

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Makale No: 74

Kuprizon Kaynaklı Sıçan Multipl Skleroz Modelinin Doğrulanmasında Rotarod Testleri ile Miyelin Bazik Proteini Arasındaki İlişki ve Bu Parametrelerin Diyet Çinko Durumuyla İlişkisi

Association Between Rotarod Tests and Myelin Basic Protein in the Confirmation of the Cuprizone-Induced Rat Multiple Sclerosis Model and the Relationship of These Parameters with Dietary Zinc Status

İSueda Ecem YILMAZ¹, İHaluk GÜMÜŞ², İSaltuk Buğra BALTACI³, İGözde ACAR⁴, İRasim MOĞULKOÇ⁴
İAbdulkerim Kasım BALTACI⁴

¹Rize Devlet Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

³İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁴Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE), insan enflamatuvar demiyelinizan hastalıklarının çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modellerden en sık kullanılanların başında kuprizon modeli gelmektedir. Kuprizon modeli toksik bir demiyelinizasyon modelidir. Bu deneysel modelde en önemli sorun hayvanlarda MS oluşumunun deneysel kanıtlarla gösterilmesidir. Kuprizonla indüklenmiş sıçan MS modellerinde hastalığın oluştuğunun gösterilmesinde iki test ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birincisi rotarod testidir. Rotarod testi son yıllarda sinir bilim alanında motor fonksiyon bozukluklarını göstermek için sıklıkla kullanılmaya başlanan bir deneysel testtir. İkincisi doku veya kan düzeyinde MBP düzeylerinin tayin edilmesidir. Bu çalışmanın amacı da, kuprizon ile indüklenmiş sıçan modelinde multipl sklerozun (MS) doğrulanmasında rotarod testlerinin ve Miyelin Temel Proteini (MBP) analizinin rolü, ayrıca bu parametrelerin diyetel çinko durumuyla ilişkisini araştırmaktır.

Yöntem: Araştırma protokolü lokal hayvan deneyleri etik kurul tarafından onaylandı. Kırk altı yetişkin erkek Wistar sıçanı beş gruba ayrıldı. Grup 1 ve

2'ye karboksimetilselüloz (CMC) çözeltisi verildi. Grup 3, 4 ve 5'te, sekiz hafta boyunca günlük olarak CMC çözeltisi içinde kuprizon (yem alımının %1'i) gavaj yoluyla verilerek MS indüklendi. Grup 4'e çinko eksikliği olan diyet uygulanırken, Grup 5'e günlük intraperitoneal çinko sülfat takviyesi yapıldı. Hayvanlarda MBP gen ekspresyonu, Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Sonuçlar, MS indüklenmiş sıçanların (Grup 3 ve 4) diğer gruplara göre anlamlı derecede daha kısa rotarod düşme süreleri ve daha yüksek korpus kallozum MBP gen ekspresyonu sergilediğini gösterdi ($p<0,05$). Özellikle, Grup 5'teki çinko takviyesinin bu etkileri tersine çevirdiği gözlemlendi ($p<0,05$).

Sonuç: Bu bulgular, sekiz haftalık kuprizon uygulamasının sıçanlarda MS benzeri bir durum indüklediğini ve çinko takviyesinin bu MS semptomlarını etkili bir şekilde hafiflettiğini doğrulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Çinko, korpus kallozum, kuprizon, multipl skleroz, miyelin temel proteini, rotarod testleri

ABSTRACT

Introduction: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is widely used for studies of human inflammatory demyelinating diseases. The cuprizone model is one of the most frequently used. The cuprizone model is a toxic demyelination model. The most significant challenge in this experimental model is demonstrating the development of MS in animals with experimental evidence. Two tests stand out in demonstrating the development of disease in cuprizone-induced rat MS models. The first is the Rotarod test. The Rotarod test is an experimental test that has become frequently used in recent years in the field of neuroscience to demonstrate motor function disorders. The second is the determination of MBP levels at the tissue or blood level. The aim of this study is to investigate the role of rotarod tests and myelin basic protein (MBP) analysis in confirming multiple sclerosis (MS) in a cuprizone-induced rat model, and also the relationship of these parameters with dietary zinc status.

Methods: In the study, approved by the ethics committee, forty-six adult male Wistar rats were divided into five groups. Groups 1 and 2 received Carboxy-

methyl-cellulose (CMC) solution. Multiple sclerosis was induced in Groups 3, 4, and 5 by daily gavage of cuprizone in CMC solution (1% of feed intake) for 8 weeks. Group 4 received a zinc-deficient diet, while Group 5 received daily intraperitoneal zinc sulfate supplementation. Myelin basic protein gene expression in animals was determined using Real-Time PCR.

Results: Results showed that MS-induced rats in Groups 3 and 4 exhibited significantly shorter rotarod fall times and higher corpus callosum MBP gene expression compared to other groups ($p<0.05$). Notably, zinc supplementation in Group 5 reversed these effects ($p<0.05$).

Conclusion: These findings confirm that 8 weeks of cuprizone administration induces an MS-like condition in rats, and zinc supplementation effectively ameliorates these MS symptoms.

