



Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın Relapsing Remitting Multipl Skleroz Gelişimi ile İlişkilerinin Araştırılması

Program Kodu: 1002

Proje No: 223S830

Proje Yürütücüsü:
Dr. Öğr. Üyesi Furkan SARIDAŞ

Araştırmacılar

Uzm. Dr. Birnur AYDİN

Doç. Dr. Rıfat ÖZPAR

Doç. Dr. Emine Rabia KOÇ

Prof. Dr. Bahattin HAKYEMEZ

Prof. Dr. Tülin ALKAN

Prof. Dr. Ömer Faruk TURAN

MART 2025
BURSA

ÖNSÖZ

Bu raporda, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenen 223S830 numaralı proje çalışmasından elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji, Radyoloji ve Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen bu proje çalışmasında Multiple skleroz hastalarında kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde, hücre dışı sinyal proteinleri olan semaforin düzeyleri araştırılarak klinik ve radyolojik bulgular ile ilişkisi incelendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların nörolojik muayene bulguları, EDSS skorları ve nöropsikometrik test sonuçları kaydedildi. Hastaların manyetik rezonans görüntülemelerinde lezyon sayıları ve lokalizasyonları ve atrofi düzeyi incelendi. Hastalardan alınan kan ve BOS örnekleri ile sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinden semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A düzeyleri Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile araştırıldı.

Projenin gerçekleşmesine katkılarından dolayı TÜBİTAK-SBAG'a ve Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Ofisine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	6
3.1. Hasta seçimi ve kontrol grubunun oluşturulması.....	6
3.2. Demografik, klinik ve radyolojik değerlendirme	7
3.3. Biyolojik örneklerin toplanması	7
3.4. Semaforin ekspresyon analizlerinin Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile gösterilmesi	8
3.5. İstatistiksel yöntemler	8
4.BULGULAR.....	9
4.1. Demografik, Klinik ve Radyolojik özellikler	9
4.2. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın demografik özellikler ile farklılıkları.....	9
4.3. Semaforinlerin serum ve BOS düzeyleri arasındaki korelasyon analizi	13
4.4. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile farklılıkları.....	13
4.5. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın RRMS ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki farklılıkları ve tanısal değeri	16
5.TARTIŞMA	19
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	22
7.KAYNAKLAR.....	22

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1. RRMS hastalarının beyin omurilik sıvılarından elde edilen semaforin düzeyleri.	15
Şekil 2. RRMS hastalarının beyin omurilik sıvılarından elde edilen semaforin düzeyleri.	16
Şekil 3. RRMS ve kontrol grubu arasında serum semaforin düzeyi farklılıkları.	17
Şekil 4. Serum semaforinlerin tanısasal biyobelirteç potansiyel analizleri.	18

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1. RRMS hastalarının klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikleri.	10
Tablo 2. Serum semaforin düzeylerinin MS ve kontrol grubunda cinsiyetlere göre karşılaştırılması.	11
Tablo 3. BOS semaforin düzeylerinin MS hastalarında cinsiyetlere göre karşılaştırılması.	11
Tablo 4. Serum semaforin düzeylerinin MS ve kontrol grubunda yaşa göre karşılaştırılması.	12
Tablo 5. BOS semaforin düzeylerinin MS grubunda yaşa göre karşılaştırılması.	12
Tablo 6. Serum ve BOS semaforin düzeylerinin korelasyon analizi.	13
Tablo 7. Klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile semaforin düzeylerinin korelasyon analizi.	14
Tablo 8. Klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile semaforin düzey farklılıkları.	15
Tablo 9. İstatiksel olarak anlamlı saptanan laboratuvar ve radyolojik özelliklerin tanımlayıcı verileri.	16
Tablo 10. RRMS ve kontrol grubu arasında serum semaforin düzeyi farklılıkları	17

ÖZET

Multipl skleroz, demiyelinizasyon, nörodejenerasyon ve inflamasyon ile karakterize merkezi sinir sisteminin immun ilişkili bir hastalıdır. Hastalık, genç erişkinlerde en yaygın travmatik olmayan özürllülük nedenlerinden biridir. Semaforinler, immun ilişki hastalıkların patogenezinde rol alırlar. Patogenezi halen net olarak ortaya konamamış, kesin bir tanısal veya prognostik biyobelirteç saptanamamış olan Multipl Skleroz'da semaforinlerin rolü son yıllarda giderek artan ilgi konusudur. Bu amaçla bu projede multipl skleroz gelişiminde rol oynayabilecek immun ilişkili semaforinlerden Sema3A, Sema3F, Sema4A, Sema4D ve Sema7A araştırıldı.

Multipl sklerozun tanısal ayırımında, prognostik öneme sahip olabilecek hastalık başlangıcındaki klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile semaforin düzeylerinin ilişkileri incelendi. Bu amaçla sağlık gönüllülerden elde edilen serum ve yani tanı almış naif relapsing remitting multipl skleroz (RRMS) tanılı hastalardan elde edilen serum ve beyin omurilik sıvısında ELISA yöntemi ile belirtilen semaforin düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edildi.

Naif yeni tanı RRMS hastalarında serum Sema3A düzeyi düşüktü ve biyobelirteç potansiyele sahipti. Sema3F'te serum düzeylerinin oligoklonal bant sayısı yüksek olan hastalarda kısmen daha düşük olması dışında hem tanısal hem de prognostik anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Serum Sema4A, Sema4D ve Sema7A hastalık durumunda daha düşüktü. Sema4A'daki bu düşüklük oligoklonal bant sayısı, periventriküler lezyon sayısı ve infratentorial lezyon varlığı ile negatif ilişkili idi. Sema4A BOS düzeyleri infratentorial lezyon varlığı ve sayısı ile pozitif ilişkiliydi. IgG indeksi yüksek olan hastalarda serum ve BOS Sema4D seviyeleri daha yüksekti. Serum Sema7A düzeyi oligoklonal bant sayısı ile negatif, BOS Sema7A düzeyi ise pozitif korelasyona sahipti.

Sonuç olarak Sema3A serum düzeyi düşüklüğünün RRMS için tanısal önemi olabileceğini ve biyobelirteç potansiyelini tekrar teyit ediyoruz. Sema7A hakkında ise azalmış serum düzeyi ve artmış BOS düzeylerinin inflamatuvar immun aktivasyon ile ilişkili olabileceğini vurguluyoruz. Diğer taraftan serum Sema4A ve Sema4D düzeylerinin literatürün aksine düşük saptanmış olması hasta sayısının azlığı veya klinik özelliklerinden kaynaklanmış olabilir. Bu bağlamda nedensellik oluşturabilmek için serum, immun hücreler ve BOS semaforin analizlerini de içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuçlarımız ileride planlanacak MS-semaforin ilişkisine odaklanan daha kapsamlı çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: semaforin, beyin omurilik sıvısı, ataklı yineleyici multipl skleroz, biyobelirteç.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder of the central nervous system characterized by demyelination, neurodegeneration, and inflammation. It represents one of the most common non-traumatic causes of disability in young adults. Semaphorins, a family of signaling proteins, are implicated in the pathogenesis of immune-mediated diseases. Despite growing interest in the role of semaphorins in MS, their precise contributions to pathogenesis remain unclear, and no definitive diagnostic or prognostic biomarkers have been established. This study investigated the potential involvement of immunomodulatory semaphorins—Sema3A, Sema3F, Sema4A, Sema4D, and Sema7A—in MS development.

We examined the associations between semaphorin levels and clinical, laboratory, and radiological features at disease onset, which may hold diagnostic and prognostic significance in MS. Serum samples from healthy volunteers and paired serum/cerebrospinal fluid (CSF) samples from newly diagnosed, treatment-naïve relapsing-remitting MS (RRMS) patients were analyzed using ELISA to quantify semaphorin levels.

Key findings demonstrated significantly reduced serum Sema3A levels in treatment-naïve RRMS patients, highlighting its potential as a diagnostic biomarker. No significant diagnostic or prognostic correlations were observed for Sema3F, except for marginally lower serum levels in patients with elevated oligoclonal band counts. Serum levels of Sema4A, Sema4D, and Sema7A were markedly decreased in RRMS patients. Specifically, reduced serum Sema4A exhibited inverse correlations with oligoclonal band counts, periventricular lesion numbers, and the presence of infratentorial lesions. Conversely, CSF Sema4A levels showed a positive correlation with infratentorial lesion burden. Patients with a high IgG index displayed elevated serum and CSF Sema4D levels. Serum Sema7A levels inversely correlated with oligoclonal band counts, whereas CSF Sema7A levels demonstrated a positive correlation.

These results confirm the diagnostic relevance of diminished serum Sema3A in RRMS and reinforce its biomarker potential. The observed reduction in serum Sema7A alongside elevated CSF levels may reflect compartmentalized inflammatory immune activation. Notably, the unexpected finding of reduced serum Sema4A and Sema4D levels—contrary to prior literature—may stem from cohort limitations, such as small sample size or clinical heterogeneity. Further studies integrating semaphorin profiling in serum, CSF, and immune cells are necessary to establish causal relationships.

In conclusion, our findings underscore the diagnostic promise of Sema3A and elucidate complex semaphorin-mediated pathways in RRMS pathophysiology. These insights provide a framework for future large-scale investigations into semaphorin networks in MS, with implications for biomarker discovery and therapeutic development.

Keywords: semaphorin, cerebrospinal fluid, relapsing remitting multiple sclerosis, biomarker

1.GİRİŞ

Multiple skleroz dünyada yaklaşık 2,3 milyon insanı etkileyen, merkezi sinir sisteminin demiyelinizasyon, nörodejenerasyon ve inflamasyon ile karakterize otoimmün bir hastalıdır (Lassmann vd., 2007; Wang vd., 2016). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, MS, Kuzey Amerika ve Avrupa'da en yüksek prevalans oranıyla dünya çapında iki milyondan fazla insanı etkilemektedir ve hastalık, genç erişkinlerde en yaygın sakat bırakan travmatik olmayan nörolojik durumlardan biridir (Evans vd., 2013; World Health Organization, 2008). Prevalansı coğrafi özelliklere bağlı olarak 100.000'de 2 ile 200 arasında değişmekte olup (Warren ve Warren, 2001), ülkemizde 1000'de 0,4-1 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Öztürk vd., 2017). Genellikle 20-40 yaş arasında başlar ve kadın cinsiyet hakimiyeti vardır (Warren ve Warren, 2001). Hastalığın nöroimmunolojik patogenezi halen net bir şekilde ortaya konulmadığı için etkin, hastalığı ortadan kaldıran bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır.

