







ÇUHA ÇİÇEĞİ VE SARI KANTARON YAĞLARININ MULTİPLE SKLEROZ MODELİ OLUŞTURULMUŞ FARELERDEKİ JAK/STAT SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ

The Effect of Evening Primrose and St. John's Wort Oils on Jak/STAT Signaling Pathways in Mice with Multiple Sclerosis Modeled

Huri BULUT¹ , Emine Şeyda TELOĞLU² , Hilal ŞENTÜRK¹ , Savaş ÜSTÜNOVA³ ,
Zozan GÜLEKEN⁴ , Şahabettin SELEK⁵ 

¹İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D., İSTANBUL, TÜRKİYE

²Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D., İSTANBUL, TÜRKİYE

³Bezmi Vakıf Alem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., İSTANBUL, TÜRKİYE

⁴Üsküdar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., İSTANBUL, TÜRKİYE

⁵Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D., İSTANBUL, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Amaç: Multipl Skleroz, merkezi sinir sisteminde inflamatuvar infiltrasyonlarla ilerleyen otoimmün demiyelinizan bir hastalıktır. JAK-STAT sinyal yolunun düzensizliği, otoimmün ensefalomyelit ile indüklenmiş Multipl Skleroz modellerinin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmanın amacı, sarı kantaron ve çuha çiçeği yağlarının tüketiminin, JAK-STAT sinyal yolu üzerindeki terapötik etkilerini ortaya çıkarmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda 42 adet dokuz haftalık C57bl/6 J fareler kullanıldı. Fareler, Multipl Skleroz (MS) (n=32) ve kontrol grubu (n=10) olmak üzere iki ana gruba ayrıldıktan sonra MS grubundaki tüm farelere deneysel otoimmün ensefalomyelit yöntemi ile Multipl Skleroz hastalığı oluşturuldu. Multipl Skleroz grubu kendi içinde MS (n=7), MS + Çuha çiçeği (n=10) ve MS + Sarı Kantaron (n=15) olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Tedavi grupları, 6 hafta boyunca sarı kantaron (20 g/kg) ve çuha çiçeği (20 g/kg) yağları içeren özel üretim yemler ile beslendi. Multipl Skleroz indüksiyonundan iki hafta sonra, hastalığın klinik belirtileri her fare için günlük olarak puanlandı. Çalışmamızın sonunda beyin dokusu örneklerini elde etmek için tüm gruplardaki fareler kurban edildi. Beyin doku homojenatlarında Western Blot yöntemi ile JAK2, p-JAK2, STAT1 ve p-STAT1 protein ekspresyon seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Çalışmamızda Multipl Skleroz hastalığı patogenezi ile ilişkili JAK/STAT yolundaki p-JAK2, JAK2, p-STAT1 ve STAT1 ekspresyon düzeylerinin MS grubunda kontrollere göre anlamlı olarak arttığını, sarı kantaron ve çuha çiçeği yağı ile beslenen gruplarda ise anlamlı olarak azaldığını gösterdik (p<0.05).

Sonuç: Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ışığında, özellikle çuha çiçeği ve sarı kantaron yağlarının besin takviyesi olarak tüketilmesinin, Multipl Skleroz hastalığının moleküler patogenezinin iyileşmesine katkı sağlayacağı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Multiple skleroz, çuha çiçeği (*Oenothera biennis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), JAK/STAT sinyal yolağı

Objective: Multiple Sclerosis is an autoimmune demyelinating disease that progresses with inflammatory infiltrates in the central nervous system. Dysregulation of the JAK-STAT signaling pathway plays an important role in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis-induced Multiple Sclerosis models. The aim of this study was to reveal the therapeutic effects of the consumption of St. John's Wort and evening primrose oils on the JAK-STAT signaling pathway.

Material and Methods: In our study, 42 nine-week-old C57bl/6 J mice were used and divided into two groups as Multiple Sclerosis (MS) (n = 32) and control group (n = 10). MS group was divided into three groups as MS (n=7), MS + evening primrose oil (n=10) and MS + St. John's Wort oil (n= 15). All groups except the control group were immunized by experimental autoimmune encephalomyelitis methods. Treatment groups were fed special feeds containing 20 g/kg St. John's Wort and 20 g/kg evening primrose oils for 6 weeks. Two weeks after Multiple Sclerosis induction, clinical signs of disease were scored daily for each mouse. Brain tissue samples were collected for measurement of JAK2, p-JAK2, STAT1 and p-STAT1 protein expression level by Western blot method.

Results: We showed that the expression levels of p-JAK2, JAK2, p-STAT1 and STAT1 in the JAK/STAT pathway associated with the pathogenesis of Multiple Sclerosis disease increased significantly in the Multiple Sclerosis group compared to the controls and decreased significantly in the groups fed with St. John's wort and evening primrose oil (p<0.05).

Conclusion: In the light of the data, consumption of evening primrose and alternatively St. John's wort oils as nutritional supplements may contribute to the improvement of the molecular pathogenesis of Multiple Sclerosis disease.