Keywords: Corpus callosum, cuprizone, multiple sclerosis, myelin basic protein, rotarod tests, zinc

Cite this article as: Yılmaz SE, Gümüş H, Baltacı SB, Acar G, Moğulkoç R, Baltacı AK. Association Between Rotarod Tests and Myelin Basic Protein (MBP) in the Confirmation of the Cuprizone-Induced Rat Multiple Sclerosis (MS) Model and the Relationship of These Parameters with Dietary Zinc Status. Arch Neuropsychiatry 2026;63:468-473. doi: 10.29399/npa.29236

Öne Çıkan Noktalar

- Takviye almayan MS gruplarında rotarod performansı bozuldu.
- Takviye almayan MS gruplarında korpus kallosumdaki MBP ekspresyonu arttı.
- Böylece, MS modeli rotarod testi ve MBP mRNA analizi ile doğrulandı.
- Zn tedavisi, MS'te motor fonksiyon kaybını ve MBP gen ekspresyonlarını iyileştirdi.
- Çinko, deneysel MS tedavisinde önemli bir molekül olabilir.

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sistemine yönelik bağışıklık aracılı saldırılarla karakterize edilen otoimmün bir hastalıktır. Bu enflamatuvar süreç; motor kayıplar, görme bozuklukları, duyu veya denge bozuklukları gibi klinik semptomlarla sonuçlanan ilerleyici nörodejenerasyona yol açar (1). Bu nedenle, deneysel modeller kullanarak MS'i ve hastalıktan kaynaklanan sorunları araştırmaya yönelik ilgi giderek artmaktadır (1). Kuprizon (bis-sikloheksanon okzalidihidrazon) bir bakır şelatörüdür ve sistemdeki bakır iyonlarının tamamen işlevsiz hale gelmesine neden olur. Oral yolla veya diyetle uygulandığında kuprizon, merkezi sinir sistemi içindeki olgun oligodendrositleri spesifik olarak hedef alır (2). Bu uygulama, özellikle korpus kallosumda ve diğer çeşitli kortikal bölgelerde belirgin demiyelinizasyona ve oligodendrosit popülasyonlarında azalmaya yol açar (2). Sonuç olarak, kuprizon modeli deneysel multipl skleroz (MS) araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (3). Multipl sklerozun ağırlıklı olarak genç yetişkinleri etkilediği göz önüne alındığında, bu modeller tipik olarak genç yetişkin fare veya sıçanlar kullanılarak oluşturulur. Bu paradigmada, toksik bir madde olan kuprizonun alımı, temel olarak yaygın demiyelinizasyonla karakterize edilen ve MS'in klinik tablosunu yansıtan nöropatolojik bulgulara yol açar (2,3). Kuprizon maruziyetinin kesilmesini takiben kendiliğinden remiyelinizasyon gerçekleşir. Böylece, kuprizon kaynaklı MS modeli araştırmacılara hem hedeflenmiş demiyelinizasyonu tetiklemek hem de sonrasındaki remiyelinizasyon süreçlerini sistematik olarak gözlemek için kritik bir platform sağlar (2-4).

Bu deneysel modeldeki en önemli sorun, hayvanlarda MS oluşumunun deneysel kanıtlarla gösterilmesidir. Kuprizon kaynaklı sıçan MS modellerinde hastalığın oluştuğunu göstermede iki test öne çıkmaktadır. Bunlardan birincisi rotarod testidir. Rotarod testi, yaklaşık on beş yıldır nörobilim alanında motor fonksiyon bozukluklarını göstermek amacıyla sıklıkla kullanılan deneysel bir testtir (5). İkincisi ise doku veya kan düzeyinde Miyelin Temel Protein (MBP) seviyelerinin belirlenmesidir (6).

Çinko; vücuttaki katalitik, yapısal ve düzenleyici olmak üzere üç temel fizyolojik fonksiyonla yakından ilişkilidir. Bu nedenle çinko, vücudun normal büyümesi ve fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesi için vazgeçilmez bir mikrobeseindir (7). Beyin fonksiyonlarında da kritik bir element olan çinkonun eksikliği; MS dâhil nörodejeneratif hastalıklar ve bozulmuş bilişsel performans ile yakından ilişkilidir (7,8). Biyolojik sıvılardaki çinko düzenlemesinin, MS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde bozulduğu bildirilmiştir (9,10). Bu nedenle MS ve çinko arasındaki ilişkinin araştırılmasına yönelik ilginin arttığı söylenebilir. Ayrıca beyindeki çinkonun sinaptik iletim, felç, farklılaşma ve proliferasyonda (çoğalma) önemli roller oynadığı giderek daha fazla kabul görmektedir (11). Bir rapor, beyin gelişimi ve nörolojik hastalıklar için kritik bir mikrobesein olan çinkonun etkilerini vurgulamakta;

özellikle beyaz cevher bozuklukları, oligodendrosit hasar mekanizmaları ve miyelinizasyon süreçlerindeki henüz keşfedilmemiş rolüne odaklanmaktadır (12). Benzer şekilde, başka bir rapor oligodendrositlerin merkezi sinir sistemi çinko homeostazi araştırmalarında benzersiz bir model olarak kullanılabilirliğini ileri sürmekte; dahası, gelişim sırasındaki çinko düzenlemesinin hücre farklılaşması üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır (13).

