

Klinik İzole Sendromdan Multipl Skleroz'a Dönüşümde Kompleman Sistemi ile İlişkilendirilen miR-335-5p ve Hedef Geni C1QA'nın İncelenmesi

Investigation of miR-335-5p and Its Target Gene C1QA Associated with the Complement System in Conversion from Clinically Isolated Syndrome to Multiple Sclerosis

● Ayşegül TÜRK^{1,2}, ● Cem İsmail KÜÇÜKALİ³, ● Tuğba KÖSE⁴, ● Zerrin KARAASLAN³, ● Murat KÜRTÜNCÜ⁵
● Esin BAYRALI ÜLKER^{1,2}, ● Deryanaz BİLLUR^{1,2}, ● Özlem TİMİRCİ KAHRAMAN¹

¹İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Bilgi Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Multipl skleroz (MS) otoimmün bir hastalık olup, merkezi sinir sistemini hedef alarak enflamasyon ve hasara neden olur. Dört farklı şekilde teşhis edilir ve birçok klinik izole sendrom (KİS) hastası tekrarlayan-düzeltilen MS'e (RRMS) ilerleme potansiyeline sahiptir. Multipl skleroz ile ilişkilendirilen C1QA molekülü, hastalıktaki anormal aktivitesi nedeniyle bir tedavi hedefi olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, miR-335-5p ve hedef molekülü C1QA'nın MS progresyonundaki rolleri ve bu ilişkinin epigenetik düzeydeki mekanizmaları araştırılmıştır. KİS, RRMS ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-335-5p ve C1QA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak, hastalık aktivitesiyle olan ilişkileri değerlendirilmiştir.

Yöntem: Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) 18 KİS ve 32 RRMS hastası ile 16 sağlıklı bireyin kan örneklerinden izole edildi. C1QA ve miR-335-5p ekspresyon düzeylerini tespit etmek için RNA izolasyonu ve Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR (qRT-PCR) işlemi gerçekleştirildi, C1QA protein düzeyleri ise ELISA kullanılarak belirlendi.

Bulgular: Veriler, KİS hastalarında hem C1QA gen ekspresyonunda ($p=0,0291$) hem de miR-335-5p ekspresyonunda ($p=0,0196$) kontrol

grubuna göre anlamlı artış olduğunu ortaya koymuştur. Her iki parametre için de RRMS hastalarında kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir. Tekrarlayan-düzeltilen MS hastaları, KİS hastalarına kıyasla daha düşük C1QA ve miR-335-5p düzeyleri göstermiştir. miR-335-5p ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0,0442$). Gruplar arasında C1QA protein düzeylerinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Sonuç: Klinik izole sendrom hastalarında kontrole kıyasla anlamlı şekilde miR-335-5p ve C1QA ekspresyonunda artış olması, bu moleküllerin MS progresyonu için biyobelirteç olma potansiyelini ortaya koymaktadır. Ayrıca KİS ile kıyaslandığında, RRMS hastalarında miR-335-5p geninin aktivitesinde önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu bulgular, miR-335-5p'nin hem KİS hem de RRMS progresyonunu ayırt etmede potansiyel bir biyolojik belirteç olabileceğini destekler niteliktedir.

Anahtar Sözcükler: C1QA, ekspresyon, klinik izole sendrom, miR-335-5p, tekrarlayan-düzeltilen multipl skleroz

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease, attacks the central nervous system, causing inflammation and damage. Diagnosed in four forms, many clinically isolated syndrome (CIS) patients progress to relapsing-remitting MS (RRMS). C1QA, a molecule linked to MS, might be a treatment target due to its abnormal activity in the disease. This study investigated miR-335-5p and its targeting C1QA expression as potential biomarkers for disease progression. This relationship was also evaluated from an epigenetic perspective between CIS, RRMS and control groups.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 18 CIS, 32 RRMS, and 16 control blood samples. RNA isolation and Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) were performed to detect the expression levels of C1QA and miR-335-5p, while C1QA protein levels were determined using ELISA.

Results: The data revealed significant increases in both C1QA gene expression ($p=0.0291$) and miR-335-5p expression ($p=0.0196$) in CIS

patients compared to controls. Although increased expression levels were observed for both parameters in RRMS patients versus controls, they did not reach statistical significance. Patients with RRMS showed lower levels of C1QA and miR-335-5p compared to those with CIS. Notably, the decrease in miR-335-5p was statistically significant ($p=0.0442$). No significant difference in C1QA protein levels was observed among the groups ($p > 0.05$).

Conclusion: miR-335-5p and C1QA emerge as potential biomarkers for MS progression, exhibiting significant upregulation in CIS compared to controls. miR-335-5p also shows significant downregulation in RRMS compared to CIS. These findings support the potential of miR-335-5p for distinguishing and understanding the progression of both CIS and RRMS.

Keywords: C1QA, clinically isolated syndrome, expression, miR-335-5p, relapsing-remitting multiple sclerosis

Cite this article as: Türk A, Küçükali C, Köse T, Karaaslan Z, Kürtüncü M, Bayralı Ülker E ve ark. Klinik İzole Sendromdan Multipl Skleroz'a Dönüşümde Kompleman Sistemi ile İlişkilendirilen miR-335-5p ve Hedef Geni C1QA'nın İncelenmesi. Arch Neuropsychiatry 2025;62:341–347. doi: 10.29399/npa.28771

Öne Çıkan Noktalar

- KİS hastalarında C1QA geni ve miR-335-5p yüksekliği erken MS'de ayırıcı olabilir.
- C1QA, miR-335-5p RRMS'de kontrole göre daha yüksek ancak KİS'de daha düşüktür.
- miR-335-5p, kontrole göre KİS'de yukarı regüle olurken RRMS'de aşağı regüledir.
- miR-335-5p erken dönem MS'i ayırt etmede biyobelirteç adayı olabilir.