Keywords: Multiple sclerosis, evening primrose (*Oenothera biennis*), St. John's wort (*Hypericum perforatum*), JAK/STAT signaling pathway



Yazışma Adresi / Correspondence:

İstinye Üniversitesi Topkapı Kampüsü, Maltepe Mh., Teyyareci Sami Sk., No:3 Zeytinburnu, İSTANBUL, TÜRKİYE

Tel / Phone: +90 530 0660420

Geliş Tarihi / Received: 23.08.2021

Dr. Huri BULUT

E-posta / E-mail: huri.bulut@istinye.edu.tr

Kabul Tarihi / Accepted: 11.01.2022

GİRİŞ

Multipl Skleroz (MS), daha çok genç erişkinlerde görülen merkezi sinir sistemini etkileyen otoimmün demiyelinizan bir hastalıktır. Hastalığın etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, hastalığın patolojisinde genetik, epigenetik ve mikrobiyal çevresel faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. MS, akut inflamatuvar demiyelinizasyon, aksonal kayıp ve sınırlı remiyelinizasyon ile karakterize olup merkezi sinir sisteminde nörodejenerasyon alanlarının oluşturduğu plak adı verilen lezyonları oluşumuna sebep olur. MS hastalığının klinik semptomları (kas güçsüzlüğü, bulanık görme, baş dönmesi vb.) lezyonun yükü ve yerine göre çeşitlilik göstermekte olup, bu farklılıklara bağlı hastalığın 4 tipi bulunmaktadır. Bunlar, klinik izole sendrom, ataklarla seyreden tip, primer ilerleyici MS, sekonder ilerleyici MS'dir (1). Tanı, klinik öykü, nörolojik muayene, manyetik rezonans görüntüleme kombinasyonu ile yapılır. Ayrıca beyin omurilik sıvısının incelenmesi, uyarılmış potansiyellerin kaydı, mesane fonksiyonunun ürodinamik çalışmaları ve oküler koherens tomografi dahil olmak üzere diğer "paraklinik" testler, bireysel hastalar için tanı koymada yardımcı olabilir (2). Ancak hızlı tedavi kararları için erken tanıda kullanılacak biyobelirteçlere halen ihtiyaç vardır (3).

Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modeli, MS'in birçok klinik, nöropatolojik ve immünolojik yönünü iyi taklit edebilen bir hayvan modeli sistemidir (8). Birçok çalışmada farelerde EAE modeli oluşturulmuş ve MS hastalığının moleküler mekanizmasına ilişkin sonuçlar elde edilmiştir (4-6). Ayrıca, EAE, MS patofizyolojisinde rol alan birçok sitokin değişikliklerinin ve tedavi yöntemlerinin incelenmesinde oldukça önemli bir metottur (7,8).

Kılıç otu olarak da bilinen sarı kantaron (*Hypericum perforatum*) içeriğinde adiperforin, hiperisin, hiperforin, sekonder metabolitler (flavanoid, floroglusinol, ksantin)

gibi birçok bileşik bulundurmaktadır (9). Literatürde sarı kantaron ekstratlarının antidepresan, antiviral, antibakteriyel ve anti kanser etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (10). Sarı kantaron ekstratlarının, antidepresan aktivitelerinde rol oynayabilecek naftodiantronlar, fenilpropanlar, flavonol türevleri, biflavonlar, proantosiyanidinler, floroglusinoller, farklı amino asitler ve uçucu yağ bileşenleri gibi çok çeşitli bileşenleri içerdiği iyi bilinmektedir (9). Özellikle flavanoid bileşiklerin antioksidan özellikleri (antioksidan moleküller, son yörüngesinde eşleşmemiş elektronu bulunan kararsız yapıdaki reaktif oksijen türlerinden özellikle süperoksid radikaline elektron transfer ederek kararlı hale gelmelerine yardımcı olur), nörolojik hasarlarda oluşabilecek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebileceğinden, sarı kantaron ekstratlarının nöroprotektif olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde sarı kantaron ekstratlarının PC12 hücrelerinde hidrojen peroksid kaynaklı apoptozu azalttığı gösterilmiş bunun özellikle Parkinson ve Alzheimer hastalığında koruyucu etkisinin olabileceği bildirilmiştir (12-14). Sarı kantaron gibi benzer biyolojik aktiviteye sahip çuha çiçeği (*Oenothera biennis*), yüksek oranda doymamış yağ asidi içeren, önemli bir gamalinoleik asit, linoleik asit ve E vitamini kaynağıdır (6). Fenol içeriğinin yüksek olmasından dolayı nörolojik hastalıklarda koruyucu özelliği olabileceği bildirilmiştir (14). Geleneksel tıpta, küçük yanıklar, anksiyete ve hafif ila orta derecede depresyon gibi çeşitli bozuklukların tedavisinde kullanılan sarı kantaron ve çuha çiçeği yağlarının, son yıllarda nöroprotektif özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmeye başlanmıştır (10,15).

MS hastalığında immün sistem ile ilişkili birçok sinyal yolağının (JAK/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) (JAK/STAT), nükleer faktör-κB (NF-κB), hücre dışı sinyal düzenlemeli kinaz (ERK1/3), p38, Jun/Fos) bozukluğu vardır. Bunlardan JAK/STAT sinyal yolağında, immüniteyi başlatan ve immün cevabın oluşmasında rol alan birçok sitokin rol

almaktadır. MS de santral sinir sistemindeki aksonal hasarın temelinde JAK/STAT yolunun aşırı aktivasyonu ile indüklenen interferon-gama üreten Th1 hücreleri, interlökin-17 üreten Th-17 hücrelerinin aktivasyonu ve aşırı sitokin/kemokin üretimi yatmaktadır (16,17). JAK-STAT sinyal yolu, bir hücredeki proteinler arasındaki bir etkileşimler zinciridir ve bağışıklık, hücre bölünmesi, hücre ölümü ve tümör oluşumu gibi süreçlerde yer alır. Yolak proteinlerinden JAK proteininin JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK şeklinde; STAT proteini ise STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olarak sınıflandırılır. Yolak, bir hücrenin dışındaki kimyasal sinyallerden hücre çekirdeğine bilgi iletir, bu da transkripsiyon adı verilen bir süreç yoluyla genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Sinyal yolaklarının otoimmün hastalıklarla ilişkisinin ortaya konulması bu yolaklar üzerinden etki edecek yeni farmakolojik terapilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (18).