Semaforinler birçok organ ve dokunun gelişiminde ve korunmasında esas olan hücre dışı sinyal proteinleri olarak bilinmektedir (Alto ve Terman, 2017). Semaforinler ilk olarak nöronal gelişimde rehber moleküller olarak tanımlansa da otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler gelişim ve anjiogenez ve kanser gibi birçok farklı patolojide rol oynadıkları gösterilmiştir (Fard ve Tamagnone, 2021). Hem santral sinir sisteminde hem de immün sistemde ekspresyonlarının gösterilmesi nedeni ile semaforinlerin multipl skleroz patogenezi ile ilişkisi güncel bir araştırma konusudur (Lotfi vd., 2021). Demiyelinizasyon ve sonrasındaki myelin onarımı süreçlerinde (Sema 3A ve Sema3F) (Williams vd., 2007, Costa vd., 2015), oligodendrosit göçü ve remiyelinizasyonda (Sema 3F) (Williams vd., 2007), mikroglia aracılı inflamasyon, B ve T hücre yanıtlarının artırılmasında (Sema 4D) (Giraudon vd., 2004, Kumanogoh, Suzuki, vd., 2002), proinflamatuvar sitokin salgılanmasının uyarımında (Sema 7A) (Lotfi vd., 2021) görev aldıkları, böylelikle multipl skleroz immünpatogenezinde rolleri olabileceği belirtilmiştir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, semaforinlerin multipl skleroz patogenezinde önemli rol oynadığı ve biyobelirteç ya da terapötik bir hedef olabileceği öngörülebilir. Daha önce yapılan klinik araştırmalarda sadece Sema3A ve Sema4A'nın serum düzeyleri incelenmiş, Sema7A'nın ise BOS düzeyinde azalma olduğu saptanmıştır (Costa vd., 2015; Shapoori vd., 2020; Williams vd., 2007). Bu çalışmada semaforinler ile ilgili yapılan son çalışmalar göz önüne alınarak, semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın beyin omurilik sıvısı ve serum seviyelerinin yeni tanı multipl skleroz hastalarındaki farklılıkları ve hastalığın klinik ve radyolojik olarak aktivasyonu ile ilişkisi araştırıldı.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Multiple skleroz (MS), genç yetişkinlerde önde gelen özürülük nedeni olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Klinik olarak tekrarlayan ve düzelme dönemleri gösteren (RRMS), ikincil ilerleyici (SPMS) ve birincil ilerleyici (PPMS) olarak isimlendirilen alt tiplere ayrılır (Klineova ve Lublin, 2018). En sık karşılaşılan formu RRMS'tir. Hastalık seyrinde ataklar, fokal inflamatuvar demiyelinizan lezyonların varlığıyla ilişkilidir; bu süreçte miyelin onarımı başlasa da, onarımın başarısız olması geri dönüşsüz nörolojik hasara yol açar (Dobson ve Giovannoni, 2019). Tanı kriterlerinde, yeni klinik bulguların zaman içinde dağılımı (zamanda yayılım) ve merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde tutulum (mekanda yayılım) temel alınır. Zamanda yayılımın değerlendirilmesinde beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal bant (OKB) varlığı önemli bir rol oynar. Ayrıca, BOS ve kan örneklerinde immünglobulin G (IgG) indeksinin yükselmesi, kan-beyin bariyeri disfonksiyonunu işaret ederek tanıya destek sağlar (Kamińska vd., 2017). Akut atak tedavisinde, intravenöz metilprednizolon kullanımıyla semptomların şiddetinin azaltılması ve kalıcı engelliliğin önlenmesi hedeflenir (Hauser ve Cree, 2020). Uzun vadeli yönetimde ise immünomodülatuar tedavilerle hastalık aktivitesinin baskılanması, atak sıklığının azaltılması ve progresyonun yavaşlatılması amaçlanır. Bu tedaviler, hastalığın prognozu ve aktivite düzeyi göz önüne alınarak kişiselleştirilmiş bir yaklaşımla planlanır (Hauser ve Cree, 2020). Ancak MS'in nöroimmünolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılmadığından, hastalığı kökten ortadan kaldıran bir tedavi henüz mevcut değildir.

Multipl skleroz patolojisi, beyin ve omuriliğin beyaz ve gri maddelerinde plak veya lezyon adı verilen ve miyelin kılıfları ile oligodendrositlerin kaybını gösteren birleşik demiyelinize alanlarla karakterizedir. Bu lezyonlar kan-beyin bariyerini (BBB) bozulması sonucu periferik immün sistem hücrelerinin infiltrasyonu sonucu oluşur ve bu durum inflamasyonu, demiyelinizasyonu, gliozisi ve nöroaksonal dejenerasyonu teşvik ederek nöronal sinyalleme bozulmasına yol açar (Dendrou vd., 2015). Akut dönemde yüksek oranda makrofaj ve CD8+ T hücresi, daha az oranda ise CD4+ T hücresi, B hücresi ve plazma hücresi içerir (Dendrou ve Fugger, 2017). Özellikle CD8+ T hücreleri, beyaz cevherde ve gri cevher kortikal demiyelinizan lezyonlarında CD4+ T hücrelerinden daha yüksek oranda bulunur ve sayıları akson hasarıyla yakından ilişkilidir (Frischer vd., 2009). Ayrıca, miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG) gibi miyelin bileşenlerine karşı otoantikor üreten B hücreleri hem antikor aracılı hasara hem de sitokin salınımına aracılık ederek MSS inflamasyonun devam etmesine katkıda bulunmaktadır (Arneth, 2019). Makrofajlar ve mikrogliya, miyelin artıklarını temizleyerek onarım sürecini başlatır. Azalmış miyelin fagositozu ve miyelin yıkımı,

remiyelinizasyonu bozarmaktadır (Klotz vd., 2023). Pro-inflamatuar efektör T hücreleri OPC proliferasyonunu ve farklılaşmasını engelleyerek ve IFN γ gibi pro-inflamatuar sitokinlerin OPC sağkalımını bozması da remiyelinizasyonu engellemektedir (Klotz vd., 2023). Bu bilgiler ışığında inflamatuvar yanıtı modüle etmek, rejeneratif mekanizmaları artırmanın yanı sıra, hastalığın ilerlemesini durdurmak veya hatta tersine çevirmek için kapsamlı bir yaklaşım sağlayabilir. Bu noktada inflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlerin her ikisini de modüle edebilme potansiyeline sahip olan semaforinler dikkat çekmektedir.

İlk olarak nöronal gelişimde rehber moleküller olarak tanımlanan semaforinler, gelişim, immün cevap, angiogenez, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok farklı fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan bir protein ailesidir (Alto ve Terman, 2017). Yapısal ve işlevsel özelliklere göre sekiz ayrı sınıfa ayrılmıştır; bunlardan sınıf 4 üyeleri Sema4A ve Sema4D ile sınıf 7 üyesi Sema7A immün semaforinler olarak bilinmektedir (Kikutani vd., 2007). Merkezi sinir sisteminde multipl skleroz bağlamında ise, semaforinler hem hastalığın patogenezinde hem de potansiyel terapötik hedefler olarak öne çıkmaktadır (Lotfi vd., 2021). Postmortem incelemelerde MS'li bireylerin beyinlerinde Sema3A'nın ekspresyonunun arttığı belirlenmiş, ayrıca deneysel otoimmün ensefalit (EAE) modelinde mRNA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (Williams vd., 2007). Sema3A'nın MS plaklarında ekspresyonunun yüksek seviyelerinin inflamatuvar hücrelerin varlığı ile korele olduğunu bildirmiştir, yüksek inflamatuvar aktivite gösteren lezyonlarda bulunan mikroglia ve makrofajlarda Sema3A'nın daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır (Costa vd., 2015). Bu durum, bağışıklık yanıtını kontrol altına almak amacıyla parakrin bir faktör olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Costa vd., 2015). Serum seviyeleri incelendiğinde ise, RRMS hastalarında serum Sema3A seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğunu ve bu molekülün relaps faz aktivitesinin bir biyobelirteci olabileceğini öne sürmüştür (Rezaeepoor vd., 2017). Sema3A'nın etki mekanizması incelendiğinde immün sistem ve merkezi sinir sistemi açısından farklılık göstermektedir. Sema3A, T hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonunu baskılayarak immün yanıtı düzenleyebilirken (Liu vd., 2018), sinir sisteminde OPC göçünü ve farklılaşmasını engelleyerek miyelin yenilenmesini sınırlandırmaktadır (Boyd vd., 2013; Piaton vd., 2011; Syed vd., 2011). Bu durum çelişkili görünse de, yapılan çalışmalar EAE modelinde Sema3A seviyesinin CNS'de arttığını, ancak bağışıklık sisteminde azaldığını göstermektedir (Gutiérrez-Franco vd., 2016). Bu bulgular, MS'te doku onarımını ve rejenerasyonu teşvik etmek amacıyla Sema3A sinyal yollarını hedef almanın potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceğini düşündürmektedir. Rekombinant (r)Sema3A'nın demiyelinizasyon bölgesine eklenmesi, OPC göçünü ve miyelin onarımını azalttığı rapor edilmiştir (Boyd vd., 2013). Buna karşılık, Sema3A/Plexin-A1 sinyal yolunun plexin-A1 antagonist peptidi (MTP-PlexA1) ile bloke edilmesi, deneysel otoimmün

ensefalomyelit (EAE) modelinde miyelin bütünlüğünü artırmış ve lokomotor aktivitede iyileşmeye yol açmıştır (Binamé vd., 2019).

Sema3A ve Sema3F'in her ikisinin de plaklarda ekspresyonunun arttığı bildirilmiş olmakla birlikte, erken dönem aktif lezyonlarda Sema3F'in baskın olduğu görülmüştür (Williams vd., 2007). Bu baskınlık, OPC'ler üzerindeki migrasyonu artırıcı özellikleri veya inflamatuvar etkilerle ilişkilendirilebilir. Plant ve ark. Sema3F'in inflamasyon bölgesinde nötrofilleri tutmada kritik bir rol oynadığını, böylece immün yanıtın akut fazlarında düzenleyici işlev gördüğünü vurgulamaktadır (Plant vd., 2020). Sema3F, Sema3A'nın aksine, oligodendrosit prekürsör hücreleri (OPC'ler) için atraktant bir faktördür (Spassky vd., 2002) ve remiyelinizasyon hızını artırdığı bildirilmektedir (Piaton vd., 2011). Bir tedavi stratejisi olarak genetik olarak modifiye edilmiş ve Sema3F eksprese eden makrofajların demiyelinizasyon bölgelere OPC göçünü arttırdığı ve remiyelinizasyonu hızlandırdığını bildirmiştir (Aigrot vd., 2022). Benzer şekilde deneysel olarak farelere rekombinant Sema3F (rSema3F) enjeksiyonu, OPC göçünü ve remiyelinizasyonu artırmaktadır (Boyd vd., 2013), Bu bulgular, Sema3F'in inflamasyon sonrası tamir süreçlerini düzenlemede önemli bir rol oynadığını ve kronik MS'de potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Semaforin 4A, immünolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinen bir diğer semaforindir. Sema4A, özellikle Th2 ve Th17 yanıtlarını artırırken Th1 farklılaşmasını inhibe ederek T hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Kumanogoh, Marukawa, vd., 2002).. MS hastalarında serum Sema4A seviyelerinin arttığı saptanmış (Nakatsuji vd., 2012) ve yüksek Sema4A seviyelerinin, hastalığın daha erken başlangıcına, daha şiddetli hastalık aktivitesine ve IFN- β tedavisine yanıtızsızlık ile ilişkil olduğu bildirilmiştir (Koda vd., 2020). Sema4A'nın oligodendrosit fonksiyonlarını bozduğu da gösterilmiştir. Farelerde korpus kallozum içine doğrudan Sema4A enjeksiyonu, miyelin kaybına ve olgun oligodendrositlerin apoptozuna yol açmaktadır (Chiou vd., 2019). MS plaklarında güçlü bir şekilde eksprese edilen Sema4A, rodent oligodendrositlerinde Tim2, insan oligodendrositlerinde ise Tim1 reseptörleri ile etkileşerek apoptoz sinyalini tetiklemekte ve oligodendrosit kaybına neden olmaktadır (Chiou vd., 2018; Leitner vd., 2015). Sema4A seviyeleri, bazı hastalarda tedaviye dirençle ilişkilendirilmiş olup, bu proteinin tedavi yanıtını öngörmek için biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Koda vd., 2018, 2014).

Sema4D (CD100), trombositler, monositler, antijen sunan hücreler (APC'ler), olgun dendritik hücreler (DC'ler), aktive $\gamma\delta$ T hücreleri, NK hücreleri, T hücreleri, aktive B hücreleri ve çeşitli bağışıklık hücreleri tarafından eksprese edilen bir immün semaforindir (Maleki vd., 2016). Sema4D eksikliği olan fareler, lenf nodlarında antijen-spesifik T hücre priminginin

bozulması nedeniyle deneysel otoimmün ensefalomyelitte (EAE) karşı dirençli bulunmuştur (Kumanogoh vd., 2002). Deneysel çalışmalarda Sema4D, miyelin oluşumu için korpus kallozumdan omuriliğe kadar tüm ana yollarda oligodendrositlerde eksprese edildiği, eksikliği olan farelerde olgun oligodendrositlerin sayısı önemli ölçüde artarken, OPC'lerin sayısının etkilenmediğini, apoptozu teşvik ederek oligodendrosit farklılaşmasının inhibitör düzenleyicisi olabileceği gösterilmiştir (Yamaguchi vd., 2012). T hücre kaynaklı Sema4D mikroglialarda Plexin-B1 reseptör aracılığıyla mikroglia aktivasyonuna ve EAE'nin patolojinin progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Okuno vd., 2010). Bu nedenle Sema4D'yi hedef alan terapötik stratejiler, hem inflamasyonu azaltmada hem de remiyelinizasyonu teşvik etmede umut vadetmektedir. Anti-Sema4D tedavisinin kan-beyin bariyeri (BBB) bozulmasını önlediği, periferel hücre infiltrasyonunu engellediği ve oligodendrosit prekürsör hücrelerinin göçünü ve hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir (Smith vd., 2015). Ayrıca, Plexin-B1'e karşı geliştirilen monoklonal antikor tedavisi, EAE farelerinde klinik semptomları belirgin şekilde iyileştirmiştir (Vogler vd., 2022). Anti-Sema4D antikoruna ile ilgili faz 1 klinik çalışmaları umut vadetmektedir (Fisher vd., 2016; LaGanke vd., 2017).