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminde (MSS) enflamasyon ve demiyelinizasyon ile karakterize kronik otoimmün bir hastalıktır (1). Dünya genelinde 2,9 milyon kişi MS ile yaşamaktadır ve Türkiye'de ise 58.401 kişi bu hastalıktan etkilenmektedir. Multipl skleroz vakalarının çoğu 20-50 yaşları arasında teşhis edilir ve kadınlarda MS erkeklerden üç kat daha fazla görülür (2,3). MS, bireyler arasında önemli ölçüde değişen geniş bir semptom yelpazesi ile kendini gösterir ve bu nedenle genç yetişkinlerde nörolojik hasarın önemli bir nedenidir. Hastalık progresyonundaki bu değişkenliğin altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir ve günümüzde MS için kesin bir tedavi yoktur (4). Klinik izole sendromu (KİS) olarak bilinen tek bir epizot ile başlayan, sıklıkla tekrarlayan nörolojik semptom atakları ile karakterizedir. Multipl skleroz daha sonra şiddetine göre dört gruba ayrılır: tekrarlayan-düzenli MS (RRMS), primer progresif MS (PPMS) ve sekonder progresif MS (SPMS). Hastaların yaklaşık %85-90'ı RRMS tanısı almaktadır (5,6).

Kompleman sistemi, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olup, kanda dolaşan veya hücre yüzeyine bağlı yaklaşık 50 proteinden oluşur. Dışarıdan gelen patojenlerin saldırılarını hızla tespit etmek ve bunlara yanıt vermek üzere tasarlanmıştır (7,8). Kompleman sistemi, üç farklı yoldan işlev görür: klasik, alternatif ve lektin yolu. Klasik yolda, C1 kompleman protein kompleksi ilk yanıt verici olarak görev yapar ve C1q, C1r, C1s'den oluşur (9). Multipl skleroz hastalarında yapılan patolojik ve serolojik çalışmalar ile Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) hayvan modelinde yapılan fonksiyonel çalışmalar uzun süredir kompleman sisteminin MS patolojisinde rol oynadığı hipotezini desteklemektedir (1,10). Hem akut hem de kronik MS lezyonlarında kompleman aktivasyonu gösterilmiş olup, C1q boyamasının varlığı klasik yolda kompleman aktivasyonunun önemini düşündürmektedir (11). Erken klasik kompleman yolunun nöronal sinapslarda ve nörotoksik glia hücrelerindeki ekspresyonunun belirlenmesi, MS nörodejenerasyon patofizyolojisinde kompleman sisteminin oynayabileceği potansiyel rolü vurgulayan yeni bir araştırma alanı ortaya çıkarmıştır (12).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), MS gibi birçok hastalığın tanı ve hastalığın nasıl geliştiğinin takip edilmesinde biyobelirteç olarak kullanıma potansiyeli

taşıyan molekülüdür (13). Multipl skleroz hastalarından alınan periferik kan, plazma, serum, farklı periferik hücre tipleri ve beyin lezyonları gibi çeşitli vücut sıvıları ve dokularda miRNA ekspresyonunu analiz eden çalışmalar, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında düzensiz miRNA paternleri ortaya koymuştur (14,15). miR-335-5p, MS'de ekspresyonu değişen miRNA'lar arasındadır (14,16,17) ve C1QA, miR-335-5p için potansiyel bir hedef olarak öne çıkmaktadır (18).

Hiçbir araştırma henüz MS hastalarında miR-335-5p ile C1QA arasındaki ilişkiyi araştırmamıştır. Ayrıca, bu miRNA-protein korelasyonu, ilk ataktan sonra KİS ve RRMS arasında ayırım yapmak için potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, miR-335-5p ekspresyonu ve C1QA gen ve protein ekspresyon seviyeleri, KİS, RRMS ve sağlıklı kontrollerden alınan serum ve PBMC'lerde incelenmiştir. Amacımız, hem sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında MS riskini değerlendirmede hem de ilk ataktan sonra KİS ve RRMS hastaları arasındaki farkları ayırt etmede potansiyel biyobelirteç özelliklerini araştırmaktır.

YÖNTEM

Katılımcılar

Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Bölümü, Demiyelinizan Hastalıklar Polikliniği'nden iki hasta grubu dâhil edilmiştir. McDonald kriterlerini (19) karşılayan ve son iki ayda herhangi bir immün baskıcı veya immünomodülatör tedavi almamış hastalardan seçilmiştir. Birinci grup 18 KİS hastasından oluşurken, ikinci grup 32 RRMS hastasından, üçüncü grup ise yaş ve cinsiyet uyumlu 16 sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır (Tablo 1).

Çalışmaya 18 yaş ve üzeri erişkin kadın ve erkekler dâhil edilmiştir. Hamile veya menopoz döneminde olan katılımcılar çalışmadan çıkarılmıştır. Tüm katılımcılara araştırmanın amacı, kapsamı ve metodolojisi, bilgilendirilmiş onam formu aracılığıyla bildirilmiştir. Yaş, cinsiyet, alkol tüketimi, sigara alışkanlığı ve aile öyküsü gibi demografik bilgiler kaydedilmiştir. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 05/11/2021 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunup, onaylanmıştır.

Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Pıhtılaşmamış kan örnekleri 1:2 oranında PBS ile seyreltilerek hazırlanmıştır. 1:2 seyreltilmiş kan ve PBS karışımı daha sonra Ficoll çözeltisinin üzerine yavaşça eklenerek bir yoğunluk gradyanı oluşturulmuştur. 3000 rpm'de 20°C'de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjasyondan sonra, PBMC tabakası toplanarak yeni bir Falcon tüpüne aktarılmıştır. PBMC'ler, her defasında 1800 rpm'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilerek 1:1 oranında PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra Falcon tüpe 1 ml FBS eklenip pipetaj yapılmıştır. Hücre sayımı floresan mikroskop altında Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. On milyon hücre içeren her bir flakonda daha sonra %20 DMSO/FBS karışımının 500 µL'si ile karıştırılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri

	KİS	RRMS	Kontrol	p ¹	p ²	p ³
Cinsiyet (kadın/erkek)	10/8	18/14	8/8	1,000	1,000	1,000
Yaş (X ± SD)	39,61±12,08	29,41±9,43	32,43±9,09	0,050	0,278	0,003*
Sigara kullanımı (evet/hayır)	9/9	9/23	4/12	0,284	1,000	0,139
Alkol kullanımı (evet/hayır)	3/15	7/25	6/10	0,242	0,285	0,730

n: örnek sayısı; gruplararası farklılıklar ki-kare testi (X²) kullanılarak incelendi; tablodaki değerler X ± SD (X: ortalama; SD: standart sapma) olarak sunulmuştur; *: p < 0,05; p¹: KİS-Kontrol; p²: RRMS Kontrol; p³: KİS-RRMS.