Daha önceki çalışmamızda, MS modeli oluşturduğumuz C57BL/6 J farelerde, çuha çiçeği yağı ve sarı kantaron yağı ile beslenmenin MS hastalığında görülen miyelin kaybı ve amiloid birikiminin zayıflaması üzerinde faydalı etkilerinin olduğunu gösterdik. Çalışmada sarı kantaron ve çuha çiçeği yağlarının, MS'li hayvanların beyin dokusunda artan ve amiloid plaklardan sorumlu miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ve miyelin bağlanma proteini (MBP) değerlerini kontrol grubuna yaklaştırdığını bulduk (MS grubu MOG: 2.93±1.06 ng/ml, MS+sarı kantaron grubu MOG: 3.31±1.17 ng/ml, MS+çuha çiçeği grubu MOG: 2.97±1.20 ng/ml, kontrol grubu MOG: 3.76±0.34 ng/ml; MS grubu MBP: 5.24±1.58 ng/ml, MS+sarı kantaron grubu MBP: 5.81±1.68 ng/ml, MS+çuha çiçeği grubu MBP: 5.93±1.50 ng/ml, kontrol grubu MBP: 6.47±1.36 ng/ml) (19). Bunun dışında her iki bitki yağ özleri ile beslenmenin, MS'li hayvanların beyin dokusu homojenat örneklerinde total oksidatif stres seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi değerlerini anlamlı derecede düşürdüğünü ve total antioksidan seviyelerini

(TAS) ise anlamlı derece artırdığını gösterdik. Ayrıca MS grubunda vasküler duvarlarda, nöronların sitoplazmasında ve hücreler arası boşlukta amiloid birikimi gözlemledik. Sarı kantaron ve çuha çiçeği yağları ile tedavi edilen gruplarda ise anormal amiloid birikimi ve bariz hücre infiltrasyonu gözlenmedi (19).

Hem sarı kantaron hem de çuha çiçeği içerdikleri organik bileşikler özellikle yüksek fenolik içeriklerinden dolayı benzer biyolojik aktiviteye sahiptirler. Bu iki bitki türünün ekstrat ve yağlarının nörolojik hastalıklarda koruyucu ve tedavi amacıyla kullanımı son yıllarda araştırılmaktadır. Ancak etki mekanizmalarının benzer sinyal yolakları üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği henüz bilinmemektedir. Gerçekleştirdiğimiz bir önceki çalışmada her iki bitki türünün yağları ile beslenmenin MS hastalığının, histopatolojik ve biyokimyasal bulgularda iyileşmeye sebep olduğunu gösterdik (19). JAK/STAT sinyal yolu MS hastalığı patogenezi ile literatürde ilişkilendirilmesine rağmen yaptığımız çalışmada her iki tedavi grubunda bu iyileşmenin hangi sinyal yolağı üzerinden etkisinin ortaya çıktığı araştırılmamış idi. Bu sebeple bu çalışmada, kimyasal içerik ve etkileri benzer olan sarı kantaron ve çuha çiçeği yağları ile beslenmenin, JAK/STAT yolağındaki protein düzeylerindeki değişimlerin araştırılması hedeflenmiştir. Literatürde benzer bir çalışma bulunmadığından, her iki bitki yağının MS hastalığındaki iyileştirici etki mekanizması gösterilmiş olunacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan Deneyle

Çalışmada gerçekleştirilen deney protokolü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyle Yererel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 22.04.2016, sayı No:2016/116). C57BL/6 J fareler (n=42), Boğaziçi Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından (İstanbul, Türkiye) satın alındı. Fareler, 12 saat aydınlık 12 saat

karanlık döngüsüne sahip, kontrollü aydınlatma ve sıcaklığın sağlandığı (22 °C), yiyecek ve suya istenildiği zaman erişimi olan Bezmialem Üniversitesinin deney hayvanı laboratuvarlarında barındırıldı. C57BL/6 J fareler (n=42), MS (n = 32) ve kontrol grubu (n=10) olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Ayrıca MS grubu kendi içinde; MS (n=7), MS + çuha çiçeği yağı (n=10) ve MS + sarı kantaron yağı (n=15) olacak şekilde üç gruba ayrıldı. MS indüksiyonu için EAE modeli daha önce açıklandığı gibi kontrol grubu dışındaki tüm gruplara uygulandı (24). Kısaca, 200 mg MOG35-55 peptidi (Hooke Kit™ MOG35-55/CFA Emulsion PTX; Hooke lab. Inc., Lawrence MA) eşit hacimlerde MOG ve 10 mg/ml ısıyla öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra; Difco Adjuvant H37Ra, Fisher Scientific Ltd., Loughborough, LE11 5RG, UK) ile desteklenmiş tam Freund adjuvanından (CFA) oluşan 200 µl'lik bir solüsyon her fareye deri altından enjekte edildi (20). MOG enjeksiyonunun yapıldığı gün 0. gün olarak kabul edildi. Bağışıklamadan iki saat sonra ve 1. günde farelere intraperitoneal olarak (i.p.) 500 ng boğmaca toksini enjekte edildi. (Hooke Kit™ MOG35-55/CFA Emulsion PTX; Hooke lab. Inc.). MS indüksiyonundan iki hafta sonra, hastalığın klinik belirtileri günlük olarak şu şekilde puanlandı: 0, belirti yok; 1, kuyruk zayıflığı veya hafif sakar yürüyüş; 2, kuyruk felci ve/veya orta derecede sakar yürüyüş ve/veya hafif arka uzuv zayıflığı; 3, orta ila şiddetli arka uzuv felci veya hafif ön ayak zayıflığı veya her ikisi; 4, tam arka uzuv felci veya orta ila şiddetli ön ayak zayıflığı veya her ikisi; 5, kuadripleji veya can çekişen durum; 6, altı haftalık deney süresi boyunca ölümün gerçekleşmesi.