Sema7A, aktif T hücrelerinde eksprese edilen ve $\alpha 1\beta 1$ integrin aracılığıyla monositler ve makrofajlarda sitokin üretimini uyaran bir moleküldür. Ayrıca, deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modelinde merkezi sinir sistemine (MSS) infiltre olan inflamatuvar hücrelerde ve dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinde Sema7A ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Gutiérrez-Franco vd., 2016). Ancak Sema7A üzerine yapılan deneysel çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Sema7A eksikliği oluşturulan farelerde (Sema7a^{-/-}) EAE modeli oluşturulduğunda, hücresel bağışıklık yanıtlarında belirgin bir bozulma gözlemlenmiştir (Suzuki vd., 2007). Aksine, Czopik ve arkadaşları, Sema7A'nın T hücre aktivasyonunun negatif düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Sema7A eksikliği, T hücre reseptörü (TCR) down-regülasyonunun bozulmasına ve T hücrelerinin aşırı tepkiselliğine yol açarak, EAE'nin çok daha şiddetli bir şekilde seyretmesine neden olmuştur (Czopik vd., 2006). Klinik çalışmalarda, multipl sklerozun (MS) öncüsü olarak kabul edilen klinik izole sendrom (KİS) hastalarında Sema7A düzeyleri araştırılmıştır. KİS'ten kesin MS tanısına ilerleyen hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) belirgin şekilde daha düşük Sema7A seviyeleri bulunmuştur. Ayrıca, başlangıçtaki ve bir yıllık takip sürecindeki beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taramalarında tespit edilen T2 lezyon sayısı ile BOS'taki Sema7A seviyeleri arasında negatif bir korelasyon bildirilmiştir. Bu veriler, Sema7A'nın BOS biyobelirteci olarak potansiyel taşıyabileceğini düşündürmektedir (Cantó vd., 2014). Buna karşılık, Sema7A gen ekspresyonunun, sağlıklı bireyler ve tedavi almamış MS hastaları arasında anlamlı bir fark göstermediği bildirilmiştir. Ancak, interferon beta-1b (IFN- $\beta 1b$) ve glatiramer asetat (GA)

tedavilerinin, Sema7A gen ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde artırabildiği gözlemlenmiştir (Shapoori vd., 2020). Serum ve BOS düzeyleri düşük olmasına rağmen, postmortem incelemelerde beyin dokusunda Sema7A ekspresyonunun arttığı ve bu artışın MS lezyonlarındaki inflamatuvar aktivitenin derecesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Costa vd., 2015). Pediatrik başlangıçlı multipl skleroz (POMS) hastalarının BOS proteom analizlerinde, POMS hastalarında monofazik edinsel demiyelinizan sendrom hastalarına kıyasla Sema7A seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Bu durum, Sema7A'nın MS patolojisindeki potansiyel rolünü daha da vurgulamaktadır (Bruijstens vd., 2023).

Devam eden araştırmalar ışığında, semaforinler sadece hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda nöroproteksiyon ve bağışıklık düzenlemesini iç içe geçiren yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine de olanak sağlayabileceğini göstermektedir. Gerçekleştirilen proje ile yeni tanı almış, tedavi almamış MS hastalarında serum ve BOS örneklerinde semaforin düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Semaforin düzeyleri, klinik ve radyolojik bulgular ile değerlendirilerek hem tanıda hem de klinik progresyonda biyobelirteç olma potansiyelleri incelenmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi ve kontrol grubunun oluşturulması

Çalışmaya Bursa Uludağ Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14.11.2022 Tarih ve 2022-16/36 Karar nolu onayının alınmasını takiben başlanmıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda, klinik ve radyolojik olarak Relapsing Remitting Multiple Skleroz ön tanısı ile immunoglobulin G indeksi ve Oligoklonal bant incelemeleri için BOS ve kan örnekleri alınan hastalar içerisinde revize Mc Donald 2017 tanı kriterleri ile kesin RRMS tanısı alan sıradan 40 hasta ve cinsiyet eşleştirmesi ile kan örneği alınan sıradan 40 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi. Dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda belirtilmiştir.

Dahil edilme kriterleri

Hasta grubu için;

1. 18-65 yaş aralığında olmak
2. Diğer nörolojik hastalığı olmaması
3. IgG indeksi ve OKB incelemesi için BOS ve kan örneği alınmış olması

4. Revize Mc Donald-2017 tanı kriterlerine göre kesin MS tanısı almış olmak

Kontrol grubu için;

1. 18-65 yaş arasında olmak
2. Daha önce görme kaybı, his kusuru, kas güçsüzlüğü gibi nörolojik bir şikayetinin olmaması
3. Daha önce nöroloji, kardiyoloji, fizik tedavi ve psikiyatri polikliniğine başvurmasını gerektiren bir şikayetinin olmaması

Dışlanma kriterleri:

Hasta grubu için;

1. Daha önce MS tanısı almış ve tedavi başlanmış hastalar
2. Son bir ay içerisinde nörogörüntüleme (MRG) olmaması
3. Klinik izole sendrom veya radyolojik izole sendrom tanısı olması
4. Aktif enfeksiyon varlığı
5. İmmun sistem ilişkili başka bir hastalık varlığı

Kontrol grubu için;

1. Daha önce nöroloji polikliniğine başvurmuş ya da kliniğinde yatmış olmak

3.2. Demografik, klinik ve radyolojik değerlendirme

Hastaların yaş, cinsiyet, eşlik eden diğer hastalıkları demografik veriler olarak kaydedildi. Hastalığa ait başlangıç semptomları, semptom sayıları, nörolojik muayene, Genişletilmiş Özürlülük Durum Ölçeği (EDSS), nöropsikometrik testler [Symbol Digit Modalities Test (SDMT) ve Montreal Bilişsel Değerlendirme (MoCA) testleri] nöroloji uzmanları tarafından kaydedildi. Hastaların nörolojik şikayetleri nedeni ile çekilmiş olan MR'ları Barkhof-Tintore MR görüntüleme kriterlerine göre periventriküler (FLAIR), jukstakortikal/kortikal (FLAIR), infratentoriyal (T2W) ve spinal lezyon (T2W) sayısı ve lokalizasyonları nöroradyoloji alanında deneyimli iki bağımsız kör radyoloji uzmanı araştırmacı tarafından görsel tarama ile lezyon sayısı ve lokalizasyonları tespit edildi.

3.3. Biyolojik örneklerin toplanması

Çalışma ve kontrol grubundan kan örneklemi flebotomi prosedürü ile jelsiz boş tüplere alındı. Ardından 15-20 dk. pıhtılaşması için beklenip 30.000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek serum kısmı ayrıldı. Çalışma grubundan alınan beyin omurilik sıvısı

örneklemi ise rutin prosedür olarak lateral dekübit pozisyonunda lomber ponksiyon işlemi ile alınan numunelerden 2 ml steril jelsiz tüpe örneklem 1'er ml'lik eppendorflara ayrıldı. Alınan tüm materyalleri soğuk zincir ile Fizyoloji Anabilim dalına transfer edildi ve analizler yapılana kadar -80°C'de saklandı. Numuneler sorumlu araştırmacı tarafından alındığında numarandırılıp anonimleştirilerek, analizlerin kör araştırmacı tarafından yapılması sağlandı.

3.4. Semaforin ekspresyon analizlerinin Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile gösterilmesi

Bu klinik araştırmada çalışma grubundaki hastaların BOS ve serum örneklerinden, kontrol grubundaki sağlıklı gönüllülerin ise sadece serum örneklerinden ELISA yöntemi ile Sema3A, Sema3F, Sema4A, Sema4D ve Sema7A düzeyleri spektrofotometrik (BioTek Quant, BioTek Instruments Inc., ABD) olarak analiz edildi. Analizler ELISA prensibiyle çalışan ticari kit (BT LAB, Shanghai, China) protokolleri takip edilerek gerçekleştirildi. Kısaca antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklara protokole uygun şekilde dilüe edilen standartların yüklenmesini takiben, 40µl kan ve BOS örnekleri yüklendi. Her bir örnek yüklenen kuyucuğa 10µL ilgili kit içerisinde bulunan ölçümü yapılacak olan semaforinin antikoru yüklendi. Akabinde standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara 50µl HRP-streptavidin konjugatları yüklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklar 5 kez uygun yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 50µl kit içerisinde bulunan sırasıyla A ve B solüsyonları yüklendi ve tekrar 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara stop solüsyonu yüklenerek 450nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümler yapıldı.

3.5. İstatistiksel yöntemler

Verinin istatistiksel analizi için SPSS 23 istatistik paket programı kullanılacaktır. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler nicel veri için ortalama ve standart sapma olarak belirlendi. Normal dağılım gösteren veri için ikiden fazla grup karşılaştırmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Normal dağılmayan veriler için Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni testi kullanıldı. Anlamlılık bulunması durumunda ikili karşılaştırmalarda Holm-Sidak testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05$ olarak belirlendi. Ayrıca hastaların demografik verileri, klinik özellikleri ve radyolojik değerlendirmeleri SPSS 28 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Veriler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde değişkenlerin normal dağılım göstermesi durumunda Pearson korelasyon katsayısı, normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman Sıra korelasyon katsayısı ile incelendi. Grafikler GraphPad Prism, versiyon 9.5.0 ile yapıldı (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4.BULGULAR

4.1. Demografik, Klinik ve Radyolojik özellikler

31'i kadın 9'u erkek toplam 40 hastanın ortalama yaşı 33.71 ± 9.98 idi. Başlangıçta gelişen atak şikayetleri için hastaların yarısında birden fazla semptom mevcuttu. En sık duyuşal, ardından optik nörit, beyin sapı/serebellar ve motor bulgular vardı. 6 hastada baş ağrısı, 3 mesane/barsak semptomları, 2 nöbet ve 1 hastada senkop/presenkop vardı. Hastaların yarısı (n=20) kötü prognostik bulgu olarak kabul edilen başlangıç semptomlarından birine (motor, beyin sapı, serebellar, sfinkter) sahipti. Başlangıç EDSS skoru 1.24 ± 0.9 (1-3) idi. Hastaların üçte birinde başlangıç EDSS skoru 2 veya üzerinde, üç hastada ise 3 ve üzerindedi. Kognitif testlerden MoCA ve SDMT skorları sırasıyla 23.96 ± 2.96 ve 33.93 ± 15.01 idi. Hastaların BOS bulguları incelendiğinde ortalama protein, açılış basıncı, serum ile eş zamanlı glukoz ve klor oranları normal sınırlardaydı. En sık OKB tip 2 saptandı. OKB sayısı ise en düşük 3 en yüksek 27 idi. İki bağımsız alanında deneyimli radyolog tarafından yapılan görüntüleme değerlendirmelerinde en sık lezyon lokalizasyonu periventriküler, ardından infratentorial alandaydı. Lezyon yükü ise en sık yine periventriküler ardından spinal ve infratentorial alanlardaydı. Çalışma hastalarının klinik, laboratuvar ve radyolojik verileri Tablo 1'de verilmiştir.