C1QA ve miR-335-5p Ekspresyon Analizi

Total RNA ve miRNA izolasyonu, PBMC'lerden NucleoSpin miRNA İzolasyon Kiti (Macherey-Nagel, Düren, Almanya) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Hem total RNA hem de miRNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Tüm RNA örneklerinin konsantrasyonları, 260 nm dalga boyunda 10 ng/μL olacak şekilde normalize edilmiştir. İzole edilen total RNA, SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak cDNA'ya ters transkript edilirken, miRNA örnekleri Single miRNA qPCR kiti (A. B. T. Laboratory Industry, ABD) kullanılarak ters transkribe edilmiştir. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR), total RNA örnekleri için Jena qPCR Prob Master Mix kiti ve miRNA için Single miRNA qPCR kiti (Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. β-Actin ve U6, qRT-PCR veri analizi için referans genler olarak kullanılmıştır.

ELISA

Serum örneklerindeki C1QA düzeyleri, ABclonal Human C1QA Sandwich ELISA kit protokolü (ABclonal Biotechnology, ABD) kullanılarak tayin edilmiştir. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra, her bir kuyunun optik yoğunluğu beş dakika içinde 450 nm'de Multiscan Spectrum mikropate okuyucu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

İstatistiksel Analiz

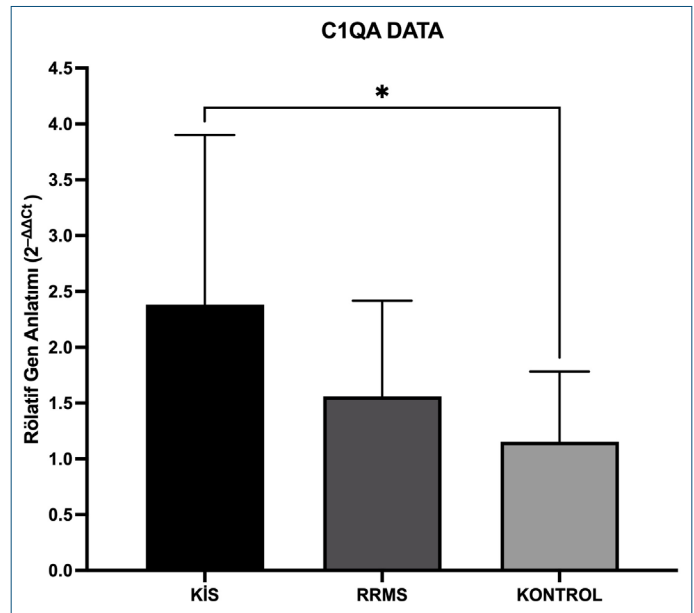
İstatistiksel analizler, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak ayarlanmış GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Normal dağılım göstermeyen hasta ve kontrol grubu verileri, anlamlı farklılıkları tespit etmek için sırasıyla Fischer'in Kesin Olasılık Testi ve Mann-Whitney U Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Grup bazlı sonuçları değerlendirmek için alıcı işletim karakteristik eğrisi (ROC) analizi yapılmıştır. Normal dağılım gösteren protein düzeyleri ise Shapiro-Wilk testi (t-testi) kullanılarak gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Korelasyon analizi için ise Spearman korelasyonu kullanılmıştır.

BULGULAR

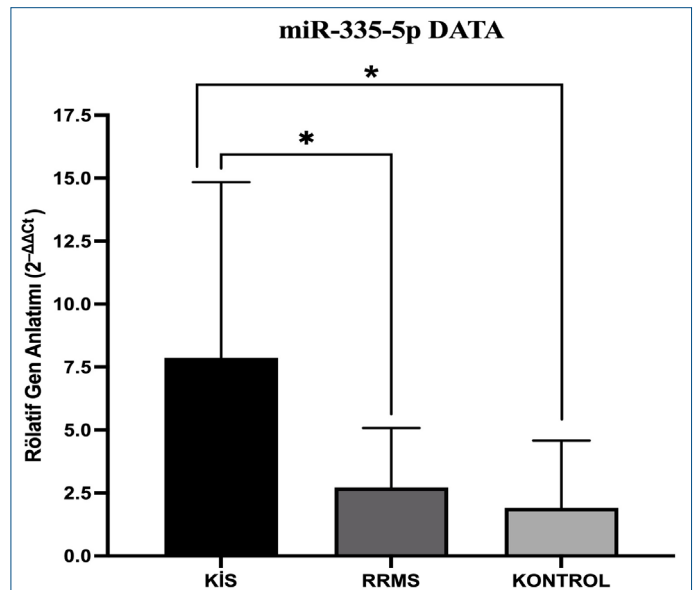
Şekil 1, qRT-PCR ile ölçüldüğü gibi, kontrol ve hasta gruplarından izole edilen PBMC'lerde C1QA gen ekspresyonundaki rölatif değişiklikleri göstermektedir. Klinik izole sendrom grubunda kontrole göre, C1QA'da 2,33 kat anlamlı artış tespit edilmiştir ($p=0,0291$). Tekrarlayan-düzelen MS grubunda ise C1QA ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla 1,35 kat artış gözlenmiştir, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,1072$). Hastalık gruplarını karşılaştırdığımızda, RRMS hastalarında C1QA ekspresyon seviyeleri KİS grubuna göre 0,58 kat azalma göstermiş olsa da, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,1670$).