Sarı Kantaron ve Çuha Çiçeği Yağlarının Uygulanması

Bitki yağı tedavi uygulaması, enjeksiyondan iki hafta sonra başlatıldı. Altı hafta boyunca MS+çuha çiçeği grubundaki fareler, 20 g/kg çuha çiçeği yağı içeren özel olarak üretilmiş yem ile (MBD Yem Ticaret Ltd Şti, Türkiye); MS+sarı kantaron grubundaki fareler 20 g/kg sarı kantaron yağı içeren özel olarak üretilmiş yem ile;

kontrol ve MS gruplarındaki fareler ise normal yem ile beslendi (6). Çalışmanın sonunda tüm farelerden genel anestezi altında (35 mg/kg ketamin ve 80 mg/kg ksilazin kullanılarak) tüm beyin dokusu örnekleri alındı. Doku örnekleri analize kadar -80°C'de derin dondurucuda (Haier Co., Louisville, KY) saklandı.

Doku Örneklerinin Homojenizasyonu ve Total Protein Tayini

C57BL/6 J farelerden (n=42) elde edilen beyin doku örneklerinin homojenizasyonu, Ripa lizis tamponu (Merck, kat no:20118, ABD) kullanılarak homojenizasyon cihazında (MP Biomedical Fast Prep 24, Güney Kore) 30 m/s'de 5 dakika muamele edilerek yapıldı. Total protein miktar tayini için bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanıldı. Kısaca, sığır serum albümin proteini standart olarak hazırlandı (200-1000 µg/ml). Elde edilen beyin doku homojenatları sırasıyla 25 µl olacak şekilde mikropiplara pipetlendi. Ardından üzerlerine 200 µl BCA solüsyonu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma) eklendi. Mikropiplak, 30 dakika 37 °C'de inkübasyonun ardından spektrofotometrede (Thermo Scientific, Varioscans, ABD) 570 nm'de okundu. Örnekler için protein konsantrasyonları, lineer grafik kullanılarak mg/ml olacak şekilde hesaplandı.

Her bir grup (kontrol, MS (hasta), MS+çuha çiçeği ve MS+sarı kantaron) için total protein konsantrasyonu 40 µg protein içerecek şekilde havuzlama yapıldı. Böylece havuzlama sonunda Western blot ölçümleri için 4 adet numune elde edildi.

Western Blot Analizi

Çalışma gruplarına ait homojenatlardaki JAK-STAT sinyal yolağındaki protein ekspresyon düzeyleri Western blot analizi ile ölçüldü. Western blot yönteminde protein denatürasyonu için Laemmli tamponu (2X Laemmli Sample Buffer, Chemcruz) kullanıldı. Bio-Rad TGX FastCast ile sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS PAGE) hazırlandı. Hazırlanan jellerdeki kuyucuklardan kontrol,

MS, MS+çuha çiçeği ve MS+sarı kantaron gruplarına ait proteinler yüklendi. Transfer işlemi, 2.5 amper ve 25 voltta 7 dakika süreyle gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrası membranlara bloklama işlemi yapıldı (1X TBS-T [%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS] ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu içerisinde 1 saat inkübasyon). Bloklama sonunda membranlar, anti-JAK2 (rabbit anti-JAK2 monoclonal antibody [1:1000; CST:3230, ABD]), anti-phospho-JAK2 (rabbit anti-phospho-JAK2 monoclonal antibody [1:1000; CST:4406, ABD]), anti-STAT1 (rabbit monoclonal anti-STAT1 [1:1000, CST:14994, USA]), anti-phospho-STAT1 (rabbit monoclonal phospho-STAT1 [1:1000, CST:7649, ABD]) primer antikoları ile gece boyu 4°C'de inkübe edildi. Membranlar, primer antikolarla uyumlu ikincil antikor (HRP-conjugated secondary antibody [CST:7074, ABD]) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Membrandaki antikor ile muamele edilmiş proteinlerin bant görüntülemesi Image Quant LAS 500 ile gerçekleştirildi.