4.2. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın demografik özellikler ile farklılıkları

Cinsiyetlere göre karşılaştırıldığında serum semaforin düzeylerinde MS grubu, kontrol grubu ve tüm kohortta cinsiyetler arası anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 2). Beyin omurilik sıvısında semaforin düzeylerinde de MS grubu, kontrol grubu ve tüm kohortta cinsiyetler arası anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 3). Yaşa göre (40 yaş üstü ve altı olarak karşılaştırmalı) değerlendirildiğinde serum semaforin düzeylerinde MS grubu, kontrol grubu ve tüm kohortta cinsiyetler arası anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 4). Yaşa göre (40 yaş üstü ve altı olarak karşılaştırmalı) değerlendirildiğinde beyin omurilik sıvısı semaforin düzeylerinde MS grubu, kontrol grubu ve tüm kohortta cinsiyetler arası anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 1. RRMS hastalarının klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikleri.

	Özellikler	n(%) veya ortalama±ss (min-maks.)		Özellikler	n(%) veya ortalama±ss(min-maks.)	
Başlangıçta relaps semptom ve bulguları	Optik Nörit	13(32.5)	Özürlülük ve kognitif durum	EDSS	1.24±0.9 (1-3)	
	Motor	11(27.5)		EDSS≥2	13(32.5)	
	Duyusal	18(45)		MoCA	23.96±2.96 (17-28)	
	Beyin sapı/ serebellar	12(30)		SDMT	33.93±15.01 (4-61)	
	Diğer	12(30)		Kotikal/jukstakortikal	18(45)	
BOS bulguları	Açılış Basıncı, cm _{H2O}	14.48±4.79 (5-24)	Radyolojik analiz, demiyelinizan lezyon lokalizasyonu	Periventriküler	38(95)	
	Protein, mg/dl	30.46±11.64(10.6-73.9)		İnfratentorial	27(67.5)	
	BOS/Serum glukoz oranı	0.63±0.11 (0.37-0.86)		Spinal kord	14(35)	
	BOS/Serum klor oranı	1.17±0.3 (1.09-1.25)		Kontrastlanma, var	14(35)	
	Hücre sayısı, /µl	2.27±4.43 (0-20) mnl hakimiyeti: %74.1 (50-95)		Kotikal/jukstakortikal	1.35±1.86 (0-8)	
	OKB tipi	Tip 1	8(20)	Radyolojik analiz, demiyelinizan lezyon sayısı	Periventriküler	10.72±7.8 (0-29)
		Tip 2	25(62.5)		İnfratentorial	2.07±3.44 (0-16)
		Tip 3	7(17.5)		Spinal kord	2.87±3.4 (0-13)
	OKB sayısı	12±6.9 (3-27)	Kontrastlanma		0.62±0.86 (0-2)	
	OKB sayısı >12	12(48)				
	IgG indeksi	0.97±0.56 (0.39-2.77)				
	IgG indeksi >0.7	24(60)				

Tablo 2. Serum semaforin düzeylerinin MS ve kontrol grubunda cinsiyetlere göre karşılaştırılması. (ortalama±ss, ortanca(min-maks.))

	MS				Kontrol				Tüm Katılımcılar			
	Kadın	Erkek	Toplam	P	Kadın	Erkek	Toplam	P	Kadın	Erkek	Toplam	P
Sema3A	3.47±2.19, 2.99(0.72- 11.84)	4.18±3.06, 2.88(2.53- 11.77)	3.64±2.40, 2.99(0.72- 11.84)	0.821	6.08±3.70, 4.51(2.47- 13.02)	5.46±3.55, 4.20(2.12- 11.63)	5.95±3.63, 4.26(2.12- 13.02)	0.450	4.73±3.26, 3.53(0.72- 13.02)	4.74±3.23, 2.93(2.12- 11.77)	4.73±3.23, 3.38(0.72- 13.02)	0.670
Sema3F	7.62±3.48, 6.55(3.85- 19.88)	7.83±5.02, 6.33(4.88- 20.94)	7.67±3.84, 6.44(3.85- 20.94)	0.774	9.39±6.04, 7.53(3.39- 29.12)	11.31±6.60, 10.37(4.00- 2.43)	9.84±6.13, 7.57(3.39- 29.12)	0.510	8.49±4.94, 6.77(3.39- 29.12)	9.47±5.91, 6.40(4.00- 22.43)	8.73±5.16, 6.59(3.39- 29.12)	0.832
Sema4A	9.38±4.97, 7.94(5.17- 29.79)	8.13±1.55, 8.07(5.97- 10.16)	9.11±4.46, 7.94(5.17- 29.79)	0.985	13.13±6.27, 11.28(5.54- 28.16)	13.74±7.46, 10.51(5.06- 23.63)	13.26±6.42, 10.77(5.06- 28.16)	0.983	11.19±5.89, 9.37(5.17- 29.79)	10.75±5.78, 8.49(5.06- 23.63)	11.09±5.83, 9.09(5.06- 29.79)	0.732
Sema4D	12.46±4.77, 10.72(6.82- 27.63)	12.45±5.27, 10.66 (8.67- 25.98)	12.46±4.82, 10.66(6.82- 7.63)	1	19.5±8.14, 18.44(8.28- 33.79)	13.94±7.53, 11.51(7.76- 29.18)	18.19±8.25, 16.57(7.76- 33.79)	0.077	15.85±7.45, 13.51(6.82- 33.79)	13.15±6.27, 11.03(7.76- 29.18)	15.20±7.23, 12.46(6.82- 33.79)	0.133
Sema7A	6.46±2.88, 5.77(3.80- 17.31)	5.00±0.68, 5.01(3.86- 5.95)	6.12±2.61, 5.24(3.80- 17.31)	0.252	8.08±3.23, 7.34(4.22- 17.79)	7.22±4.89, 5.20(3.05- 17.45)	7.85±3.69, 6.76(3.05- 17.79)	0.126	7.17±3.12, 6.37(3.80- 17.79)	6.11±3.56, 5.01(3.05- 17.45)	6.90±3.24, 5.87(3.05- 17.79)	0.041

Tablo 3. BOS semaforin düzeylerinin MS hastalarında cinsiyetlere göre karşılaştırılması. (ortalama±ss, ortanca (min-maks.))

	MS			
	Kadın	Erkek	Toplam	P
Sema3A	6.04±1.09, 6.19(2.94-7.78)	6.38±0.74, 6.62(4.72-7.00)	6.11±1.03, 6.42(2.94-7.78)	0.335
Sema3F	13.59±2.61, 13.35(9.64- 18.45)	11.81±2.39, 11.72(8.03-16.30)	13.19±2.64, 12.96(8.03-8.45)	0.080
Sema4A	11.16±2.09, 11.23(7.19- 17.42)	9.73±2.28, 9.52(6.91-13.55)	10.84±2.19, 10.64(6.91-7.42)	0.114
Sema4D	12.75±4.34, 13.87(3.10- 19.95)	13.28±2.39, 12.74(10.26-17.91)	12.87±3.96, 13.55(3.10-9.95)	0.545
Sema7A	8.47±1.99, 8.32(4.65-12.27)	8.77±2.35, 9.78(5.01-11.47)	8.54±2.05, 8.56(4.65-12.27)	0.610

Tablo 4. Serum semaforin düzeylerinin MS ve kontrol grubunda yaşa göre karşılaştırılması. (ortalama±ss, ortanca (min-maks.))

	MS				Kontrol				Total		
	<40	>40	Total	P	<40	>40	Total	P	<40	>40	P
Sema3A	3.96±2.63, 2.99(1.84- 11.84)	2.66±1.04, 2.88(0.72- 3.96)	9.11±4.46, 7.94(5.17- 29.79)	0.270	5.66 ±3.41, 4.2(2.12 - 12.95)	6.85 ±4.37, 6.2(2.47 - 13.02)	5.95 ±3.63, 4.26(2.12 - 13.02)	0.789	3.96±2.63, 2.99(1.84- 11.84)	2.66±1.04, 2.88(0.72- 3.96)	0.270
Sema3F	7.94±4.13, 6.47(4.37- 20.94)	6.87±2.85, 6.11(3.85- 11.64)	7.67±3.84, 6.44(3.85- 20.94)	0.450	9.57 ±6.31, 7.57(3.39 - 29.12)	10.71 ±5.8, 8.27(4.96 - 19.99)	9.84 ±6.13, 7.57(3.39 - 29.12)	0.537	7.94±4.13, 6.48(4.37- 20.94)	6.87±2.85, 6.11(3.85- 11.64)	0.450
Sema4A	9.70±4.95, 8.49(5.43- 29.79)	7.33±1.53, 7.08(5.17- 10.13)	9.11±4.46, 7.94(5.17- 29.79)	0.117	12.52 ±5.76, 10.51(5.06 - 24.64)	15.57 ±8.16, 15.07(5.54 - 28.16)	13.26 ±6.42, 10.77(5.06 - 28.16)	0.352	9.70±4.94, 8.49(5.43- 29.79)	7.33±1.53, 7.08(5.17- 10.13)	0.117
Sema4D	12.90±5.23, 10.72(8.15- 27.63)	11.09±3.05, 10.66(6.82- 15.90)	12.46±4.82, 10.66(6.82- 27.63)	0.453	19.66 ±8.55, 18.44(7.76 - 33.79)	13.4 ±5.02, 11.39 (8.28 - 20.6)	18.19 ±8.25, 16.57(7.76 - 33.79)	0.059	12.90±5.23, 10.72(8.15- 27.63)	11.10±3.06, 10.66(6.82- 15.90)	0.453
Sema7A	6.33±2.85 5.77(3.80- 17.31)	5.44±1.53 4.83(4.36- 8.68)	6.12±2.61 5.24(3.80- 17.31)	0.323	8.07 ±3.86 6.85(3.05 - 17.79)	7.27 ±3.35, 6.21(4.22 - 13.01)	7.85 ±3.69, 6.76(3.05 - 17.79)	0.549	6.33±2.85, 5.77(3.80- 17.31)	5.44±1.53, 4.83(4.36- 8.68)	0.323

Tablo 5. BOS semaforin düzeylerinin MS grubunda yaşa göre karşılaştırılması. (ortalama±ss, ortanca (min-maks.))

	MS			
	<40	>40	Total	P
Sema3A	6.16±0.87, 6.45(4.03-7.34)	5.96±1.46, 6.10(2.94-7.78)	6.11±1.03, 6.42(2.94-7.78)	0.614
Sema3F	13.52±2.85, 13.23(8.03-18.45)	12.20±1.57, 12.19(9.74-14.61)	13.19±2.64, 12.96(8.03-18.45)	0.209
Sema4A	10.93±2.33, 10.60(6.91-17.42)	10.55±1.79, 11.16(7.19-12.32)	10.84±2.19, 10.64(6.91-17.42)	0.747
Sema4D	12.89±4.15, 13.43(3.10-19.95)	12.82±3.56, 13.68(3.48-15.41)	12.87±3.97, 13.55(3.10-19.95)	0.890
Sema7A	8.50±2.14, 8.85(4.65-11.47)	8.66±1.84, 8.08(6.31-12.27)	8.54±2.05, 8.56(4.65-12.27)	1

4.3. Semaforinlerin serum ve BOS düzeyleri arasındaki korelasyon analizi

RRMS hastalarından elde edilen serum ve BOS örneklerinde semaforin düzeyleri açısından anlamlı korelasyon saptanmadı. (Tablo 6)

Tablo 6. Serum ve BOS semaforin düzeylerinin korelasyon analizi.