Kontrol, KİS ve RRMS gruplarında miR-335-5p ekspresyon seviyelerindeki rölatif değişiklikler qRT-PCR analizi ile belirlenmiştir (Şekil 2). miR-335-5p ekspresyonu analiz edildiğinde, KİS grubu kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde 4,11 kat artış göstermiştir ($p=0,0196$). Tekrarlayan-düzelen MS grubunda ise kontrole kıyasla 1,42 kat artış gözlemlenmiş olsa da, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,1960$). İlginç bir şekilde, hastalık grupları arasında, RRMS'de KİS'e kıyasla miR-335-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 0,34 kat azalma gözlenmiştir ($p=0,0442$).

Tablo 2, C1QA ve miR-335-5p ekspresyon seviyelerini gruplararası karşılaştıran Mann-Whitney U testi p-değerlerini göstermektedir. Bu biyobelirteçlerin duyarlılık ve özgüllük açısından tanısal doğruluğunu değerlendirmek için ROC analizi kullanıldı. C1QA için ROC eğrileri Şekil 3'te, miR-335-5p için ROC eğrileri ise Şekil 4'te gösterilmiştir. Tablo 2 ayrıca her iki gen için eğri altında kalan alan, p-değerleri ve güven aralıklarını sunmaktadır.



Şekil 1. KİS, RRMS ve kontrol grupları arasında C1QA gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (* $p < 0,05$).

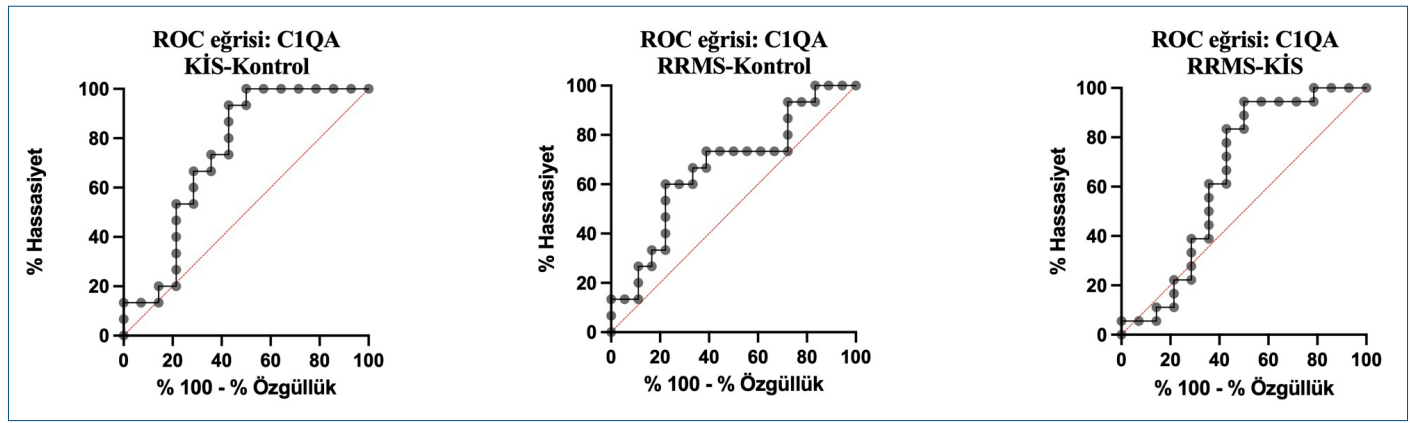


Şekil 2. KİS, RRMS ve kontrol grupları arasında miR-335-5p ekspresyon düzeylerinin analizi (* $p < 0,05$).

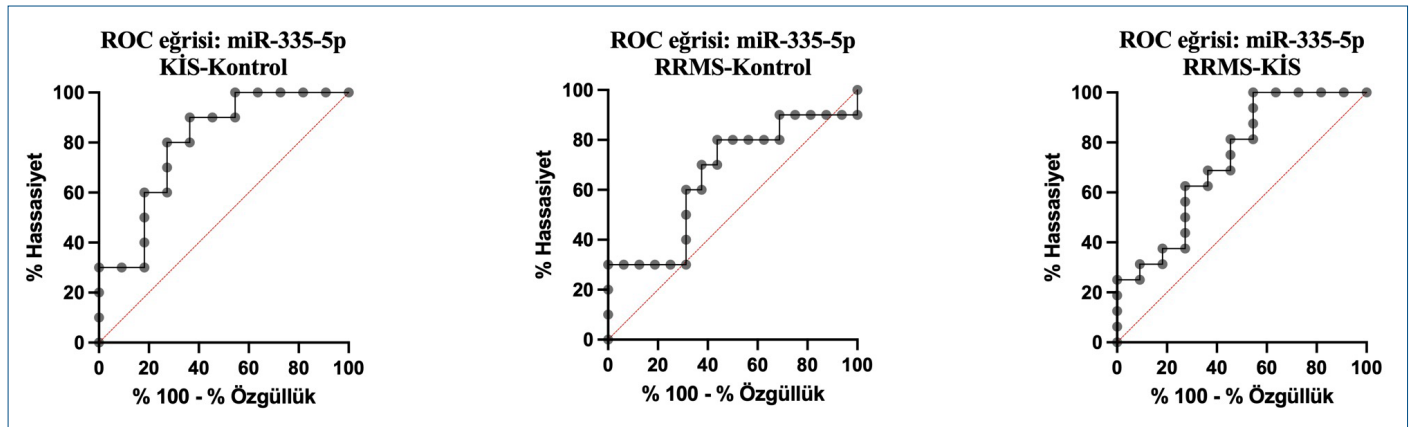
Tablo 2. Çalışma grupları arasında C1QA ve miR-335-5p gen ekspresyonunun karşılaştırmalı analizi