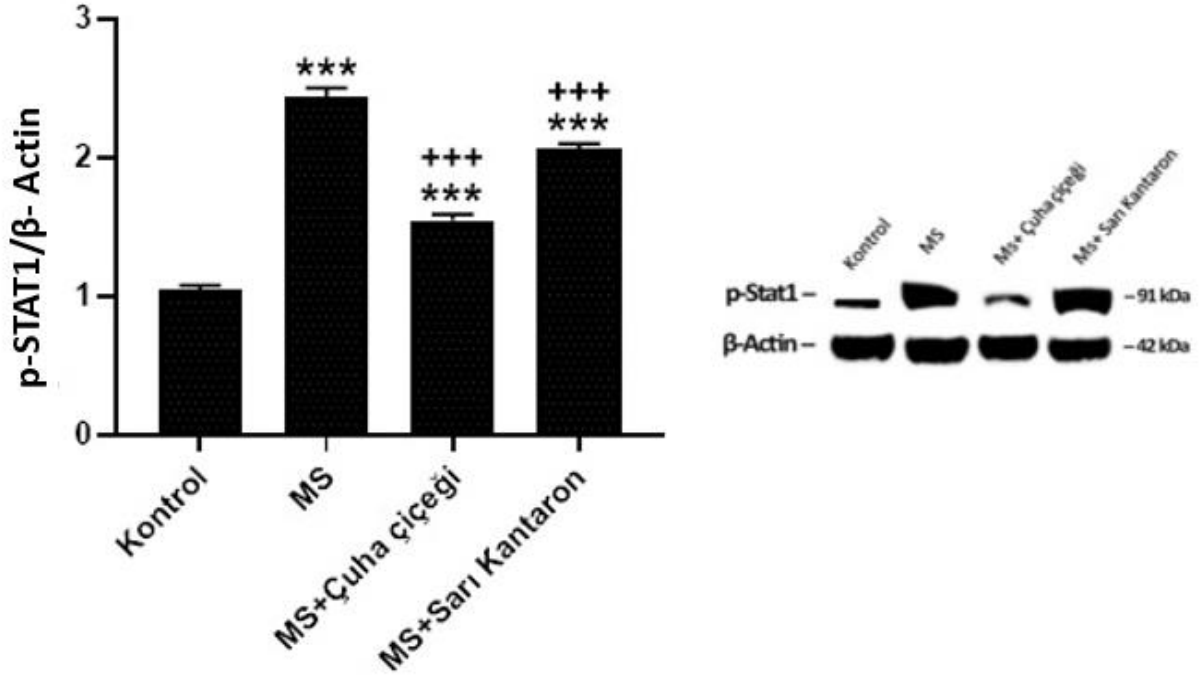
İstatistiksel Analiz

Veriler GraphPad Prism Programı (GraphPad Prism Version 8.0.1 Software Program, San Diego, CA) ile analiz edildi. Verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile incelendikten sonra normal dağılıma sahip bağımsız grupların karşılaştırmasında tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Post-hoc karşılaştırmaları ise Bonferroni testi ile yapıldı. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak hesaplandı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

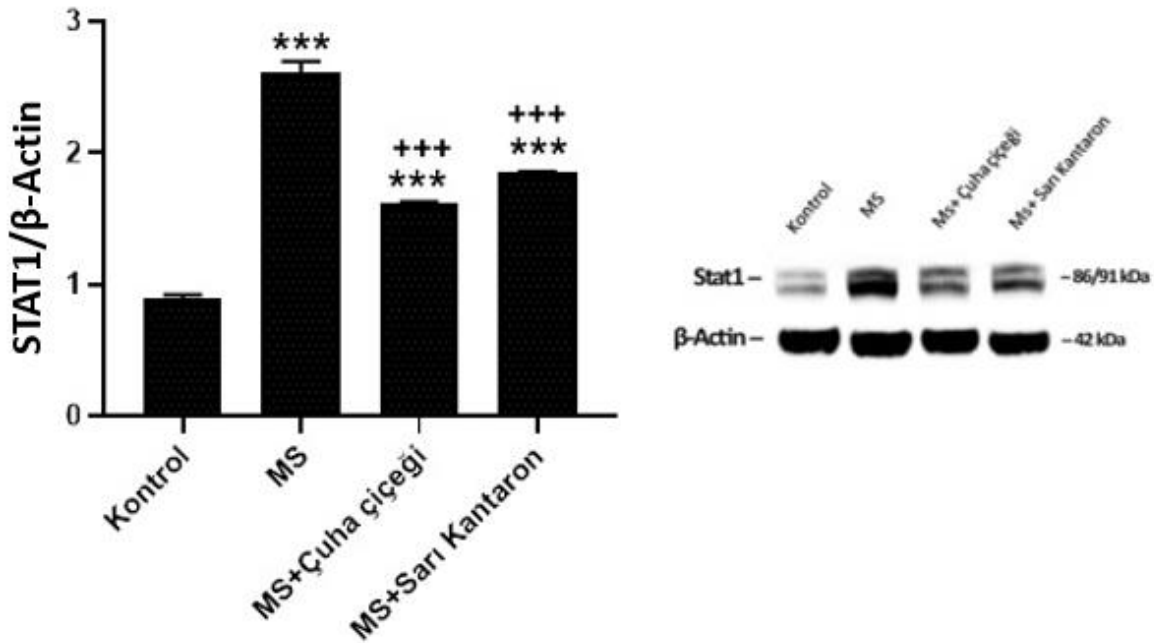
BULGULAR

Çalışmamızda MS hastalığının patogenezinde önemli olduğu bilinen JAK/STAT sinyal yolağı düzeylerindeki değişimler, kontrol, hasta (MS) ve tedavi grupları (MS+sarı kantaron, MS+çuha çiçeği) için incelendi. Çalışmamızda JAK2 ve STAT1 proteinleri ile bu proteinlerin aktif formları olan p-JAK2 ve p-STAT1 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