	Serum	BOS	P	Korelasyon Analizi
Sema3A	3.64±2.40, 2.99(0.72-11.84)	6.11±1.03, 6.42(2.94-7.78)	r p	0.019 0.915
Sema3F	7.67±3.84, 6.44(3.85-20.94)	13.19±2.64, 12.96(8.03-18.45)	r p	-0.042 0.809
Sema4A	9.11±4.46, 7.94(5.17-29.79)	10.84±2.19, 10.64(6.91-17.42)	r p	-0.256 0.131
Sema4D	12.46±4.82, 10.66(6.82-7.63)	12.87±3.97, 13.55(3.10-19.95)	r p	0.183 0.278
Sema7A	6.12±2.61, 5.24(3.80-17.31)	8.54±2.05, 8.56(4.65-12.27)	r p	0.122 0.485

4.4. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile farklılıkları

Serum ve BOS semaforin düzeylerinin hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet ile değişim göstermediği saptandıktan sonra elde edilen sonuçlar klinik, laboratuvar (beyin omurilik sıvısı biyokimyasal, mikrobiyolojik ve immünolojik özellikleri) ve radyolojik özellikler ile karşılaştırmalı değerlendirildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre demografik ve klinik özellikler ile semaforin düzeyleri arasında kognitif testler dışında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Kognitif değerlendirmelerde ise MoCA ve SDMT test puanları ile serum Sema4A ve serum Sema7A düzeyleri arasında pozitif korelasyon vardı (sırasıyla 0.510, 0.009 ve 0.553, 0.005 ; 0.477, 0.016 ve 0.460, 0.024). (Tablo 7). Periventriküler lezyon sayısı ile serum Sema4A arasında negatif, infratentorial bölge lezyon sayısı ile BOS Sema4A arasında pozitif korelasyon vardı (sırasıyla, -0.339, 0.043 ve 0.388, 0.013). (Tablo 7)

Tablo 7. Klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile semaforin düzeylerinin korelasyon analizi.

			SERUM					BOS				
			Sema 3A	Sema 3F	Sema 4A	Sema 4D	Sema 7A	Sema 3A	Sema 3F	Sema 4A	Sema 4D	Sema 7A
Klinik	EDSS	r	0.069	-0.047	0.208	0.046	0.112	0.001	-0.013	0.183	0.044	0.111
		p	0.683	0.785	0.224	0.785	0.523	0.995	0.938	0.259	0.787	0.494
	MoCA	r	0.380	0.289	0.510	0.316	0.553	0.118	0.005	0.059	-0.045	-0.047
		p	0.061	0.170	0.009	0.124	0.005	0.567	0.980	0.767	0.821	0.811
	SDMT	r	0.234	0.278	0.477	0.241	0.460	0.199	0.044	-0.051	-0.217	-0.190
		p	0.261	0.188	0.016	0.245	0.024	0.330	0.823	0.796	0.267	0.332
Laboratuvar , BOS	Protein	r	-0.238	-0.229	-0.186	-0.171	-0.311	-0.088	-0.178	-0.282	-0.032	-0.099
		p	0.157	0.178	0.278	0.311	0.069	0.604	0.271	0.078	0.845	0.543
	Hücre	r	0.057	-0.025	0.076	0.119	-0.0234	-0.033	-0.092	0.034	-0.071	0.196
		p	0.736	0.886	0.662	0.483	0.175	0.848	0.572	0.837	0.663	0.225
	Açılış basıncı	r	0.211	0.109	0.091	0.148	0.019	-0.093	-0.097	-0.223	0.182	0.054
		p	0.323	0.619	0.679	0.491	0.932	0.652	0.630	0.263	0.364	0.788
	BOS/Serum klor oranı	r	-0.095	-0.097	0.063	0.063	0.122	-0.200	-0.165	-0.190	0.063	0.122
	p	0.793	0.574	0.717	0.698	0.452	0.234	0.308	0.240	0.698	0.452	
BOS/Serum glukoz oranı	r	0.005	0.028	0.136	0.150	0.158	-0.093	-0.145	-0.144	0.176	0.203	
	p	0.977	0.876	0.452	0.397	0.387	0.599	0.391	0.395	0.297	0.228	
OKB sayısı	r	-0.378	-0.351	-0.474	-0.328	-0.525	-0.059	-0.045	0.068	0.111	0.421	
	p	0.075	0.109	0.022	0.127	0.012	0.789	0.830	0.746	0.599	0.036	
IgG indeksi	r	0.196	0.033	0.155	0.304	0.125	-0.101	-0.206	0.049	0.233	0.256	
	p	0.246	0.849	0.367	0.068	0.473	0.552	0.201	0.765	0.148	0.111	
Radyolojik, lezyon	Kortikal/Juksta kortikal	r	0.058	-0.255	-0.120	-0.017	-0.054	-0.119	0.104	-0.122	-0.030	0.159
		p	0.735	0.133	0.485	0.922	0.758	0.482	0.522	0.455	0.856	0.328
	Periventriküler	r	-0.291	-0.244	-0.339	-0.171	-0.196	-0.070	0.075	0.188	0.052	0.261
		p	0.080	0.151	0.043	0.311	0.258	0.681	0.646	0.245	0.750	0.104
	İnfratentorial	r	-0.124	-0.082	-0.316	-0.095	-0.216	-0.120	0.123	0.388	0.095	0.210
	p	0.464	0.635	0.060	0.576	0.213	0.480	0.451	0.013	0.559	0.193	
Spinal kord	r	-0.086	-0.281	-0.310	-0.109	-0.149	-0.015	0.095	0.095	0.179	0.119	
	p	0.613	0.097	0.066	0.522	0.392	0.928	0.561	0.558	0.268	0.464	
Kontrast tutulumu	r	-0.112	0.194	0.032	-0.076	-0.063	-0.168	0.096	0.146	-0.074	0.284	
	p	0.528	0.280	0.861	0.668	0.729	0.343	0.571	0.388	0.662	0.088	

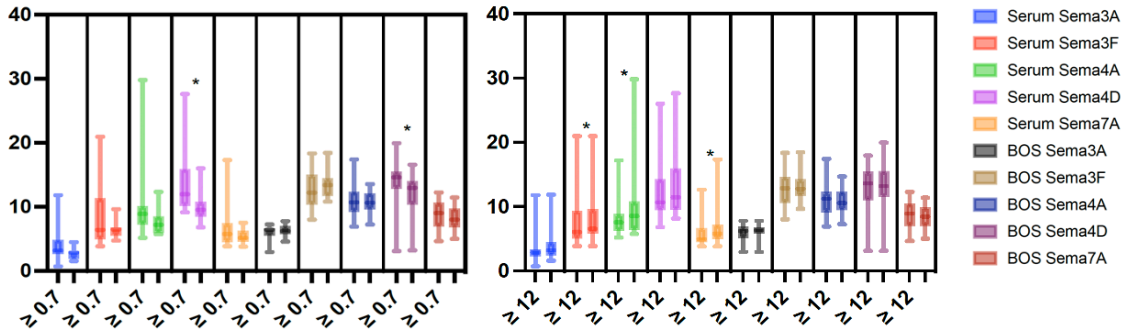
Beyin omurilik sıvısı incelemeleri ile semaforin düzeyleri arasında ise; oligoklonal bant sayısı ile serum semaforin 4A ve serum semaforin 7A arasında negatif korelasyon (Sırasıyla, -0.474, 0.022 ve -0.525, 0.012), BOS semaforin 7A arasında pozitif korelasyon (0.421, 0.036) vardı. Hastalık aktivitesi ile ilişkili bulunan OKB sayısı 12 üzerinde olan hastalarda serum semaforin 3F, serum semaforin 4A ve serum semaforin 7A düzeyi daha düşüktü (sırasıyla, p=0.034, 0.013 ve 0.011). Multipl skleroz tanısında oligoklonal bant varlığı kadar yüksekliği anlamlı kabul edilen IgG indeksi >0.7 olan hastalarda serum ve BOS semaforin 4D düzeyleri daha yüksekti (sırasıyla, p=0.006 ve 0.023). (Tablo 8, Tablo 9). Radyolojik özelliklerden lezyon lokalizasyonu ve lezyon sayısı analiz edildi. İnfratentorial lezyon varlığı olan hastalarda serum semaforin 4A düzeyi daha düşük iken BOS semaforin 4A düzeyi daha yüksekti (sırasıyla, p=0.049 ve 0.045). (Tablo 8, Tablo 9)

Tablo 8. Klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile semaforin düzey farklılıkları.

		SERUM					BOS					
		Sema 3A	Sema 3F	Sema 4A	Sema 4D	Sema 7A	Sema 3A	Sema 3F	Sema 4A	Sema 4D	Sema 7A	
Klinik	Optik Nörit	0.806	0.685	0.761	0.589	0.472	0.666	0.711	1	0.776	0.820	
	Motor	0.256	0.220	0.261	0.635	0.679	0.271	0.353	0.207	0.689	0.835	
	Duyusal	1	0.584	0.293	0.869	0.732	0.729	0.882	0.968	0.527	0.757	
	Beyin sapı/serebellar	0.909	0.520	0.741	0.316	0.725	0.402	0.827	0.850	0.373	0.358	
	Diğer	0.222	0.513	0.452	0.332	0.545	0.046*	0.099	0.307	0.079	0.899	
	Semptom sayısı (mono-multi)	0.775	0.443	1	0.480	0.567	0.142	0.314	0.799	0.091	0.925	
	Motor/beyinsapı/serebellar/sfinkter	0.518	0.104	0.181	0.845	0.909	0.408	0.739	0.989	0.383	0.883	
	EDSS>2**	0.713	0.856	0.456	0.532	0.238	0.227	0.690	0.106	0.842	0.228	
	Ailede MS	0.363	0.495	0.178	0.973	0.807	0.324	0.656	1	0.656	0.503	
Laboratuva	BOS/Serum glukoz ≥ 0.6 -<0.6	0.986	0.843	0.456	0.592	0.404	0.861	0.191	0.237	0.319	0.191	
	OKB tipi	0.610	0.582	0.348	0.208	0.485	0.514	0.750	0.584	0.683	0.613	
	OKB sayı ≥ 12 -<12	0.059	0.034	0.013	0.190	0.011	1	0.728	1	1	0.503	
	IgG indeksi ≥ 0.7 -<0.7	0.065	0.680	0.067	0.006	0.434	0.572	0.255	0.902	0.023	0.318	
Radyoloji	Lezyon lokalizasyonu	Kortikal/Jukstakortikal	0.728	0.102	0.446	0.892	0.780	0.684	0.778	0.338	0.600	0.600
		Periventriküler	0.817	0.971	0.917	0.468	0.612	0.192	0.310	0.741	0.538	0.338
		İnfratentorial	0.407	0.379	0.049	0.517	0.217	0.350	0.677	0.045	0.946	0.163
		Spinal Kord	0.316	0.292	0.685	0.707	0.957	0.731	0.842	0.932	0.776	0.530
		Kontrastlanma	0.423	0.449	0.927	0.466	0.567	0.326	0.567	0.486	0.938	0.057

*Alt grup analizlerinde anlamlı fark saptanmadı.

**Bu çalışmada kötü prognostik faktörlerden başlangıç EDSS ≥ 3 olma şartını sağlayan sadece üç hasta olduğu için istatistiksel analiz yapılmamıştır.



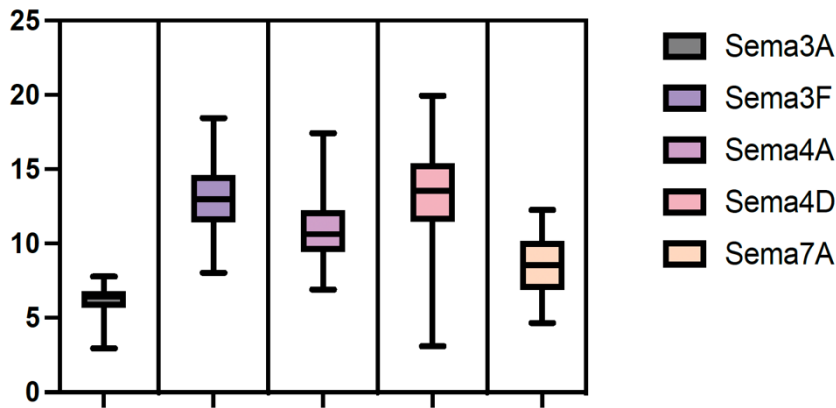
Şekil 1. IgG indeksi (sınır değeri; 0.7) ve BOS oligoklonal bant sayısına (sınır değeri; 12) göre semaforin düzey farklılıkları. Sınırlar, min-maks. *p<0.05

Tablo 9. İstatiksel olarak anlamlı saptanan laboratuvar ve radyolojik özelliklerin tanımlayıcı verileri.