Mann-Whitney U testi			ROC analizi		
C1QA					
Group	p değeri	AUC	SE	p değeri	%95 CI
KİS-kontrol	0,029*	0,73	0,09	0,029*	0,54–0,93
RRMS-kontrol	0,107	0,66	0,09	0,103	0,47–0,85
KİS-RRMS	0,167	6,64	0,10	0,159	0,43–0,86
miR-335-5p					
KİS-kontrol	0,019*	0,80	0,09	0,020*	0,60–0,99
RRMS-kontrol	0,196	0,65	0,11	0,187	0,42–0,85
KİS-RRMS	0,044*	0,73	0,10	0,043*	0,53–0,93

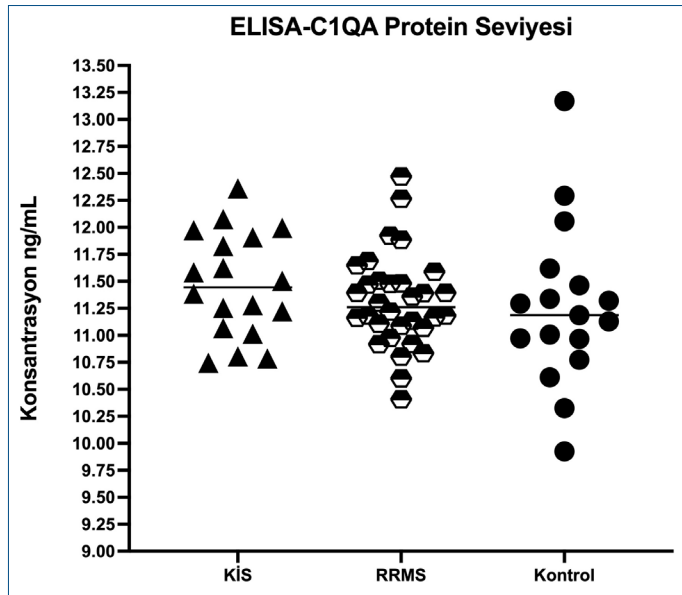
* $p < 0,05$; istatistiksel olarak anlamlı değerler kalın olarak gösterilmiştir; AUC: eğri altındaki alan; KİS: klinik olarak izole sendrom; miR: mikroRNA; ROC: alıcı işletim karakteristik; RRMS: tekrarlayan-düzelen MS.



Şekil 3. C1QA'nın ROC eğrisi analizi.



Şekil 4. miR-335-5p'nin ROC eğrisi analizi.



Şekil 5. KİS, RRMS ve kontrol grupları arasında C1QA protein ekspresyonunun karşılaştırılması.

Table 3. Spearman korelasyon analizi sonuçları

	C1QA mRNA/ miR-335-5p		miR-335-5p/ C1QA protein		C1QA mRNA/ C1QA protein	
	r	p	r	p	r	p
KİS-kontrol	0,054	0,881	0,354	0,286	0,063	0,860
RRMS-kontrol	-0,360	0,187	0,354	0,286	0,057	0,839
KİS-RRMS	-0,361	0,187	-0,075	0,791	0,057	0,840

*p<0,05; istatistiksel olarak anlamlı değerler kalın olarak gösterilmiştir; C1QA: kompleman C1q A zinciri; miR: mikroRNA; r: korelasyon katsayısı.

Alıcı işletim karakteristik eğrisi analizi, hem C1QA ($p=0,029$) hem de miR-335-5p ($p=0,020$) ekspresyon seviyelerinde KİS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. KİS-RRMS karşılaştırmasında ise miR-335-5p ekspresyonu istatistiksel anlamlılığını korumuştur ($p=0,043$).

Klinik izole sendrom, RRMS ve sağlıklı kontrol gruplarından alınan serum örneklerinde C1QA protein seviyelerinin sandviç ELISA yöntemi kullanılarak yapılan analizi, gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Şekil 5, her grup için C1QA seviyelerini göstermektedir. C1QA ve miR-335-5p arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için, çalışma kapsamında aralarındaki ilişkinin gücünü ve yönünü belirlemek amacıyla korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Verilerin parametrik olmayan yapısı nedeniyle Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. Tablo 3'teki sonuçlar, incelenen biyolojik belirteçler (C1QA mRNA, miR-335-5p ve C1QA protein) arasında herhangi bir grup karşılaştırmasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermektedir ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Multipl skleroz, kronik, immün aracılı bir nörolojik hastalık olup, enflamatuvar demiyelinizasyon, oligodendrosit azalması ve aksonal kayıp ile birlikte MSS'de plak oluşumu ile karakterizedir (1). Multipl skleroz tanısı, McDonald kriterlerine dayanmaktadır (19). Multipl sklerozun diğer nörolojik hastalıklardan ayırıcı tanısında beyaz cevher lezyonları hâlâ kritik bir rol oynamakla birlikte, bu lezyonların görünümü çeşitli nörolojik durumlarla örtüşebilir ve dolayısıyla tanısız karmaşaya yol açabilir. Bu noktada, bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerin ve miRNA ekspresyon paternlerinin MS tanısı ve prognozu ile ilişkilendirilebileceği, bu küçük moleküllerin hem hastalığı tanımlamada hem de seyrini tahmin etmede ve doğru sınıflandırma yapılabilmesinde yardımcı olabileceği belirtilmektedir (20).

Kompleks bir glikoprotein olan kompleman C1q, otoimmünitenin önlenmesinde önemli olduğu düşünülen çeşitli immün düzenleyici işlevlere aracılık eder. Multipl skleroz hastalarında sıklıkla görülse de, C1q'nun demiyelinizasyon ve sinaps kaybını nasıl etkilediğinin kesin rolü ve mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır (21). Deneysel otoimmün ensefalomiyelit modelinde artmış kompleman ekspresyonunun ve glial birikiminin sinapsları fagositoza karşı savunmasız hale getirip getirmediğini değerlendirmek için Hammond ve ark. Western blot ve qPCR aracılığıyla hipokampustaki C1q protein ve mRNA düzeylerini analiz etmiştir. Kontrolle kıyasla C1q protein ekspresyonunda 2,5 kat artış bildirmişlerdir (22).