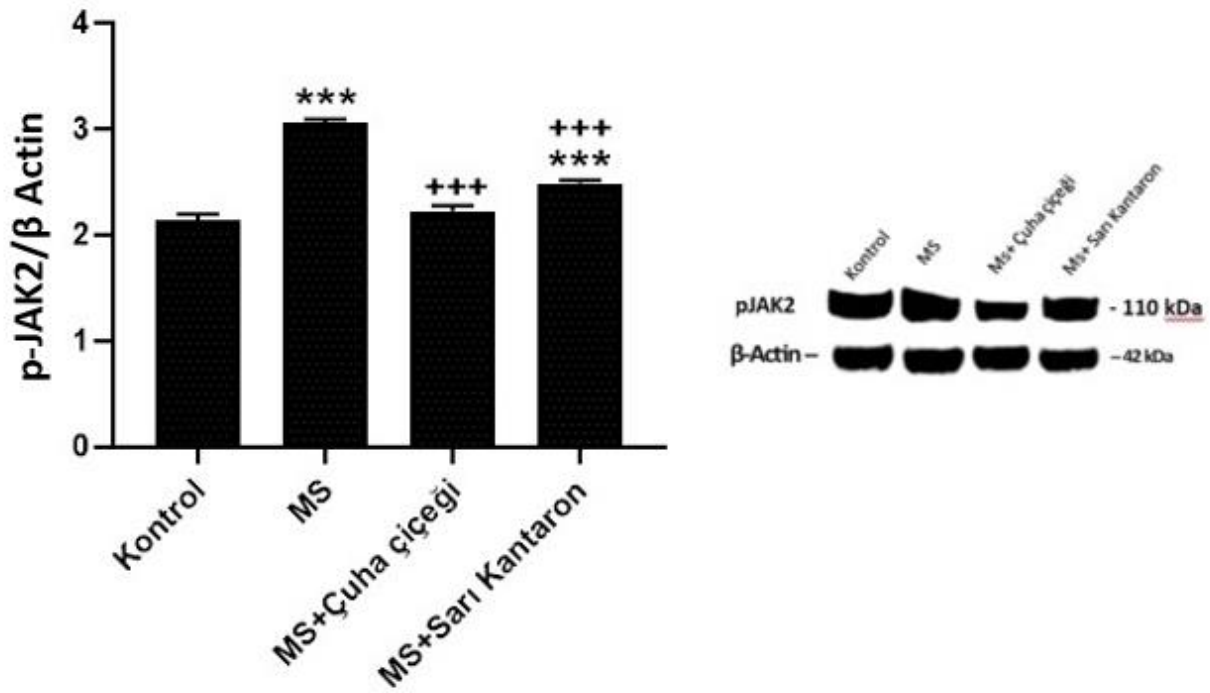
p-STAT1 (Şekil 1) ve STAT1 (Şekil 2) ekspresyon düzeyleri MS (p<0.001), MS+çuha çiçeği (p<0.01) ve MS+sarı kantaron (p<0.001) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken; MS+çuha çiçeği (p<0.001) ve MS+sarı kantaron (p<0.001) grupları MS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi. pJAK2 (Şekil 3) ekspresyon düzeyi MS (p<0.001) ve MS+sarı kantaron (p<0.001) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken, MS+çuha çiçeği grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. MS grubuna göre kıyaslandığında ise hem MS+çuha çiçeği (p<0.001) hem de MS+sarı kantaron (p<0.001) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi. Son olarak JAK2 (Şekil 4) ekspresyon düzeyi ise diğer parametrelerle paralel olarak MS (p<0.001), MS+çuha çiçeği (p<0.001) ve MS+sarı kantaron (p<0.001) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken MS grubuna kıyasla hem MS+çuha çiçeği (p<0.001) hem de MS+sarı kantaron (p<0.001) gruplarında anlamlı bir azalma gösterdi.



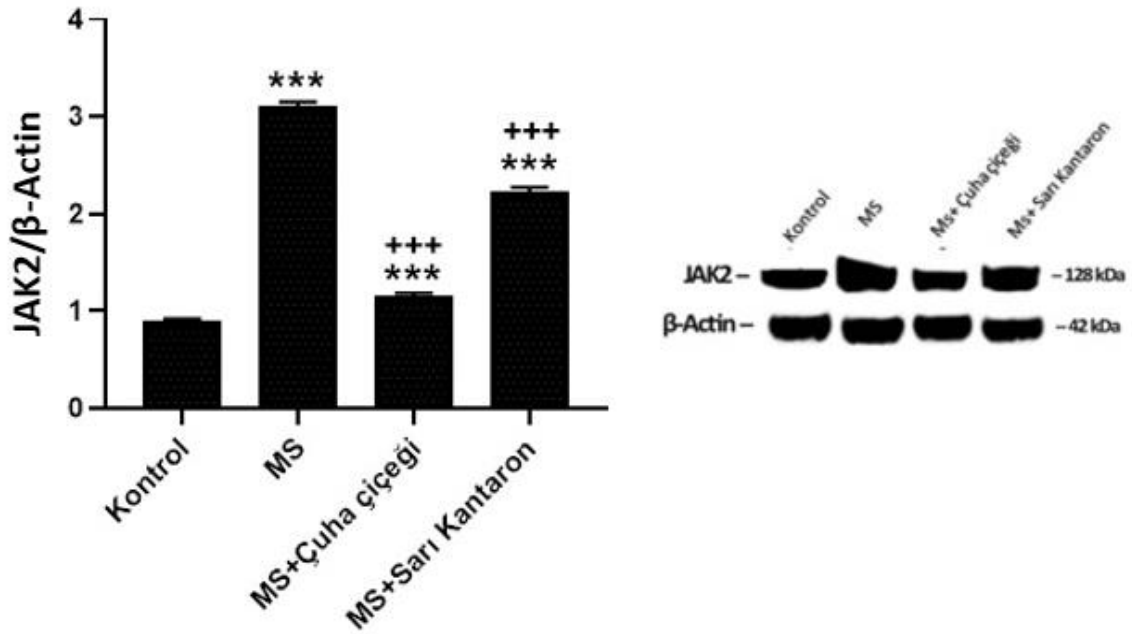
Şekil 1: Deneş gruplarından elde edilen beyin dokusunda p-STAT1 Western blot analizi sonuçları. Veriler, tek yönlü ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi ve ortalama \pm SD olarak ifade edildi. *** p <0.001, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık; +++ p <0.001, MS grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık.