Yukarıda açıklanan bilgilere dayanan bu çalışmanın iki ana amacı vardır:

1. Sekiz hafta boyunca kuprizon uygulanarak MS indüklenen sıçanlarda, deneysel MS oluşumunu göstermek amacıyla rotarod testi ve korpus kallosumdaki MBP gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesini kullanmak. Bu iki testin birlikte uygulanması, deneysel MS modelini kullanan araştırmacıların gelecekteki çalışmaları için teşvik edici olabilir.
2. Multipl skleroz patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülen çinkonun diyetteki durumunun yanı sıra beyin fonksiyonlarındaki rolü ile MS arasındaki olası ilişkilere dikkat çekmektir.

YÖNTEM

Etik

Tüm deneysel prosedürler, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay Kodu: 17; Onay Tarihi: 2021).

Hayvanlar

Çalışmada kullanılan yetişkin erkek Wistar sıçanlar (n=46), Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (SUDAM) temin edilmiştir. Tüm deneysel prosedürler aynı merkezin hayvan etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hayvanlar toplam 5 gruba ayrılmıştır (Grup 1: n=6, diğer dört grup n=10).

- **Grup 1:** Kontrol
- **Grup 2:** Sham multipl skleroz
- **Grup 3:** Multipl skleroz
- **Grup 4:** Multipl skleroz + çinko eksikliği
- **Grup 5:** Multipl skleroz + çinko takviyesi

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'teki hayvanlara sekiz hafta boyunca standart sıçan yemi verilmiştir.

Grup 2'deki hayvanlara ayrıca sekiz hafta boyunca günlük gavaj (mide sondası) yoluyla kuprizon çözücü (solvent) verilmiştir.

Prosedürler

Kuprizon aşağıda açıklandığı şekilde hazırlanmıştır:

Kuprizon, saf suyun %1 konsantrasyonu ile günlük yem alımının %1'i oranında (0,66 g/kg) hazırlanmıştır.

Ek olarak, Grup 4'teki hayvanlar çinkodan fakir diyetle (50 µg/kg çinko) beslenmiştir.

Grup 5'teki hayvanlara ise intraperitoneal (i.p.) çinko sülfat takviyesi (5 mg/kg/gün) uygulanmıştır.

Rotarod Testi

Rotarod testleri SUDAM hayvan laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, motor koordinasyon ve dengeyi değerlendirmek amacıyla otomatik hızlanan May rotarod cihazı (Commat Ltd, Ankara/Türkiye) kullanılmıştır. Düzenek; tutunmayı sağlamak için uygun şekilde işlenmiş 7 cm çapında, 30 cm yüksekliğinde bir silindiri ve silindiri döndürmek için

bir güç kaynağından oluşmaktadır. Beş dairesel bölme, çubuğu dört eşit boyutlu kompartımana (her biri 7 cm uzunluğunda) ayırır.

Siçanlara, cihazı keşfetmelerine ve alışmalarına yardımcı olmak amacıyla değerlendirme gününden 3 gün önce alışma eğitimi verilmiştir. Her gün, dakikada 4 devir (rpm) ile başlayıp maksimum 20 rpm'ye hızlanacak şekilde, deneme başına maksimum 300 saniye cihaz üzerinde kalmalarına izin verilmiştir. Eğer vaktinden önce düşerlerse, maksimum 3 kez tekrar cihaza yerleştirilmişler ve hızlanma her seferinde dört rpm'den başlatılmıştır. Her hayvanın 3 kez hata yapmasına izin verilmiştir. Alıştırma denemeleri, başarılı olanlar 300 saniyeyi tamamladıktan sonra sonlandırılmıştır. Hayvanların rotarod performansları, alıştırma denemelerinden sonraki 4. güne denk gelen kuprizon uygulamasının son gününde kaydedilmiştir. Dört rpm'den başlayarak, süreden bağımsız olarak hayvanların ulaşabildiği maksimum rpm değeri kaydedilmiştir.

Hayvanlardan Doku Örneklerinin Alınması

Sekiz hafta boyunca günlük olarak izlenen ve tedavileri tamamlanan hayvanlar, tedavinin son gününden 24 saat sonra sakrifiye edilmiş ve korpus kallozum doku örnekleri alınmıştır. Hayvanların acı çekmesini önlemek amacıyla, işlemler genel anestezi altında (intraperitoneal olarak 75 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin kombinasyonu) gerçekleştirilmiştir. Sakrifikasyon sonrası siçanların beyinleri hızla çıkarılmış ve kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Dondurulan beyin dokusu Eppendorf tüplerine yerleştirilmiş ve örnekler üzerinde çalışılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

RNA İzolasyonu

Korpus kallozum dokularından toplam RNA ve miRNA izolasyonu, ticari kit protokollerine (Biyo Basic, Kanada; miRNAExtractor) göre yapılmıştır. Dokular, mekanik bir homojenizatör (SONOPULS mini20, BANDELIN, Almanya) kullanılarak 1 ml lizis tamponu (lysis buffer) içinde lize edilmiş; kloroform faz ayrımı ve etanol çöktürme adımlarını takiben spin kolon teknolojisi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinin kantitatif ve saflık analizleri spektrofotometrik olarak (SMA 1000, Merinton, Çin) gerçekleştirilmiştir; OD 260/280 oranı 1,9 ve üzerinde olan yüksek kaliteli örnekler, ileri işlemler için -20°C'de saklanmıştır.

cDNA Sentezi

mRNA ekspresyon analizi için toplam RNA örneklerinden cDNA, üretici talimatlarına göre (5 dakika 25°C, 20 dakika 46°C ve bir dakika 95°C)

termal döngü cihazında (Bio-Rad, ABD) iScript cDNA sentez kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Sentezlenen cDNA'ların saflık kontrolleri yapıldıktan sonra Real-Time PCR analizine kadar -20°C'de saklanmıştır.