Bu çalışma, KİS, RRMS ve kontrol gruplarında kompleman sistem ile ilişkili genleri ve miRNA'ları tanımlamayı amaçlamaktadır. Sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında hem MS riskini hem de bu moleküllerin KİS ve RRMS hastalarını ayırt etmede biyobelirteç olarak potansiyellerini değerlendirmek ana hedeftir. Gen seçimi analizinde, Timirci-Kahraman ve ark.'nın proteomik verileri temel alınmıştır. Çalışmada RRMS ve KİS'in potansiyel belirleyicilerini tanımlamak için kütle spektrometresi kullanılmıştır (6). Sıvı kromatografi kütle spektrometresi ile tanımlandığı gibi, KİS ile kalan ve RRMS'e geçiş yapan hastalardan alınan beyin-omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde protein ekspresyonunda önemli ölçüde değişen genler üzerinde yolak analizi yapılmıştır. STRING analizi aracılığıyla C1QA'nın ağ açısından önemli bir gen olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada, literatürdeki sınırlı sayıda çalışmaya ek olarak, MS hastalarında C1QA ile ilişkili miR-335-5p'nin biyobelirteç olarak potansiyeli araştırılmıştır. Bu yaklaşım, çalışmamıza özgün bir boyut kazandırmıştır (6,18).

Kompleman aktivasyon belirteçlerinin hastalık aktivitesi ile korelasyon gösterip göstermediğini değerlendirmek için Håkansson ve ark., 41 hastanın (19 KİS, 22 RRMS) plazma ve BOS'unda C1q, C3, C3a ve sC5b-9 düzeylerini ölçmüş ve 22 sağlıklı kontrolle kıyaslamıştır. BOS-C1q düzeyleri kontrol

grubuna kıyasla hastalarda anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ($p\leq 0,01$) (1). Çalışma verilerimizin analizi, önceki araştırmalarla uyumlu olarak, KİS bireylerinde sağlıklı kontrollere kıyasla C1QA gen ekspresyonunda 2,3 kat istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur ($p=0,029$) (1,23,24). Tekrarlayan-düzelen MS hastaları ile sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında C1QA ekspresyonunda 1,35 kat artış görülmüştür, ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,107$). Tekrarlayan-düzelen MS grubunda C1QA ekspresyon seviyeleri, KİS grubuna göre ortalama 0,58 kat daha düşük bulunmuştur. Ancak yapılan istatistiksel analizler, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($p=0,167$). Örnek boyutunun artırılmasının bu ekspresyon düzeyindeki azalmayı değiştireceğini öngörüyoruz. Ayrıca çalışmamız, KİS grubunda kontrol grubuna kıyasla C1QA ekspresyonundaki istatistiksel olarak anlamlı artış, referans alınan proteomik çalışmanın bulgularını doğrulamaktadır (6).

Gao ve ark., RRMS hastalarında periferik kanda C1q ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre farklılaşp farklılaşmadığını inceleyerek C1q'nun RRMS'deki patojenik rolünü araştırmıştır. Çift antikorlu sandviç C1q-ELISA kiti kullanılarak, RRMS hastalarında anlamlı derecede daha yüksek C1q seviyeleri gözlemlenmiştir (25). İsveç'te gerçekleştirilen bir tez çalışması, MS, Guillain-Barré sendromu, diğer nörolojik hastalıklar ve kontrol grubundaki bireylerin plazma ve BOS'larında C1q, C4, C3, fH ve C3a kompleman protein düzeylerini karşılaştırmıştır. Çalışmada gruplar arasında plazma C1q seviyelerinde herhangi bir fark bulunmamıştır (26). Håkansson ve ark. da kontrol ve hasta grupları (KİS ve RRMS) arasında plazma seviyesinde C1q ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir (1). Bu çalışmada, ELISA yöntemi ile yapılan değerlendirmede, kontrol, KİS ve RRMS grupları arasında C1QA protein seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Güncel bir çalışma, kanda dolaşan spesifik miRNA'ların hem MS'in farklı evrelerini doğru bir şekilde sınıflandırmada hem de yenilikçi ve güçlü tedaviler için potansiyel hedefleri belirlemede umut vadettiğini ortaya koymaktadır (27).

Klinik izole sendromdan RRMS'e geçişte miRNA çalışmaları hakkındaki literatür incelendiğinde, miR-181c ve miR-150'ye odaklanıldığı görülmektedir. İlginç bir şekilde, miRTargetLink Human 2.0 veritabanından elde edilen homoloji üzerine veriler, C1QA ile miR-335-5p arasında potansiyel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (18). miR-335-5p dâhil birçok molekülün MS'de kritik düzenleyici roller oynayabileceği bilinmektedir (28,29).

Muñoz-San Martín ve ark., RRMS, SPMS spinal anestezi ve migren ile demans gibi diğer beyin hastalıkları olan kişilerin beyin omurilik sıvısında 215 farklı mikro RNA'nın seviyelerini araştırmıştır. Dikkate değer bir şekilde, analiz edilen miRNA'lardan biri olan miR-335-5p'nin beyin ve omurilik dokusunda daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğunu bulmuşlardır (16). Juwuk ve ark., EAE model farelerinin hem lomber motor hem de retinal nöronlarında hastalık başlangıcında ve ilerleyen aşamasında azalmış miR-335-5p ekspresyonu bildirmiştir (17). 2021 tarihli bir doktora tezi, farklı MS alt tiplerini kapsayan çalışma grubundan 40 MS hastası ve 10 sağlıklı kontrolenden kan örneklerini, bu genlerin varsayımsal düzenleyicileri olan spesifik HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 alellerinin ve miR-204-5p ve miR-335-5p'nin ekspresyon seviyeleri açısından analiz etmiştir. Kontrol ve MS grupları arasında gen alellerinde anlamlı bir fark tespit edilmezken, hasta grubunda kontrollere kıyasla miR-335-5p'de ekspresyonda artış gözlenmiştir (30). Bir başka çalışma, hem KİS hem de RRMS hastalarında artmış miR-335-5p seviyelerinin, erken teşhis ve hastalık takibi için bir biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır (27). Ek olarak, miR-335'in MS'in patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Multipl skleroz lezyonlarında değişkenlik gösteren bu miRNA'lar arasında, miR-335 ekspresyon seviyesinin normal görünen beyaz cevherde azaldığı bildirilmiştir (31).