Şekil 2: Deneş gruplarından elde edilen beyin dokusunda STAT1 Western blot analizi sonuçları. Veriler, tek yönlü ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi ve ortalama \pm SD olarak ifade edildi. *** p <0.001, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık; +++ p <0.001, MS grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık.



Şekil 3: Deneç gruplarından elde edilen beyin dokusunda p-JAK2 Western blot analizi sonuçları. Veriler, tek yönlü ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi ve ortalama ±SD olarak ifade edildi. ***p<0.001, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık; +++p<0.001, MS grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4. Deney gruplarından elde edilen beyin dokusunda JAK2 Western blot analizi sonuçları. Veriler, tek yönlü ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi ve ortalama \pm SD olarak ifade edildi. *** $p < 0.001$, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık; +++ $p < 0.001$, MS grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık.

TARTIŞMA

MS, merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyon ve aksonal kayıp ile karakterize karmaşık bir otoimmün hastalıktır. Son zamanlardaki bitkisel temelli tedavi yaklaşımları, MS hastalığı için umut verici bir terapötik yaklaşımı temsil etmektedir (22). Farklı bitkisel ilaçların MS üzerindeki etkisine, NF- κ B yolu, JAK/STAT yolu ve GATA-3 yolu üzerine odaklanılarak bakılmıştır (23). Bir önceki çalışmamızda, sarı kantaron ve çuha çiçeği yağları ile beslenmenin beyin dokusu histopatolojisi, MOG, MBP, TAS, TOS ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırdık. Çuha çiçeği ve sarı kantaron yağı ile beslenmenin MS oluşturulan farelerde miyelin kaybı ve amiloid birikimini azaltmak için faydalı etkiler gösterdiğini ve bunların MS tedavisi için terapötik faydası olabileceğini ortaya koyduk (19).

Bu çalışmamızda ise, sarı kantaron ve çuha çiçeği yağlarını içeren yemler ile beslenmenin, MS hastalığı patogeneğinde önemli olduğu bildirilen JAK-STAT sinyal yolu üzerindeki etkilerini inceledik. MS patogeneğinde T helper hücreleri aktive olur ve aşırı sitokin salınımı meydana gelir. T helper hücreleri tarafından aktive edilen JAK-STAT sinyal yolağı immün yanıtın başlamasında ve organizasyonunda kritik rol oynar (24). Yapılan bir çalışmada, *Tripterygium wilfordii Hook F* bitkisinin bir özü olan tripterololün (T4)'in anti-inflamatuar ve immünosupresif etkileri EAE modeli ile MS oluşturulan farelerde incelenmiştir. T4 tedavisi verilmemiş farelerden alınan spinal doku örneklerinde p-JAK2 ve STAT1 seviyelerinde ileri derecede anlamlı bir artış gösterilmiştir. Tedavi uygulanan farelerin spinal doku örneklerinde ise p-STAT1 de güçlü inhibisyon, p-JAK2 de ise hafif inhibisyon bildirilmiştir. Özellikle STAT1 ekspresyonunun azalması ile EAE modelinde hastalığın

şiddeti hafiflemiştir. JAK inhibisyonunun en iyi göstergesinin STAT inhibisyonu olduğu ifade edilmiştir (25). Çalışmamızda ise STAT1 düzeylerinde, MS grubunda diğer gruplara göre ileri derecede anlamlı artış saptanmış olup sarı kantaron ve çuha gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 1). STAT1 düzeyinin azalması, verilen tedavi ile hastalığın şiddetinin hafiflediğinin göstergesi kabul edilebilir. Literatür ile benzer olarak p-JAK2 seviyelerinde MS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, her iki tedavi grubundaki değerler kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Özellikle çuha çiçeği yağı ile beslenen grupta p-JAK2 düzeyi için istatistiksel olarak anlamlı bir azalış elde edilmiştir (Şekil 3). JAK2 yolağında ise p-JAK2'ye benzer bulgular elde edilmiştir (Şekil 4). p-JAK2, JAK2'nin aktif hali olduğundan benzer bulguların elde edilmesi sinyal yolağının mekanizması ile uyumludur (21).

Etty N. Benveniste ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada JAK/STAT sinyal yolağının bozukluğunun, MS dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalığın gelişmesinde etkili olduğu bulunmuştur (25). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada da literatür ile uyumlu şekilde JAK2 ve STAT1 düzeylerinde ve aktif olan fosforile formlarında, kontrol ve MS gruplarında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 2 ve 4). Çalışmamızda hem çuha çiçeği yağı hem de sarı kantaron yağı ile beslenen tedavi gruplarında STAT1, JAK2, p-STAT1 ve pJAK2'nin ekspresyonlarında MS grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğunu bulduk. Bu durum daha önceki çalışmamızda elde ettiğimiz klinik tablodaki iyileşmeyi, moleküler düzeyde desteklemektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sarı kantaron ve çuha çiçeği özlerinin, farklı hastalık durumlarında kullanıldığı

gösterilmiştir (22,26-30). Rezapour-Firouzi S. ve arkadaşları, çuha çiçeği yağının MS hastalarında tedavi edici ve immünomodülatör etkileri olduğunu belirlemişler ve MS hastalarının relaps oranlarında azalma gözlemlemişlerdir (29). Ancak literatürde sarı kantaron ve çuha çiçeği yağlarının MS patogenezinde önemli JAK/STAT sinyal ekspresyonu üzerine etkisi bildirilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, MS modeli oluşturulan farelerde, MS patogenezi ile ilişkilendirilmiş JAK/STAT yolundaki protein ekspresyonlarının verilen her iki tedavi modelinde de azaldığını, özellikle çuha çiçeği yağı ile beslenen tedavi grubunda bu yolağın ekspresyon düzeyini önemli derecede azalttığını gösterdik. Bu sebeple bu çalışmanın literatüre kıymetli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Çatışma Beyanı: Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı: Anafikir: HB, ET; Analiz: HB, ET, ZG, SÜ; Veri sağlama: HB, ET, ŞŞ; Yazım: HB, ZG, SÜ; Düzeltme: HB, ET, ZG, SÜ, ŞŞ; Onay: HB, ET, ZG, SÜ, ŞŞ

Destek ve Teşekkür Beyanı: Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Etik Kurul Onamı: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu; tarih: 22.04.2016, sayı No:2016/116.