Real-Time PCR (qPCR) Analizi MBP mRNA ekspresyon seviyeleri, spesifik primerler (Oligomer, Türkiye) kullanılarak belirlenmiştir. Kantifikasyon öncesinde, kontrol grubu örneklerinden hazırlanan seri dilüsyonlar (1/1 ile 1/32 arası) kullanılarak standart eğriler oluşturulmuş ve yöntemin standardizasyonunu sağlamak için primer bağlanma sıcaklıkları optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda her örnek için yaklaşık 50 ng cDNA kullanılmıştır.

Miyelin temel proteini gen ekspresyonu, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Fizyoloji Laboratuvarı'nda Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmiştir (Tablo 1). qPCR analizi, Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (14).

İstatistiksel Yöntemler

Hem Rotarod testi hem de MBP gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel yorumlanması için bilgisayar paket programı (IBM Sosyal Bilimlerde İstatistik Paket Programı (SPSS) sürüm 26.0) kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Verilerin homojenliği için "Shapiro-Wilk" testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farkları belirlemek için "Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)" testi; farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için ise "Duncan" testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Rotarod testi; fare ve siçanların hızlanan bir çubuk üzerinde kalma ve koşma becerilerini ölçerek, hayvanların motor koordinasyon ve öğrenme yeteneklerini araştırmak için kullanılan standart bir sensörimotor testtir. Çalışmamızda hayvanlar çubuk üzerinde kaldıkları süre açısından değerlendirildiğinde; MS grubu (Grup 3) ve çinko eksikliği olan MS grubundaki (Grup 4) hayvanların, diğer gruplara kıyasla daha kısa sürede çubuktan düştüğü görülmüştür ($p < 0,05$). Çinko takviyesi alan MS grubundaki (Grup 5) hayvanlar, MS indüklenen Grup 3 ve 4'teki hayvanlara göre çubuk üzerinde daha uzun süre kalmıştır ($p < 0,05$). Kontrol gruplarındaki hayvanlar (Grup 1 ve 2) ise diğer tüm gruplardaki hayvanlardan daha uzun süre çubuk üzerinde kalmıştır ($p < 0,05$; Tablo 2, Şekil 1).

Deneyel bir MS modelinde kuprizon, spesifik olarak oligodendrositleri hedefler ve korpus kallozumda demiyelinizasyona neden olur. Oligodendrositlerin miyelin kılıf yüzeylerinin en dış tabakasında bol miktarda bulunan MBP'nin, bağışıklık yanıtlarını destekleyebilen kritik otoantijenlerden biri olduğu ve otoimmün yanıtlarla da ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür.

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

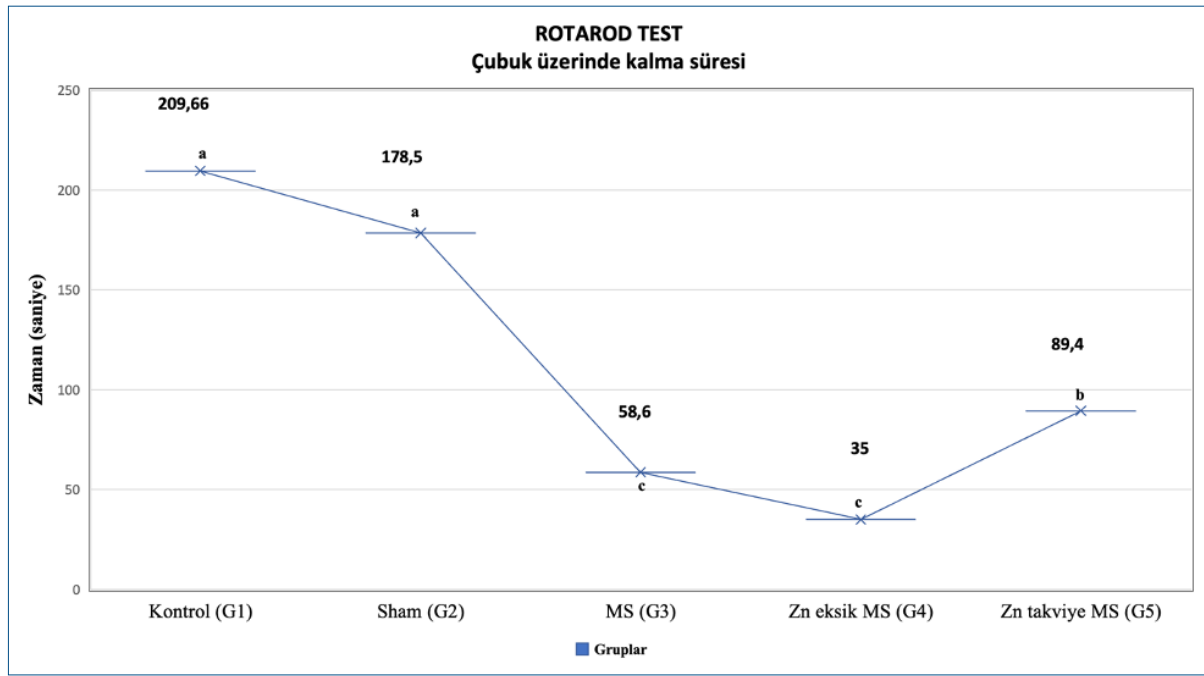
Gen	Primer dizisi (5'-3')	İşlev
MBP ileri	CTTCAAGACAGGCCCTCAG	Hedef gen
MBP geri	CCTGTCACCGCTAAGAAGC	Hedef gen

MBP: miyelin temel proteini.

