHTS INTO THE MOLECULAR BASIS FOR DIMER STABILITY," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 279, pp. 54558-54566, 2004.

[50] C. Zhang, A. K. Walker, R. Zand, M. A. Moscarello, J. M. Yan, and P. C. Andrews, "Myelin basic protein undergoes a broader range of modifications in mammals than in lower vertebrates," *Journal of proteome research,* vol. 11, pp. 4791-4802, 2012.

[51] P. M. Andersen, "Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene," *Current neurology and neuroscience reports,* vol. 6, pp. 37-46, 2006.

[52] B. Van Engelen, K. Lamers, F. Gabreels, R. A. Wevers, W. Van Geel, and G. F. Borm, "Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid," *Clinical chemistry,* vol. 38, pp. 813-816, 1992.

[53] M. Ohta, K. Ohta, M. Nishimura, and T. Saida, "Detection of myelin basic protein in cerebrospinal fluid and serum from patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis," *Annals of clinical biochemistry,* vol. 39, pp. 603-605, 2002.

[54] M. DeJesus-Hernandez, I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N. J. Rutherford, *et al.*, "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS," *Neuron,* vol. 72, pp. 245-256, 2011.

[55] D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, *et al.*, "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis," *Nature,* vol. 362, p. 59, 1993.

[56] M. Inghilleri and E. Iacovelli, "Clinical neurophysiology in ALS," *Archives italiennes de biologie,* vol. 149, pp. 57-63, 2011.

[57] M. R. Turner, R. Bowser, L. Bruijn, L. Dupuis, A. Ludolph, M. McGrath, *et al.*, "Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis," *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration,* vol. 14, pp. 19-32, 2013.

[58] B. D. W. Group, A. J. Atkinson Jr, W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, *et al.*, "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework," *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* vol. 69, pp. 89-95, 2001.

[59] R. Bowser, M. R. Turner, and J. Shefner, "Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations," *Nature Reviews Neurology,* vol. 7, p. 631, 2011.

[60] M. E. Cudkowicz, S. Titus, M. Kearney, H. Yu, A. Sherman, D. Schoenfeld, *et al.*, "Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *The Lancet Neurology,* vol. 13, pp. 1083-1091, 2014.

[61] T. Krüger, J. Lautenschläger, J. Grosskreutz, and H. Rhode, "Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery," *PROTEOMICS–Clinical Applications,* vol. 7, pp. 123-135, 2013.

[62] J. D. Rothstein, "Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis," *Annals of neurology,* vol. 65, pp. S3-S9, 2009.

[63] M. Sjögren, P. Davidsson, A. Wallin, A.-K. Granerus, E. Grundström, H. Askmark, *et al.*, "Decreased CSF-β-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mismetabolism of β-amyloid induced by disparate mechanisms," *Dementia and geriatric cognitive disorders,* vol. 13, pp. 112-118, 2002.

[64] N. S. Verber, S. R. Shepheard, M. Sassani, H. E. McDonough, S. A. Moore, J. J. Alix, *et al.*, "Biomarkers in motor neuron disease: a state of the art review," *Frontiers in neurology,* vol. 10, p. 291, 2019.

[65] Z. Xu, R. D. Henderson, M. David, and P. A. McCombe, "Neurofilaments as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis," *PLoS One,* vol. 11, p. e0164625, 2016.

[66] I. R. Mackenzie and R. Rademakers, "The role of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia," *Current opinion in neurology,* vol. 21, p. 693, 2008.

[67] E. Verstraete, H. B. Kuiperij, M. M. Van Blitterswijk, J. H. Veldink, H. J. Schelhaas, L. H. Van Den Berg, *et al.*, "TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis," *Amyotrophic Lateral Sclerosis,* vol. 13, pp. 446-451, 2012.

[68] S. D. Gan and K. R. Patel, "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay," *J Invest Dermatol,* vol. 133, p. e12, 2013.

[69] K. Shah and P. Maghsoudlou, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics," *British Journal of Hospital Medicine,* vol. 77, pp. C98-C101, 2016.

[70] P. Hornbeck, "Enzyme-linked immunosorbent assays," *Current protocols in immunology,* vol. 1, pp. 2.1. 1-2.1. 22, 1992.

[71] L. H. Stanker and R. M. Hnasko, "A double-sandwich ELISA for identification of monoclonal antibodies suitable for sandwich immunoassays," in *ELISA*, ed: Springer, 2015, pp. 69-78.

[72] J. Canady, S. Arndt, S. Karrer, and A. K. Bosserhoff, "Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis," *Journal of Investigative Dermatology,* vol. 133, pp. 647-657, 2013.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgileri: deryatopuz94@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. E. BERTAN, D. TOPUZ, A. GÜNEL, Ş. VURAL KORKUT " Nörodejeneratif Hastalıklarda Plazma Biyobelirteç Düzeylerinin Araştırlması", 31. Ulusal Kimya Kongresi 10-13 Eylül 2019

Projeler

1. Amyotrofik Lateral Skleroz ALS Hastalarında Miyelin Bazik Protein MBP Düzeyinin Araştırılması

Proje Yürütücüsü : Şenay VURAL KORKUT

Araştrmacı : Derya TOPUZ ATA

Proje Kodu : 3519