KAYNAKLAR

1. Przybek J, Gniatkowska I, Mirowska-Guzel D, Członkowska A. Evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol*. 2015;49(5):313-21.
2. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation.

Handbook of Clinical Neurology. 2014;122(3):269-90.

3. Ferrazzano G, Crisafulli SG, Baione V, Tartaglia M, Cortese A, Frontoni M et al. Early diagnosis of secondary progressive multiple sclerosis: focus on fluid and neurophysiological biomarkers. *Journal of Neurology*. 2021;268(10):3626-45.
4. Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*. 2001;14(3):299-304.
5. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of Clinical Neurology*. 2014;122(1):173-89.
6. Rezapour-Firouzi S, Arefhosseini SR, Farhoudi M, Ebrahimi-Mamaghani M, Rashidi M-R, Torbati M-A et al. Association of expanded disability status scale and cytokines after intervention with co-supplemented hemp seed, evening primrose oils and hot-natured diet in multiple sclerosis patients. *BioImpacts*. 2013;3(7):43-7.
7. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*. 2011;18(1):21-9.
8. Xin J, Feinstein DL, Hejna MJ, Lorens SA, McGuire SO. Beneficial effects of blueberries in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(23):5743-8.
9. Tian J, Zhang F, Cheng J, Guo S, Liu P, Wang H. Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L. *Scientific Reports*. 2014;4(1):1-6.
10. Oliveira AI, Pinho C, Sarmiento B, Dias ACP. Neuroprotective activity of *Hypericum perforatum* and its major components. *Frontiers in plant science*. 2016;7(1):1004.

11. Lu YH, Du CB, Liu JW, Hong W, Wei DZ. Neuroprotective effects of *Hypericum perforatum* on trauma induced by hydrogen peroxide in PC12 cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2004;32(3):397-405.
12. Sasaki N, Toda T, Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Biol Interact*. 2003;145(2):101-16.
13. Zou YP, Lu YH, Wei DZ. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother Res*. 2010;24(1):6-10.
14. Rebas E, Rzajew J, Radzik T, Zylinska L. Neuroprotective Polyphenols: A Modulatory Action on Neurotransmitter Pathways. *Current Neuropharmacology*. 2020;18(5):431-45.
15. Timoszuk M, Bielawska K, Skrzydlewska E. Evening primrose (*Oenothera biennis*) biological activity dependent on chemical composition. *Antioxidants*. 2018;7(8):108.
16. Liu Y, Holdbrooks AT, De Sarno P, Rowse AL, Yanagisawa LL, McFarland BC et al. Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. 2014;192(1):59-72.
17. Dujmovic I. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of neuroaxonal damage in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis international*. 2011;2011(1):1-18.
18. Kotelnikova E, Bernardo-Faura M, Silberberg G, Kiani NA, Messinis D, Melas IN et al. Signaling networks in MS: a systems-based approach to developing new pharmacological therapies. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015;21(2):138-46.
19. Selek S, Esrefoglu M, Meral I, Bulut H, Caglar HG, Sonuc G et al. Effects of *Oenothera biennis* L. and *Hypericum perforatum* L. extracts on some central nervous system myelin proteins, brain histopathology and oxidative stress in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019;94(2):75-83.
20. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*. 2011;164(4):1079-106.
21. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117(8):1281-3.
22. Mojaverrostami S, Bojnordi MN, Ghasemi-Kasman M, Ebrahimzadeh MA, Hamidabadi HG. A review of herbal therapy in multiple sclerosis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2018;8(4):575-90.
23. Yan Z, Gibson SA, Buckley JA, Qin H, Benveniste EN. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical Immunology*. 2018;189(1):4-13.
24. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*. 2020;80(1):106210.
25. Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, Qin H. Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2014;34(8):577-88.
26. Hammer KDP, Yum M-Y, Dixon PM, Birt DF. Identification of JAK-STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a *Hypericum perforatum* fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*. 2010;71(7):716-25.
27. Naziroglu M, Kutluhan S, Övey İS, Aykur M, Yurekli VA. Modulation of oxidative stress,

- apoptosis, and calcium entry in leukocytes of patients with multiple sclerosis by Hypericum perforatum. *Nutritional Neuroscience*. 2014;17(5):214-21.
28. Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Ayoobi F, Moghaddamahmadi A. The role of natural products in the prevention and treatment of multiple sclerosis. In: Watson RR, Killgore WDS, eds. *Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases*. 1th ed. United Kingdom. Elsevier Inc, 2017:249-260.
29. Rezapour-Firouzi S, Arefhosseini SR, Mehdi F, Mehrangiz E-M, Baradaran B, Sadeghihokmabad E et al. Immunomodulatory and therapeutic effects of Hot-nature diet and co-supplemented hemp seed, evening primrose oils intervention in multiple sclerosis patients. *Complementary Therapies in Medicine*. 2013;21(5):473-80.
30. Majdinasab N, Namjoyan F, Taghizadeh M, Saki H. The effect of evening primrose oil on fatigue and quality of life in patients with multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2018;14(1):1505-12.