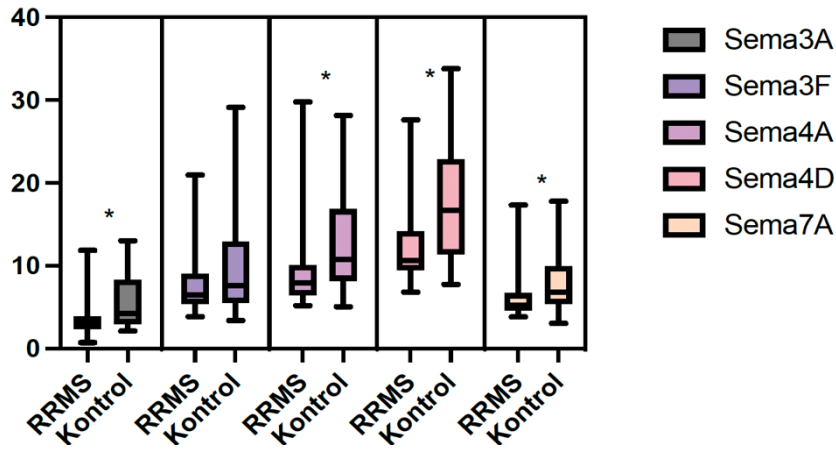
OKB bant sayısı			
	≥12	<12	P
Serum Sema3F	6,1 ± 2,03 5,61 (4,37 - 11,64)	7,32 ± 1,65 6,55 (4,74 - 9,66)	0.034
Serum Sema4A	7,37 ± 1,43 7,51 (5,17 - 10,16)	11,2 ± 6,42 9,11 (5,74 - 29,79)	0.013
Serum Sema7A	4,85 ± 0,94 4,54 (3,86 - 7,01)	6,91 ± 3,5 5,81 (4,42 - 17,31)	0.011
IgG indeksi			
	≥0.7	<0.7	P
Serum Sema4D	13,94 ± 5,48 11,99 (9,18 - 27,63)	10,28 ± 2,49 9,55 (6,82 - 16,01)	0.006
BOS Sema4D	13,93 ± 3,47 14,63 (3,1 - 19,95)	11,28 ± 4,23 12,99 (3,23 - 16,58)	0.023
İnfratentorial lokalizasyon			
	Var	Yok	P
Serum Sema4A	8,56 ± 5,38 7,19 (5,17 - 29,79)	9,72 ± 3,18 8,54 (5,94 - 17,17)	0.049
BOS Sema4A	11,43 ± 2,28 11,81 (7,26 - 17,42)	10,11 ± 1,89 10,39 (6,91 - 13,59)	0.045

4.5. Semaforin 3A, 3F, 4A, 4D ve 7A'nın RRMS ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki farklılıkları ve tanısal değeri

RRMS ve sağlıklı kontrol grubu arasında serum semaforin düzeyleri karşılaştırıldı. Semaforin 3A, semaforin 4A, semaforin 4D ve semaforin 7A düzeyleri hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük saptandı (sırasıyla, $p < 0,001$, 0.002, 0.002 ve 0.024). (Tablo 10) ROC analizlerinde özellikle serum semaforin 4A ve 4D'nin yüksek sensitivite tanısal biyobelirteç potansiyeli saptandı. (Şekil)



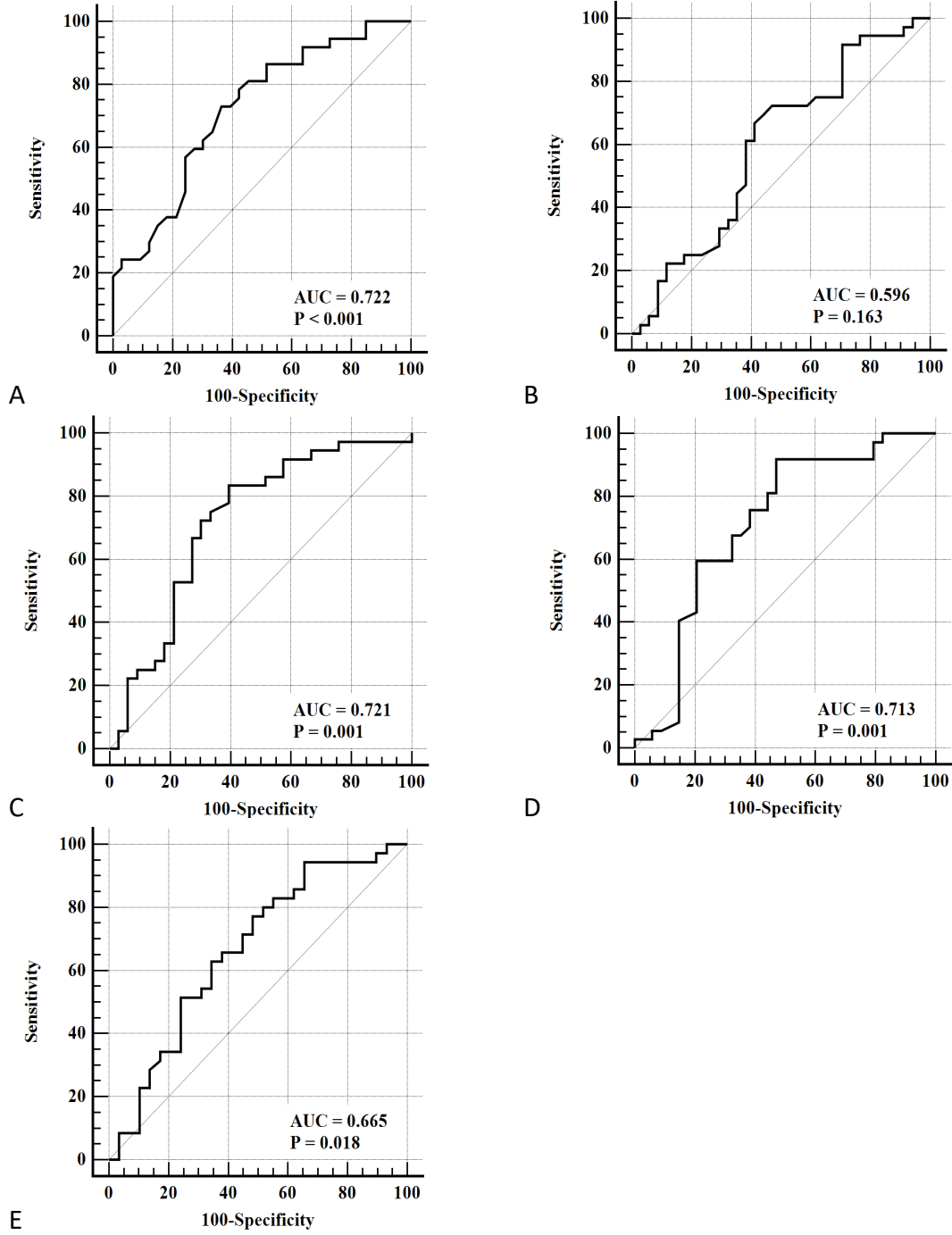
Şekil 2. RRMS hastalarının beyin omurilik sıvılarından elde edilen semaforin düzeyleri. Sınırlar, min-maks.



Şekil 3. RRMS ve kontrol grubu arasında serum semaforin düzeyi farklılıkları. Sınırlar, min-maks. *p<0.05

Tablo 10. RRMS ve kontrol grubu arasında serum semaforin düzeyi farklılıkları.

	RRMS	Kontrol	P
Sema3A	3.64 ± 2.39 2.99 (0.72- 11.84)	5.95 ± 3.63 4.26 (2.12-13.02)	0.001
Sema3F	7.67 ± 3.84 6.44 (3.85-20.94)	9.84 ± 6.13 7.57 (3.39-29.12)	0.165
Sema4A	9.11 ± 4.45 7.94 (5.17-29.79)	13.2594 ± 6.42 10.77 (5.06-28.16)	0.002
Sema4D	12.46 ± 4.81 10.66 (6.82-27.63)	18.19 ± 8.25 16.57 (7.76-33.79)	0.002
Sema7A	6.12 ± 2.61 5.24 (3.80-17.31)	7.85 ± 3.69 6.76 (3.05-17.79)	0.024



Şekil 4. Serum semaforinlerin tanısal biyobelirteç potansiyel analizleri.

- A: Serum Sema3A (AUC: 0.722, sensitivite: %72.97, spesifite: %63.64, p=0.0003)
 B: Serum Sema3F (AUC: 0.596, sensitivite: %66.67, spesifite: %58.82, p=0.1633)
 C: Serum Sema4A (AUC: 0.721, sensitivite: %83.33, spesifite: %60.61, p=0.0005)
 D: Serum Sema4D (AUC: 0.713 sensitivite: %91.89, spesifite: %52.94, p=0.0009)
 E: Serum Sema7A (AUC: 0.665 sensitivite: %77.14, spesifite: %51.72, p=0.0182)

5.TARTIŞMA

Semaforinler immün ilişki hastalıkların patogeneziinde rol alırlar. Patogenezi halen net olarak ortaya konamamış, kesin bir tanısal veya prognostik biyobelirteç saptanamamış olan Multipl Skleroz'da semaforinlerin rolü son yıllarda giderek artan ilgi konusudur.(Lotfi vd., 2021) Semaforinlerin immün modülasyon ve nörogelişimsel/nörodejeneratif süreçler ile bağlantısı çok sayıda araştırmaya konu olsa da multipl skleroz bağlamında sınırlı sayıda klinik araştırmaya rastlanmaktadır. Bu projede naif RRMS hastalarında semaforin düzeylerinin klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikler ile ilişkileri incelenmiştir.

İmmün hücre göçünü engelleyen fingolimod veya anti- α 4 β 1 integrin gibi tedavilerin MS'te relapsları önemli ölçüde önlediği bilinmektedir. Sema3A, eksikliği ile lenf düğümlerine bozulmuş DC göçüne neden olarak bozulmuş antijene özgü T hücre yanıtına yol açar. Böylelikle MS patogeneziine immün modülatör olarak katılabilir. Serum seviyesinin ve immün hücrelerde ekspresyonunun RRMS hastalarında azaldığı gösterilmiştir. (Eiza vd., 2022; Rezaeepoor vd., 2017) Ayrıca Sema3A, OPC'lerin MS'de demiyelinize lezyonlara göçünü engellediği gösterilmiştir. Bu nedenle, Sema3A/nöropilin-1/pleksin-A1 etkileşiminin farmakolojik olarak engellenmesi, hem immün hücre istilasını azaltarak hem de remiyelinasyonu artırarak yararlı rollere sahip olabilir. (Okuno vd., 2011) Klinik araştırmalarda RRMS hastalarında serum seviyelerinin düşük saptanmasının yanı sıra, enjeksiyon tedavisi altındaki RRMS hastalarında naif olanlara göre daha yüksek bulunmuştur. (Shapoori vd., 2020). Azalmasının relaps fazı için bir biyobelirteç potansiyeli olabileceği belirtilmiştir. (Rezaeepoor vd., 2017)

Çalışmamızda naif yeni tanı RRMS hastalarında BOS Sema3A için anlamlı sonuç yok iken serum Sema3A düzeyi literatür ile uyumlu olarak düşüktü. Bu durumun yeni tanıli hastalar için biyobelirteç potansiyeli vardı. Ancak diğer özellikler için serum veya BOS'ta anlamlı sonuç yoktu.