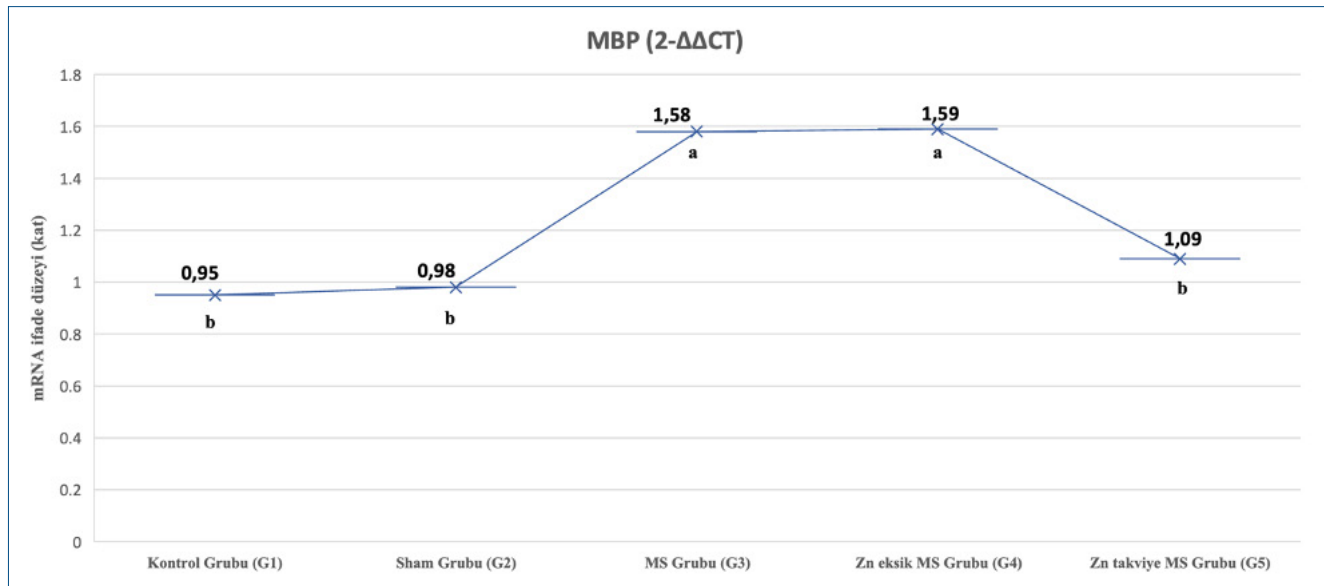
Tablo 2. Çalışma gruplarının Rotarod testi ve korpus kallozum miyelin temel proteini (MBP) gen ifade düzeyleri

Gruplar	ROTAROD TESTİ Çubuk üzerinde kalınan süre "saniye" Ort ± SS	MBP (2 ^{-ΔΔCT}) Ort ± SS
Kontrol grubu (G1)	209,66±50,06a	0,95±0,13b
Sham grubu (G2)	178,50±87,44a	0,98±0,09b
MS grubu (G3)	58,60±23,66c	1,58±0,13a
Çinko eksikliği olan MS grubu (G4)	35,00±16,61c	1,59±0,09a
Çinko takviyeli MS grubu (G5)	89,40±50,83b	1,09±0,16b

a > b > c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$). MS: multipl skleroz; MBP: miyelin temel proteini; Zn: çinko. P-Değerleri, ROTAROD: G1-G2=1,000, G1-G3=0,795, G1-G4=0,018, G1-G5=0,990, G2-G3=0,769, G2-G4=0,047, G2-G5=0,962, G3-G4=0,755, G3-G5=0,366, G4-G5=0,032 P-Değerleri, MBP: G1-G2=0,990 G1-G3=0,000, G1-G4=0,000, G1-G5=0,260, G2-G3=0,000, G2-G4=0,000, G2-G5=0,368, G3-G4=1,000 G3-G5=0,000, G4-G5=0,000



Şekil 1. Çalışma gruplarının Rotarod testi sonuçları. a > b > c: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0,05).



Şekil 2. Çalışma gruplarının korpus kallosum dokusundaki miyelin temel proteini (MBP) gen ifade düzeyleri. a > b > c: farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0,05).

Çalışmamızda, korpus kallosumdaki en yüksek MBP gen ekspresyon seviyeleri; MS'le indüklenen ve çinkodan fakir diyetle beslenen Grup 4 hayvanları ile MS'le indüklenen ve standart sıçan yemiyle beslenen Grup 3 hayvanlarında elde edilmiştir (p<0,05). Çinko takviyesi, MS'le indüklenen Grup 5 hayvanlarındaki miyelin temel protein gen ekspresyon seviyelerini Grup 3 ve 4'e kıyasla anlamlı ölçüde azaltarak kontrol değerlerine (Grup 1 ve 2) yaklaştırmıştır (p<0,05; Tablo 2, Şekil 2).