Çalışmamızın en dikkat çekici ve istatistiksel olarak anlamlı bulgusu ($p=0,0196$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KİS hastalarında miR-335-5p düzeylerindeki 4,11 kat artıştır. Tekrarlayan-düzelen MS hastaları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 1,42 kat artış gösterirken, bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,196$). Ancak, KİS ve RRMS gruplarını karşılaştırırken, RRMS hastalarında miR-335-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı 0,34 kat azalma gözlemlendi ($p=0,04$). Bu farklı ekspresyon paternleri, miR-335-5p'nin KİS'ten RRMS'e geçişte potansiyel bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Daha önceki bulgular, C1QA ve miR-335-5p arasında potansiyel bir etkileşime işaret etse de, korelasyon analizlerimiz bu belirteçler veya herhangi bir grup karşılaştırmasında (KİS-kontrol, RRMS-kontrol ve KİS-RRMS; tüm $p > 0,05$) C1QA protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir ilişki tespit edemedi.

MS'deki miRNA'lar üzerine sayısız çalışmaya rağmen, tanı veya tedavi için tek bir miRNA yaygın olarak kabul görmemiştir. Farklı çalışmalar MS hasta örneklerinde C1QA düzeylerini incelemiş olsa da, bu çalışma özellikle KİS ve RRMS gruplarında miR-335-5p ekspresyonunu ve C1QA ile korelasyonunu araştırarak yeni bir alan açmaktadır. Kompleman sistemi ile ilişkili moleküller olan C1QA ve miR-335-5p'nin KİS, RRMS ve kontrol gruplarında incelenmesi, bu alana önemli bir katkı sağlamaktadır. Özellikle, KİS hastalarında kontrollere kıyasla artmış C1QA ekspresyonu bulgularımız, Håkansson ve ark.'nın 2020 yılı çalışmasıyla uyumlu olup, yaklaşımımızı doğrulamaktadır (1). Bu analiz, referans alınan proteomik çalışmada gözlemlenen yüksek C1QA ekspresyonunu doğrularak, çalışmamız bağlamında rolüne dair kanıtları güçlendirmektedir (6). Klinik izole sendrom ile karşılaştırıldığında RRMS hastalarında gözlenen C1QA ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, bu eğilimi doğrulamak ve potansiyel önemi tespit etmek için daha büyük bir çalışma grubunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, miRNA'lar MS'de biyobelirteç olarak muazzam bir potansiyele sahiptir ve bulgularımız bu potansiyelin altını bir kez daha çizmektedir. Çalışmamız, C1QA ve miR-335-5p'nin MS için aday biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Her iki belirteç de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KİS'de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterirken, miR-335-5p ayrıca KİS-RRMS karşılaştırmasında da anlamlılık göstererek hastalık progresyonunda potansiyel rolünü ortaya koymaktadır. Kontrol grubuna kıyasla KİS grubunda artmış miR-335-5p düzeyleri, hastalık progresyonundaki önemini işaret etmektedir. KİS'deki istatistiksel olarak anlamlı artış, özellikle erken MS'deki potansiyel rolünü göstermesi açısından heyecan vericidir. Kayda değer bir şekilde çalışmamız, RRMS'de KİS ile karşılaştırıldığında miR-335-5p'de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma da göstermektedir. Düşük örneklem büyüklüğü ve uzun geçiş dönemi göz önüne alındığında KİS ve RRMS için farklı bireysel örneklerin kullanılması gibi kısıtlamalar bu bulguya katkıda bulunabilirken, daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, C1QA ve miR-335-5p'nin biyobelirteç olarak potansiyeli umut vericidir. Gelecekteki çalışmalara rehberlik etmek ve MS'de prognostik belirteçler olarak geçerliliklerini kanıtlamak için, literatüre yeni kazandırılan sonuçlarımızın daha geniş kohortlarla yapılan kapsamlı klinik deneylerle doğrulanması gerekmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 05/11/2021 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunup, onaylanmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Detaylı çalışma muayene ve testleri hakkında bilgilendirme sağlandıktan sonra, tüm hastalardan veya yasal temsilcilerinden ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam formları alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir– AT, OTK; Tasarım– AT, OTK; Denetleme– OTK; Kaynaklar– OTK; Malzemeler– MK; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi– AT, ÇIK, TK, ZK, MK, EBU; Analiz ve/veya Yorum– AT, OTK; Literatür Taraması– AT, OTK, DB; Yazıyı Yazan– AT, OTK, DB; Eleştirel İnceleme– OTK.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu proje İstanbul Üniversitesi BAP Projesi (Proje no: TYL-2022-38372) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Håkansson I, Ernerudh J, Vrethem M, Dahle C, Ekdahl KN. Complement activation in cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome and early stages of relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020;340:577147. [Crossref]
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: insights from the Atlas of MS. *Mult Scler J*. 2020;26:1816–1821. [Crossref]
3. Atlas of MS. Statistics category: epidemiology, map view, 03.01.2022. <https://www.atlasofms.org/map/turkey/epidemiology/number-of-people-with-ms>
4. Li Z, Liu Y, Jia A, Cui Y, Feng J. Cerebrospinal fluid cells immune landscape in multiple sclerosis. *J Transl Med*. 2021;19:1–16. [Crossref]
5. Murgia F, Lorefice L, Poddighe S, Fenu G, Secci MA, Marrosu MG, et al. Multi-platform characterization of cerebrospinal fluid and serum metabolome of patients affected by relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis. *J Clin Med*. 2020;9:863. [Crossref]
6. Timirci-Kahraman O, Karaaslan Z, Tuzun E, Kurtuncu M, Baykal AT, Gunduz T, et al. Identification of candidate biomarkers in converting and non-converting clinically isolated syndrome by proteomics analysis of cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Belg*. 2019;119:101–111. [Crossref]
7. Tatomir A, Talpos-Caia A, Anselmo F, Kruszewski AM, Boodhoo D, Rus V, Rus H. The complement system as a biomarker of disease activity and response to treatment in multiple sclerosis. *Immunol Res*. 2017;65:1103–1109. [Crossref]
8. Ziabka K, Ziemka-Nalecz M, Pawelec P, Sypecka J, Zalewska T. Aberrant complement system activation in neurological disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22:4675. [Crossref]
9. Reid KB. Complement component C1q: historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Front Immunol*. 2018;9:764. [Crossref]
10. Morgan BP, Gommerman JL, Ramaglia V. An “outside-in” and “inside-out” consideration of complement in the multiple sclerosis brain: lessons from development and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2021;14:600656. [Crossref]
11. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, Van den Berg C, Vloet R, Yan R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;63:16–25. [Crossref]
12. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541:481–487. [Crossref]
13. Zailaie SA, Siddiqui JJ, Al Saadi RM, Anbari DM, S Alomari A, Cupler EJ. Serum based miRNA as a diagnostic biomarker for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Immunol Invest*. 2022;51:947–962. [Crossref]
14. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stähler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler*. 2014;20:295–303. [Crossref]
15. Ahlbrecht J, Martino F, Pul R, Skripuletz T, Sühs KW, Schauerte C, et al. Deregulation of microRNA-181c in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome is associated with early conversion to relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22:1202–1214. [Crossref]
16. Muñoz-San Martín M, Gomez I, Miguela A, Belchí O, Robles-Cedeño R, Quintana E, et al. Description of a CSF-enriched miRNA panel for the study of neurological diseases. *Life (Basel)* 2021;11:594. [Crossref]
17. Juwuk CA, Drake S, Lécuyer MA, Johnson RM, Morquette B, Zhang Y, et al. Neuronal microRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep*. 2018;8:13437. [Crossref]
18. miRTargetLink 2.0: Interaction graph. <https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/network/f79d1270-fdec-4d36-8475-77650f08df76>
19. Kern F, Aparicio-Puerta E, Li Y, Fehlmann T, Kehl T, Wagner V, et al. miRTargetLink 2.0-interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Research* 2021;49(W1):W409–W416. [Crossref]
19. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162–173. [Crossref]