Sema3F ile ilgili literatürde bilgiler oldukça kısıtlıdır. Sema3A ile birlikte sinir sistemi gelişiminde aksonal rehberlik ipuçları olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Oligodendroglial hücreler için çekici bir sinyal üreten kemotaktik faktördür. MS'li hastaların beyinde ve deneysel demiyelinizasyon modellerinde glial ve nöronal ekspresyonunun yukarı regüle edildiği, dolayısıyla lezyonların remiyelinizasyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir.(Williams vd., 2007) Sema-3A ve Sema-4D'nin tam tersi etki ile Sema-3F'nin remiyelinizasyon sürecinde indükleyici rolü olduğu düşünülmektedir. (Lotfi vd., 2021)

Çalışmamızda serum Sema3F düzeyi tanısal olarak herhangi bir farklılık göstermedi. Alt grup analizlerinde RRMS hastalarında OKB sayısı >12 olanlarda daha düşük bir serum Sema3F düzeyi olmasına karşı bant sayısı ile herhangi bir korelasyon yoktu. Sadece tip2 OKB

saptanan hastalarda bant sayısı ölçüldüğü için küçük bir hasta grubundaki bu analizin muhtemelen klinik bir karşılığı yoktur. Sema3F ile ilgili kemoatraktan özelliğinden dolayı ham naif hem de immun trafik göçünü bloklayan tedavileri alan MS hastalarında serum ve BOS düzeylerinin ölçüldüğü, daha geniş hasta sayısı içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sema4A MS hastalarında serumda ve DC'lerin yüzeyinde artar. DC'den türetilmiş Sema4A Th1 ve Th17 hücre farklılaşması için kritiktir. Sema4A'nın diğer nörolojik hastalıklara göre MS hastalarında serum seviyelerinin daha yüksek olduğu, RRMS'te serum düzeyi artışının yüksek hastalık aktivitesi, Th17 hücresi varlığı, daha fazla özürülük skorları ve azalmış IFN- β ile tedavi yanıtı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Eiza vd., 2022; Koda vd., 2014; Nakatsuji, 2014; Nakatsuji vd., 2012)(Koda vd., 2020; Tatsusada Okuno; Toru Koda, 2014) Diğer taraftan Sema4A serum düzeyi yüksek hastaların hastalığın inflamasyon fazında etkin olan fingolimod tedavisine daha iyi yanıt verdiği belirtilmiştir.(Koda vd., 2018; Tatsusada Okuno) Ayrıca Sema4A'nın MS hastalarının BOS'unda tespit edilebildiğini ve oligodendrosit hücre ölümünü indükleyebileceği literatürde gösterilmiştir.(Chiou vd., 2018)

Sema4D özellikle immun sistem ilişkili hastalıklar için dikkat çeken bir semaforindir. Romatoid artrit, sistemik skleroz, psöriyas ve SLE gibi hastalıklarda incelenmiştir. Çeşitli deneysel çalışmalar Sema4D'nin multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneze katıldığını göstermiştir. EAE modellerinde mikroglia aktivasyonu, göçün engellenmesi, OPH farklılaşması ve kan-beyin bariyerinin endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantının tahrip olmasına neden olduğu bildirilmiştir.(Ito vd., 2015; Koda vd., 2014; Smith vd., 2015) Anti-Sema4D antikorlar uygulandığında ise nöroinflamasyonun önemli ölçüde inhibe olduğu ve miyelinleşme sürecinin geri kazanıldığı belirtilmiştir.(Okuno vd., 2011; Smith vd., 2015) Sema4D işlev inhibisyonu MS için potansiyel olarak değerli bir terapötik hedef olabilir.(Giraudon vd., 2004) Ancak Sema4D ile ilgili deneysel çalışmalar mevcut iken MS hastalarında yapılmış çalışmalar azdır. Bir çalışmada MS hastalarında T lenfositlerde artmış Sema4D seviyesi, B lenfositlerinde azalmış Sema4D reseptör ekspresyonu ile hastalık gelişimi ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır.(Kuklina vd., 2014)

Çalışmamızda serum Sema4A daha düşüktü. Ek olarak bu düşüklük ile OKB bant sayısı, periventriküler lezyon sayısı ve infratentorial lezyon varlığı ile negatif ilişkili idi. BOS düzeylerine baktığımızda ise infratentorial lezyon varlığı ve sayısı ile pozitif bir ilişki saptadık. Sema4A hakkındaki bilgiler Th farklılaşması ve Treg hücrelerinin stabilitesi ile ön planda inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlarda serum düzey düşüklüğü ile hastalık yükü arasındaki saptadığımız negatif ilişki bu durum ile çelişmektedir. Diğer taraftan sonuçlarımız Sema4A'nın infratentorial lezyon gelişimi ile zayıfta olsa ilişkili olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda serum Sema4D düzeyi de RRMS hastalarında kontrol grubuna göre daha düşüktü. Ancak hastalık başlangıcında IgG indeksi yüksek olan hastalarda hem

serum hem BOS'ta Sema4D daha yüksekti. Serum ve BOS Sema4D düzeyleri ile klinik veya radyolojik özellikler arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir.

Sema4A ve 4D ile ilgili elde ettiğimiz bu sonuçlar hastalığın erken döneminde inflamatuvar faz ile birlikte geliştiği bilinen dejeneratif süreçlere veya hasta grubumuzun nispeden küçük olmasına bağlı olabilir. Ayrıca her ne kadar korelasyonunu gösterememiş olsak da Sema4A serum düzeyinin BOS'a göre düşük olması perifer ile santral sinir sistemi arasındaki farklı ifade oranlarına ve bu sonuçlara etkisine işaret ediyor olabilir. RRMS tanısında Sema4D düzeyi sonuçlarımız literatür verileri ile çelişkili gibi görünse de hastalıkta tanısal değeri olan IgG indeksi ile ilişkili saptamış olmamız özellikle immun ilişkili durumlardan diğer nörolojik patolojilerin ayırımında yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda her iki semaforin için elde edilen sonuçlarımızın teyit edilmesi gerekir. Naif ve tedavi altındaki RRMS ve progresif MS'e dönüşen hastalarda bu semaforinlerin serumda, immun hücrelerde ve BOS'ta düzeylerinin araştırılması şeklinde planlanacak ileri çalışmalar hem bu sorunu aydınlatacak hem de T ve B hücre etkileşimleri ile gelişen MS immunpatogenezine muhtemel yeni bir ufuk açacaktır.

EAE'de sema7A hem MSS'de hem immun sistemde artar, inflamasyonu indükler, immün yanıtın modülasyonu ve nörodejenerasyonda rol oynar.(Gutierrez-Franco vd., 2016; Okuno vd., 2011) Sema7A eksikliğinin koruyucu olabileceği deneysel olarak gösterilmiş, değerli bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir.(Gutierrez-Franco vd., 2017; Okuno vd., 2011; Suzuki vd., 2007) Ancak MS hastalarından ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler çelişkilidir. MS/KİS hastalarında kontrollere kıyasla BOS'ta azalmış olan diğer proteinler arasında sema7A'nın da bulunduğu saptanmıştır.(Mosleth vd., 2021) MS'e dönüşen KİS hastalarında da BOS düzeylerinin daha az olduğu, hastalık başlangıcında ve bir yıllık takipte lezyon sayısı ile negatif ilişkili olduğu belirtilmiş ve Bos seviyesi düşüklüğünün kesin MS'e dönüşüm için biyobelirteç potansiyeli olabileceği vurgulanmıştır.(Canto vd., 2014) Ayrıca immunmodülatör tedavi alanlarda tedavisiz naif RRMS hastalarına göre gen ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (Shapoori vd., 2020) Diğer taraftan PML, MS ve serebral enfarktüs hastaları üzerinde yapılmış bir çalışmada ise sema3A ve sema7A incelenmiş, MS lezyonlarının inflamatuvar aktivitesi ile korelasyon gösterdikleri, belirtilmiştir.(Costa vd., 2015)

Çalışmamızda serum Sema7A düzeyi diğer semaforinlerde saptadığımız gibi kontrol grubuna göre RRMS'te daha düşüktü. Klinik olarak RRMS hastalarının kognitif test puanları ile pozitif korelasyon gösterdi. BOS immünolojik analizinde ise OKB sayısı ile serum düzeyi negatif, BOS düzeyi ise pozitif korelasyona sahipti ve bant sayısı >12 olan hastalarda serum düzeyi daha düşüktü. Literatürde Sema7A hakkında veriler çelişkili olsa da sonuçlarımız

serumda azalmış BOS'ta artmış Sema7A'nın inflamatuvar immün aktivasyon ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Katılımcı sayısının nispeten düşük olması ve sağlık kontrol grubunda BOS düzeylerinin çalışılmamış olması bu çalışmanın önemli bir kısıtlılığıdır. OKB bant sayısının sadece tip2 hastalarda ölçülmüş olması nedeni ile bu analizler küçük bir hasta grubunu yansıtmaktadır. Bu bağlamda Naif, tedavi altında RRMS ve progresif MS tanılı daha fazla hastada yapılacak serum, immün hücreler ve BOS semaforin analizlerini içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Multipl skleroz'da immün semaforinler hakkında çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Diğer çalışmalara paralel olarak Sema3A serum düzeyi düşüklüğünün RRMS için tanısal önemi olabileceğini ve biyobelirteç potansiyelini tekrar teyit ediyoruz. Çok az bilgiye sahip olduğumuz Sema3F hakkında bu çalışma kapsamında da anlamlı bulgu saptanmadı. Literatürde farklı sonuçlar bildirilen Sema7A hakkında ise azalmış serum düzeyi ve artmış BOS düzeylerinin inflamatuvar immün aktivasyon ile ilişkili olabileceğini vurguluyoruz. Diğer taraftan literatürden farklı olarak saptadığımız serum Sema4A ve Sema4D düzeylerinin düşüklüğü çalışmamızın kısıtlılıklarından kaynaklanmış olabilir. Bu bağlamda nedensellik oluşturabilmek için serum, immün hücreler ve BOS semaforin analizlerini de içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuçlarımız ileride planlanacak MS-semaforin ilişkisine odaklanan daha kapsamlı çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

7.KAYNAKLAR

Alto, L. T., Terman, J. R. 2017. "Semaphorins and their signaling mechanisms". *Methods in Molecular Biology*, 1493, 1–25.

Cantó, E., Tintoré, M., Villar, L. M., Borrás, E., Álvarez-Cermeño, J. C., Chiva, C., ... Comabella, M. 2014. "Validation of semaphorin 7A and α - β -hisdipeptidase as biomarkers associated with the conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis". *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–9.

Costa, C., Martínez-Sáez, E., Gutiérrez-Franco, A., Eixarch, H., Castro, Z., Ortega-Aznar, A., ... Espejo, C. 2015. "Expression of semaphorin 3A, semaphorin 7A and their receptors in multiple sclerosis lesions". <http://dx.doi.org/10.1177/1352458515599848>, 21(13), 1632–1643.

Dobson, R., Giovannoni, G. 2019. "Multiple sclerosis – a review". *European Journal of Neurology*, 26(1), 27–40.

Eiza, N., Garty, M., Staun-Ram, E., Miller, A., Vadasz, Z. 2022. "The possible involvement of sema3A and sema4A in the pathogenesis of multiple sclerosis". *Clinical Immunology*, 238, 109017.

- Evans, C., Beland, S. G., Kulaga, S., Wolfson, C., Kingwell, E., Marriott, J., ... Marrie, R. A. 2013. "Incidence and Prevalence of Multiple Sclerosis in the Americas: A Systematic Review". *Neuroepidemiology*, 40(Hutchison vd.), 195–210.
- Fard, D., Tamagnone, L. 2021. "Semaphorins in health and disease". *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 57, 55–63.
- Giraudon, P., Vincent, P., Vuillat, C., Verlaeten, O., Cartier, L., Marie-Cardine, A., ... Bousmell, L. 2004. "Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(Given vd.), 1246–1255.
- Gutiérrez-Franco, A., Costa, C., Eixarch, H., Castillo, M., Medina-Rodríguez, E. M., Bribián, A., ... Espejo, C. 2016. "Differential expression of sema3A and sema7A in a murine model of multiple sclerosis: Implications for a therapeutic design". *Clinical Immunology*, 163, 22–33.
- Hauser, S. L., Cree, B. A. C. 2020. "Treatment of Multiple Sclerosis: A Review". *The American journal of medicine*, 133(12), 1380.
- Kamińska, J., Koper, O. M., Piechal, K., Kemon, H. 2017. "Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential". *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 71(0), 551–563.
- Klineova, S., Lublin, F. D. 2018. "Clinical Course of Multiple Sclerosis". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(9), a028928.
- Koda, T., Namba, A., Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Sugimoto, T., Sakakibara, K., ... Okuno, T. 2020. "Sema4A is implicated in the acceleration of Th17 cell-mediated neuroinflammation in the effector phase". *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–9.
- Koda, T., Namba, A., Nakatsuji, Y., Niino, M., Miyazaki, Y., Sugimoto, T., ... Okuno, T. 2018. "Beneficial effects of fingolimod in MS patients with high serum Sema4A levels". *PLOS ONE*, 13(Hutchison vd.), e0193986.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E. S., ... Kikutani, H. 2002. "Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2". *Nature* 2002 419:6907, 419(6907), 629–633.
- Kumanogoh, A., Suzuki, K., Ch'ng, E., Watanabe, C., Marukawa, S., Takegahara, N., ... Kikutani, H. 2002. "Requirement for the Lymphocyte Semaphorin, CD100, in the Induction of Antigen-Specific T Cells and the Maturation of Dendritic Cells". *The Journal of Immunology*, 169(Hutchison vd.), 1175–1181.
- Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C. F. 2007. "The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview". *Brain Pathology*, 17(Given vd.), 210–218.
- Lotfi, R., Nasiri Kalmarzi, R., Rajabinejad, M., Hasani, S., Zamani, F. 2021. "The role of immune semaphorins in the pathogenesis of multiple sclerosis: Potential therapeutic targets". *International Immunopharmacology*, 95, 107556.
- Majed, H. H., Chandran, S., Niclou, S. P., Nicholas, R. S., Wilkins, A., Wing, M. G., ... Compston, A. 2006. "A Novel Role for Sema3A in Neuroprotection from Injury Mediated by Activated Microglia". *The Journal of Neuroscience*, 26(6), 1730.