TARTIŞMA

Rotarod Performans Testi Bulgularının Tartışılması

Rotarod testi; fare ve sıçanların hızlanan bir çubuk üzerinde kalma ve koşma becerilerini ölçerek, hayvanların motor koordinasyon ve öğrenme yeteneklerini araştırmak için kullanılan standart bir sensörimotor testtir (15). Rotarod testi, kemirgenlerde motor koordinasyonu ölçmek amacıyla

ilk kez 1957 yılında kullanılmıştır (16). Bu testler daha sonra, çeşitli maddelerle muamele edilen deneysel sıçan modellerinde hem motor performansını hem de öğrenme becerilerini ölçmek için kullanılmıştır (17). Rotarod testi, günümüzde en sık kullanılan motor ve bilişsel fonksiyon testlerinden biri haline gelmiştir (15,17).

Çalışmamızda hayvanlar Rotarod testleri (çubukta kalma süresi) açısından karşılaştırıldığında; MS grubu (Grup 3) ile çinkodan fakir diyetle beslenen MS grubundaki (Grup 4) hayvanların, diğer gruplara göre daha kısa sürede çubuktan düştüğü görülmüştür. Bu bulgu, deneysel MS modeli olarak oluşturulan Grup 3 ve Grup 4 hayvanlarının, çinko takviyesi alan Grup 5 ve kontrol grubu hayvanlarına göre daha zayıf motor koordinasyona sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, çinkodan fakir diyetle beslenen MS grubundaki (Grup 4) hayvanların rotarod performans testi sonuçları, kuprizon kaynaklı MS grubuna (Grup 3) göre sayısal olarak

daha düşük olsa da bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun, hayvanların rotarod testlerindeki bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Rotarod testi, kuprizon kaynaklı sıçan MS modellerinde motor disfonksiyonu göstermek için en çok tercih edilen testlerden biridir (17). Han ve ark. (18), kuprizon kaynaklı demiyelinizasyon fare modelinde motor fonksiyon kaybını belirlemek için rotarod testini uygulamış ve tedavi almayan kuprizonlu hayvanların kısa sürede çubuktan düştüğünü ve motor fonksiyonlarda bozulma sergilediğini göstermiştir. Kuprizon kaynaklı fare MS modelinde zenginleştirilmiş çevrenin MS üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, zenginleştirilmiş çevreye maruz kalmayan hayvanların rotarod performansının daha zayıf olduğu, yani çubuktan daha kısa sürede düştükleri gösterilmiştir (19). Sonuç olarak rotarod performansı, deneysel MS modellerinde motor fonksiyonların belirlenmesinde güvenilir bir test olarak uygulanmaktadır (20,21). Çalışmamızda, çinko takviyesi almayan MS gruplarının (Grup 3 ve 4) rotarod performanslarının diğer gruplara göre anlamlı ölçüde azaldığı ve bunun motor fonksiyonlarda bozulmaya işaret ettiği gözlemlenmiştir. Mevcut çalışmada elde ettiğimiz bu bulgu, kuprizon uygulamasının sıçanlarda MS'e yol açtığına dair önemli bir kanıttır.

Çalışmamızda bu parametreye ilişkin en önemli bulgu, çinko takviyesi alan Grup 5 MS hayvanlarının rotarod performansının, takviye almayan MS gruplarından (Grup 3 ve 4) daha iyi olmasıdır. Çinko takviyesine ilişkin elde ettiğimiz bu bulgu, çinkonun MS hastalığında meydana gelen motor fonksiyon bozulmalarını önleyebileceğini göstermektedir. Med-Line taramalarımızda, diyetteki çinko durumunun MS hastalığında motor fonksiyonları nasıl etkilediğini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kuprizon kaynaklı sıçan MS modelinde çinko takviyesinin motor fonksiyonlardaki bozulmayı önleyebileceğini gösteren bulgumuz, MS ve çinko arasındaki ilişkiyi inceleyecek gelecek çalışmalar için bir rehber olabilir.

Korpus Kallozum Dokusunda MBP Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tartışılması

Multipl skleroz; enflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterize edilen otoimmün bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Multipl skleroz durumunda bağışıklık sistemi, sinir lifini koruyan miyelin kılıfına saldırarak demiyelinizasyona yol açar (22). Oligodendrositlerin miyelin kılıf yüzeylerinin en dış tabakasında bol miktarda bulunan MBP'nin, hem bağışıklık yanıtını destekleyebilen hem de otoimmün olaylarla ilişkili olabilen kritik otoantijenlerden biri olduğu ileri sürülmüştür (23). Hastalık aktivitesi sırasında MS hastalarında yüksek MBP ekspresyonu tanımlanmıştır (23). Bu nedenle, MBP ekspresyonundaki artışın MS hastalığında güvenilir bir belirteç olabileceği kaydedilmiştir (24). Mevcut çalışmada, çinko takviyesi almayan MS gruplarının (Grup 3 ve 4) korpus kallozumundaki MBP gen ekspresyon seviyeleri, diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tian ve ark. (6) yaptıkları çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MS hastalarında hem BOS (Beyin Omurilik Sıvısı) hem de serum MBP seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, söz konusu çalışmalarında BOS ve serum MBP seviyelerinin değerlendirilmesinin MS hastalığının doğru teşhisini mümkün kılabileceğini de ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle, hem BOS hem de serum MBP seviyelerinin belirlenmesinin MS teşhisi için kritik bir belirteç olabileceğini önermişlerdir (6). Benzer şekilde Agliardi ve ark. (25), MS hastalarında MBP seviyelerinin yüksek olduğunu göz önünde bulundurarak, MBP konsantrasyonunu ölçen minimal invaziv bir kan testinin MS teşhisini kolaylaştırabilecek gelecek vaat eden bir araç olabileceğini bildirmişlerdir (25).