20. Minutti-Zanella C, Bojalil-Álvarez L, García-Villaseñor E, López-Martínez B, Pérez-Turrent M, Murrieta-Álvarez I, et al. miRNAs in multiple sclerosis: a clinical approach. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;63:103835. [\[Crossref\]](#)
21. Ingram G, Hakobyan S, Robertson NP, Morgan, BP. Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker. *Clin Exp Immunol*. 2009;155:128–139. [\[Crossref\]](#)
22. Hammond JW, Bellizzi MJ, Ware C, Qiu WQ, Saminathan P, Li H, et al. Complement-dependent synapse loss and microgliosis in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Behav Immun*. 2020;87:739–750. [\[Crossref\]](#)
23. Saez Calveras N, Stuve O. The role of the complement system in multiple sclerosis: a review. *Front Immunol*. 2022;13:970486. [\[Crossref\]](#)
24. Lindblom RP, Aeinehband S, Ström M, Al Nimer F, Sandholm K, Khademi M, et al. Complement Receptor 2 is increased in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients and regulates C3 function. *Clin Immunol*. 2016;166:167:89–95. [\[Crossref\]](#)
25. Gao Z, Zhang C, Feng Z, Liu Z, Yang Y, Yang K, et al. C1q inhibits differentiation of oligodendrocyte progenitor cells via Wnt/ β -catenin signaling activation in a cuprizone-induced mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2022;348:113947. [\[Crossref\]](#)
26. Blomberg C. Intrathecal and systemic complement activation studies of multiple sclerosis and Guillan-Barré syndrome. Sweden: University of Kalmar; 2009. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:227200/FULLTEXT01.pdf>
27. Cuomo-Haymour N, Bergamini G, Russo G, Kulic L, Knuesel I, Martin R, et al. Differential expression of serum extracellular vesicle miRNAs in multiple sclerosis: disease-stage specificity and relevance to pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2022;23:1664. [\[Crossref\]](#)
28. Zhang S, Ma Y, Luo X, Xiao H, Cheng R, Jiang A, et al. Integrated analysis of immune infiltration and hub pyroptosis-related genes for multiple sclerosis. *J Inflamm Res*. 2023;16:4043–4059. [\[Crossref\]](#)
29. Shang Z, Sun W, Zhang M, Xu L, Jia X, Zhang R, et al. Identification of key genes associated with multiple sclerosis based on gene expression data from peripheral blood mononuclear cells. *Peer J*. 2020;8:e8357. [\[Crossref\]](#)
30. Nesbat Mohammadi N. Investigation of Micro-RNAs targeting HLA-DQB1 and HLA-DRB1 gene transcripts in different stages of multiple sclerosis pathogenesis [doctoral thesis]. Samsun: Ondokuz Mayıs University; 2021. <http://acikerisim.omu.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12712/33640/137604.pdf?sequence=1>
31. Teuber-Hanselmann S, Meinel E, Junker A. MicroRNAs in gray and white matter multiple sclerosis lesions: impact on pathophysiology. *J Pathol*. 2020;250:496–509. [\[Crossref\]](#)