- Maleki, K. T., Cornillet, M., Björkström, N. K. 2016. "Soluble SEMA4D/CD100: A novel immunoregulator in infectious and inflammatory diseases". *Clinical Immunology*, 163, 52–59.
- Nakatsuji, Y., Okuno, T., Moriya, M., Sugimoto, T., Kinoshita, M., Takamatsu, H., ... Kumanogoh, A. 2012. "Elevation of Sema4A Implicates Th Cell Skewing and the Efficacy of IFN- β Therapy in Multiple Sclerosis". *The Journal of Immunology*, 188(10), 4858–4865.
- Okuno, T., Nakatsuji, Y., Moriya, M., Takamatsu, H., Nojima, S., Takegahara, N., ... Kumanogoh, A. 2010. "Roles of Sema4D-plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis". *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184(Hutchison vd.), 1499–1506.
- Öztürk, S., Aytaç, G., Kızılay, F., Sindel, M. 2017. "Multipl Skleroz". *Akdeniz Medical Journal*, 3(Hutchison vd.), 137–147.
- Piaton, G., Aigrot, M. S., Williams, A., Moyon, S., Tepavcevic, V., Moutkine, I., ... Lubetzki, C. 2011. "Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system". *Brain*, 134(4), 1156–1167.
- Shapoori, S., Mosayebi, G., Ebrahimi Monfared, M., Ghazavi, A., Khansarinejad, B., Farahani, I., Ganji, A. 2020. "Gene expression of semaphorin-3A, semaphorin-7A, neuropilin-1, plexin-C1, and β 1 integrin in treated-multiple sclerosis patients". <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1774211>, 42(9), 783–788.
- Smith, E. S., Jonason, A., Reilly, C., Veeraraghavan, J., Fisher, T., Doherty, M., ... Zauderer, M. 2015. "SEMA4D compromises blood–brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease". *Neurobiology of Disease*, 73, 254–268.
- Vogler, M., Oleksy, A., Schulze, S., Fedorova, M., Kojonazarov, B., Nijjar, S., ... Worzfeld, T. 2022. "An antagonistic monoclonal anti–Plexin-B1 antibody exerts therapeutic effects in mouse models of postmenopausal osteoporosis and multiple sclerosis". *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102265.
- Warren, S., Warren, K. G. 2001. "Multiple sclerosis". World Health Organization. Tarihinde adresinden erişildi <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42394>
- Williams, A., Piaton, G., Aigrot, M. S., Belhadi, A., Théaudin, M., Petermann, F., ... Lubetzki, C. 2007. "Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis?". *Brain*, 130(10), 2554–2565.
- World Health Organization. 2008. "Atlas : multiple sclerosis resources in the world 2008". (World Health Organization, Ed.). World Health Organization. Tarihinde adresinden erişildi <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43968>
- Yamaguchi, W., Tamai, R., Kageura, M., Furuyama, T., Inagaki, S. 2012. "Sema4D as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development". *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(Hutchison vd.), 290–299.
- Canto, E., Tintore, M., Villar, L. M., Borrás, E., Alvarez-Cermeno, J. C., Chiva, C., Sabido, E., Rovira, A., Montalban, X., & Comabella, M. (2014). Validation of semaphorin 7A and α -beta-his-dipeptidase as biomarkers associated with the conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 11, 181.

- Chiou, B., Lucassen, E., Sather, M., Kallianpur, A., & Connor, J. (2018). Semaphorin4A and H-ferritin utilize Tim-1 on human oligodendrocytes: A novel neuro-immune axis. *Glia*, *66*(7), 1317-1330.
- Costa, C., Martinez-Saez, E., Gutierrez-Franco, A., Eixarch, H., Castro, Z., Ortega-Aznar, A., Ramon, Y. C. S., Montalban, X., & Espejo, C. (2015). Expression of semaphorin 3A, semaphorin 7A and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Mult Scler*, *21*(13), 1632-1643.
- Eiza, N., Garty, M., Staun-Ram, E., Miller, A., & Vadasz, Z. (2022). The possible involvement of sema3A and sema4A in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol*, *238*, 109017.
- Giraudon, P., Vincent, P., Vuillat, C., Verlaeten, O., Cartier, L., Marie-Cardine, A., Mutin, M., Bensussan, A., Belin, M. F., & Boumsell, L. (2004). Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells. *J Immunol*, *172*(2), 1246-1255.
- Given, C. A., 2nd, Stevens, B. S., & Lee, C. (2004). The MRI appearance of tumefactive demyelinating lesions. *AJR Am J Roentgenol*, *182*(1), 195-199.
- Gutierrez-Franco, A., Costa, C., Eixarch, H., Castillo, M., Medina-Rodriguez, E. M., Bribian, A., de Castro, F., Montalban, X., & Espejo, C. (2016). Differential expression of sema3A and sema7A in a murine model of multiple sclerosis: Implications for a therapeutic design. *Clin Immunol*, *163*, 22-33.
- Gutierrez-Franco, A., Eixarch, H., Costa, C., Gil, V., Castillo, M., Calvo-Barreiro, L., Montalban, X., Del Rio, J. A., & Espejo, C. (2017). Semaphorin 7A as a Potential Therapeutic Target for Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*, *54*(6), 4820-4831.
- Hutchison, E. R., Kawamoto, E. M., Taub, D. D., Lal, A., Abdelmohsen, K., Zhang, Y., Wood, W. H., 3rd, Lehrmann, E., Camandola, S., Becker, K. G., Gorospe, M., & Mattson, M. P. (2013). Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia*, *61*(7), 1018-1028.
- Ito, D., Nojima, S., Nishide, M., Okuno, T., Takamatsu, H., Kang, S., Kimura, T., Yoshida, Y., Morimoto, K., Maeda, Y., Hosokawa, T., Toyofuku, T., Ohshima, J., Kamimura, D., Yamamoto, M., Murakami, M., Morii, E., Rakugi, H., Isaka, Y., & Kumanogoh, A. (2015). mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8+ T Cells. *J Immunol*, *195*(3), 934-943.
- Koda, T., Namba, A., Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Sugimoto, T., Sakakibara, K., Tada, S., Shimizu, M., Yamashita, K., Takata, K., Ishikura, T., Murata, S., Beppu, S., Kumanogoh, A., Mochizuki, H., & Okuno, T. (2020). Sema4A is implicated in the acceleration of Th17 cell-mediated neuroinflammation in the effector phase. *J Neuroinflammation*, *17*(1), 82.
- Koda, T., Namba, A., Nakatsuji, Y., Niino, M., Miyazaki, Y., Sugimoto, T., Kinoshita, M., Takata, K., Yamashita, K., Shimizu, M., Fukazawa, T., Kumanogoh, A., Mochizuki, H., & Okuno, T. (2018). Beneficial effects of fingolimod in MS patients with high serum Sema4A levels. *PLoS One*, *13*(3), e0193986.
- Koda, T., Okuno, T., Takata, K., Honorat, J. A., Kinoshita, M., Tada, S., Moriya, M., Sakoda, S., Mochizuki, H., Kumanogoh, A., & Nakatsuji, Y. (2014). Sema4A inhibits the therapeutic effect of IFN-beta in EAE. *J Neuroimmunol*, *268*(1-2), 43-49.

- Kuklina, E. M., Baidina, T. V., Danchenko, I. Y., & Nekrasova, I. V. (2014). Semaphorin Sema4D in the immune system in multiple sclerosis. *Bull Exp Biol Med*, 157(2), 234-237.
- Lotfi, R., Nasiri Kalmarzi, R., Rajabinejad, M., Hasani, S., & Zamani, F. (2021). The role of immune semaphorins in the pathogenesis of multiple sclerosis: Potential therapeutic targets. *Int Immunopharmacol*, 95, 107556.
- Mosleth, E. F., Vedeler, C. A., Liland, K. H., McLeod, A., Bringeland, G. H., Kroondijk, L., Berven, F. S., Lysenko, A., Rawlings, C. J., Eid, K. E., Opsahl, J. A., Gjertsen, B. T., Myhr, K. M., & Gavasso, S. (2021). Cerebrospinal fluid proteome shows disrupted neuronal development in multiple sclerosis. *Sci Rep*, 11(1), 4087.
- Nakatsuji, Y. (2014). [Sema4A as a biomarker predicting responsiveness to IFN beta treatment]. *Rinsho Shinkeigaku*, 54(12), 972-974.
- Nakatsuji, Y., Okuno, T., Moriya, M., Sugimoto, T., Kinoshita, M., Takamatsu, H., Nojima, S., Kimura, T., Kang, S., Ito, D., Nakagawa, Y., Toyofuku, T., Takata, K., Nakano, M., Kubo, M., Suzuki, S., Matsui-Hasumi, A., Uto-Konomi, A., Ogata, A., . . . Kumanogoh, A. (2012). Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN-beta therapy in multiple sclerosis. *J Immunol*, 188(10), 4858-4865.
- Okuno, T., Nakatsuji, Y., & Kumanogoh, A. (2011). The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS Lett*, 585(23), 3829-3835.
- Rezaeepoor, M., Shapoori, S., Ganjalikhani-Hakemi, M., Etemadifar, M., Alsahebhosoul, F., Eskandari, N., & Mansourian, M. (2017). Decreased expression of Sema3A, an immune modulator, in blood sample of multiple sclerosis patients. *Gene*, 610, 59-63.
- Shapoori, S., Mosayebi, G., Ebrahimi Monfared, M., Ghazavi, A., Khansarinejad, B., Farahani, I., & Ganji, A. (2020). Gene expression of semaphorin-3A, semaphorin-7A, neuropilin-1, plexin-C1, and beta1 integrin in treated-multiple sclerosis patients. *Neurological Research*, 42(9), 783-788.
- Smith, E. S., Jonason, A., Reilly, C., Veeraraghavan, J., Fisher, T., Doherty, M., Klimatcheva, E., Mallow, C., Cornelius, C., Leonard, J. E., Marchi, N., Janigro, D., Argaw, A. T., Pham, T., Seils, J., Bussler, H., Torno, S., Kirk, R., Howell, A., . . . Zauderer, M. (2015). SEMA4D compromises blood-brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis*, 73, 254-268.
- Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R. J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P. D., Kolodkin, A. L., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2007). Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature*, 446(7136), 680-684.
- Tatusada Okuno, T. I., Makoto Kinoshita, Yuji Nakatsuji, Atsushi Kumanogoh, Hideki Mochizuki. Semaphorin 4A as a biomarker of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 10(1), 18-26.
- Toru Koda, T. O., Yuji Nakatsujia, Kazushiro Takataa, Josephe Archie Honorata, Akiko Nambaa, Saburo Sakodab, Atsushi Kumanogohc, Hideki Mochizukia. (2014). Investigation of Sema4A as a biomarker for treatment selection for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 275(1), 20-21.

Williams, A., Piaton, G., Aigrot, M. S., Belhadi, A., Theaudin, M., Petermann, F., Thomas, J. L., Zalc, B., & Lubetzki, C. (2007). Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain*, 130(Pt 10), 2554-2565.