Çalışmamızda, çinko takviyesi almayan MS gruplarında (Grup 3 ve 4) korpus kallozumdaki artmış MBP gen ekspresyon seviyeleri, kuprizon uygulamasının MS'e neden olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda vurgulanması gereken en kritik nokta, çinko takviyesi alan MS grubundaki (Grup 5) MBP gen ekspresyon seviyelerinin, takviye almayan MS gruplarından (Grup 3 ve 4) daha düşük olmasıdır. Yine, çinko takviyesi alan MS grubunun (Grup 5) MBP gen ekspresyon seviyeleri, Grup 1 (Kontrol) ve Grup 2 (Sham) ile farklılık göstermemiştir. Elde ettiğimiz bu bulgu oldukça kritiktir; çünkü diyetteki çinko durumunun MS hastalığında korpus kallozumdaki MBP gen ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediğini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çinkonun motor fonksiyonların yanı sıra sinaptik iletim ve nöroenflamasyonun baskılanması gibi önemli olaylarda kritik bir rol oynadığı göz önüne alındığında, bulgumuz çinko-MS ilişkisinde can alıcı bir sonuçtur (26). Mevcut çalışma, diyetteki çinko durumunun MS hastalığındaki MBP gen ekspresyon seviyeleri ile ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmamızda, korpus kallozumdaki MBP gen ekspresyonunu sadece deneysel MS modelinin bir belirteci olarak belirledik. Ayrıca, çinko takviyesi alan MS'li hayvanlarda korpus kallozumdaki MBP gen ekspresyonunun azalmasını, çinkonun baskılayıcı etkisinden ziyade düzenleyici etkisinin bir sonucu olarak değerlendirdik.

Çalışmamızın sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde: Bozulmuş Rotarod testleri ve korpus kallozumda artan MBP gen ekspresyonu, kuprizon uygulamasının deneysel MS'e neden olduğunu göstermektedir. Çinko takviyesi, MS sıçan modelinde yukarıda belirtilen semptomları tersine çevirmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, sıçanlarda deneysel MS modelinin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla rotarod testi ve korpus kallozumda MBP gen ekspresyon analizi uygulanmıştır. Çinko takviyesi almayan MS gruplarının (Grup 3 ve 4) rotarod performansları anlamlı derecede baskılanırken; yine takviye almayan MS gruplarının (Grup 3 ve 4) korpus kallozumundaki MBP gen ekspresyonları diğer tüm gruplardan daha yüksek bulunmuştur.

Bu bulgular, çalışmamızda kuprizon kaynaklı MS modelinin başarıyla uygulandığını göstermektedir.

• Çinko takviyesi (Grup 5), takviye almayan gruplara (Grup 3 ve 4) kıyasla motor fonksiyon kaybını iyileştirmiştir.

• Takviye almayan gruplarda (Grup 3 ve 4) korpus kallozumda artan MBP gen ekspresyonları, çinko takviyesi (Grup 5) ile kontrol değerlerine ulaşmıştır.

Çalışmamızın bir sonucu olarak; takviye almayan MS gruplarında (Grup 3 ve 4) gözlenen motor fonksiyon kaybı ve korpus kallozumdaki artmış MBP gen ekspresyonu değişiklikleri, çinko takviyesi ile ortadan kaldırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, çinkonun deneysel MS modellerinde önemli bir molekül olabileceğine işaret etmektedir.

Kısıtlılıklar

Bu çalışmada, korpus kallozum dokusundaki demiyelinizasyonun Luxol Fast Blue gibi yöntemlerle doğrulanması gerçekleştirilememiştir. Ayrıca, MBP'nin ve Olig2 gibi oligodendrositlerin immünohistokimyasal boyamaları yapılamamıştır. Gelecekteki çalışmalarda bu parametrelerin belirlenmesi, bize daha özgün bilgiler sağlayabilir.

Etik Komite Onayı: Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Onay Kodu: 17, Onay Tarihi: 2021).

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- HG, AKB, SBB; Tasarım- AKB, SBB, GA; Denetleme- HG, AKB; Kaynaklar- HG, AKB; Malzemeler- SBB, GA, SEY; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- SBB, GA, SEY; Analiz ve/veya Yorum- HG, AKB, RM; Literatür Taraması- HG, AKB, SEY; Yazıyı Yazan- HG, AKB, SEY; Eleştirel İnceleme- HG, AKB, RM.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (SUBAPK; Proje numarası: 21122029) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Shahidi SH, Kordi MR, Rajabi H, Malm C, Shah F, Quchan ASK. Exercise modulates the levels of growth inhibitor genes before and after multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;341:577172. [\[Crossref\]](#)
- Abdel-Maged AE, Gad AM, Rashed LA, Azab SS, Mohamed EA, Awad AS. Repurposing of secukinumab as neuroprotective in cuprizone-induced multiple sclerosis experimental model via inhibition of oxidative, inflammatory, and neurodegenerative signaling. *Mol Neurobiol.* 2020;57:3291–3306. [\[Crossref\]](#)
- Basoglu H, Boylu NT, Kose H. Cuprizone-induced demyelination in Wistar rats; electrophysiological and histological assessment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:2711–2717.
- Martinez B, Peplow PV. Protective effects of pharmacological therapies in animal models of multiple sclerosis: a review of studies 2014–2019. *Neural Regen Res.* 2020;15:1220–1234. [\[Crossref\]](#)
- van den Berg R, Laman JD, van Meurs M, Hintzen RQ, Hoogenraad CC. Rotarod motor performance and advanced spinal cord lesion image analysis refine assessment of neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Methods.* 2016;262:66–76. [\[Crossref\]](#)
- Tian ZJ, Zhao XX, Li ZH, Zhang F, Cao FT, Li SM, et al. Evaluation of myelin basic protein levels with receiver operating characteristic curves for diagnosis of multiple sclerosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2009;29:250–252.
- Bredholt M, Frederiksen JL. Zinc in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *ASN Neuro.* 2016;8. [\[Crossref\]](#)
- Elitt CM, Fahrni CJ, Rosenberg PA. Zinc homeostasis and zinc signaling in white matter development and injury. *Neurosci Lett.* 2019;707:134247. [\[Crossref\]](#)
- Choi BY, Jung JW, Suh SW. The emerging role of zinc in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18. [\[Crossref\]](#)
- Nirooei E, Kashani SMA, Owrangi S, Malekpour F, Niknam M, Moazzen F, et al. Blood trace element status in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200:13–26. [\[Crossref\]](#)
- Choi BY, Kim IY, Kim JH, Kho AR, Lee SH, Lee BE, et al. Zinc transporter 3(ZnT3) gene deletion reduces spinal cord white matter damage and motor deficits in a murine MOG-induced multiple sclerosis model. *Neurobiol Dis.* 2016;94:205–212. [\[Crossref\]](#)
- Liu S, Wang N, Long Y, Wu Z, Zhou S. Zinc homeostasis: an emerging therapeutic target for neuroinflammation related diseases. *Biomolecules.* 2023;13:416. [\[Crossref\]](#)
- Elitt CM, Ross MM, Wang J, Fahrni CJ, Rosenberg PA. Developmental regulation of zinc homeostasis in differentiating oligodendrocytes. *Neurosci Lett.* 2024;831;137727. [\[Crossref\]](#)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods.* 2001;25:402–408. [\[Crossref\]](#)
- Tashakori A, Hassanpour S, Vazir B. Protective effect of crocin on cuprizone-induced model of multiple sclerosis in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023;396:1713–1725. [\[Crossref\]](#)
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46:208–209. [\[Crossref\]](#)
- Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor behavioral deficits in the cuprizone model: validity of the Rotarod Test Paradigm. *Int J Mol Sci.* 2022;23. [\[Crossref\]](#)
- Han SR, Kang YH, Jeon H, Lee S, Park SJ, Song DY, et al. Differential expression of miRNAs and behavioral change in the cuprizone-induced demyelination mouse model. *Int J Mol Sci.* 2020;21. [\[Crossref\]](#)
- Mohamed A, Al-Kafaji G, Almahroos A, Almosawi Z, Alalwan H, Abdulla R, et al. Effects of enhanced environment and induced depression on cuprizone mouse model of demyelination. *Exp Ther Med.* 2019;18:566–572. [\[Crossref\]](#)
- Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol Lett.* 2007;169:205–213. [\[Crossref\]](#)
- Moore SM, Khalaj AJ, Kumar S, Winchester Z, Yoon J, Yoo T, et al. Multiple functional therapeutic effects of the estrogen receptor beta agonist indazole-Cl in a mouse model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:18061–18066. [\[Crossref\]](#)
- Ganesan A, Muralidharan P, Ramya LN. The fulcrum of demyelination in multiple sclerosis. *Curr Protein Pept Sci.* 2023;24:579–588. [\[Crossref\]](#)
- Gutierrez-Fernandez M, de la Cuesta F, Tallon A, Cuesta I, Fernandez-Fournier M, Laso-Garcia F, et al. Potential roles of extracellular vesicles as biomarkers and a novel treatment approach in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22. [\[Crossref\]](#)
- Torres Iglesias G, Fernandez-Fournier M, Botella L, Piniella D, Laso-Garcia F, Carmen Gomez-de Frutos M, et al. Brain and immune system-derived extracellular vesicles mediate regulation of complement system, extracellular matrix remodeling, brain repair and antigen tolerance in multiple sclerosis. *Brain Behav Immun.* 2023;113:44–55. [\[Crossref\]](#)
- Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, Bolognesi E, Picciolini S, Caputo D, et al. Myelin basic protein in oligodendrocyte-derived extracellular vesicles as a diagnostic and prognostic biomarker in multiple sclerosis: a pilot study. *Int J Mol Sci.* 2023;24. [\[Crossref\]](#)
- Sun R, Wang J, Feng J, Cao B. Zinc in Cognitive impairment and aging. *Biomolecules.* 2022;12:1000. [\[Crossref\]](#)