

Deney Hayvanlarında Multiple Skleroz Modelleri

Multiple Sclerosis Models in Experimental Animals

Evrım Zeren BİRER 

Acıbadem Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Sinir Bilim Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye



Öz

Multiple skleroz (MS) enflamasyon, oligodendrosit kaybı, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize oto-immun bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Etiyopatogenezi net olarak bilinmese de, Epstein Barr virusu, Herpes virus tip 6 gibi bazı viral infeksiyonların, sigara tiryakiliği, D ve B12 vitamini yetersizliği, UV radyasyona maruz kalma gibi çeşitli çevresel faktörlerin ve immun sistem moleküllerinin sentezinden sorumlu genlerdeki polimorfizmlerin hastalık oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Multiple skleroz insanlarda spontan olarak gelişen demiyelizan bir hastalıktır. Transgenik hayvan modelleri haricinde hayvanlarda kendiliğinden oluşmaz. Bu nedenle, patogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar ve prelinik çalışmalar fare, sıçan, primat ve zebra balığı gibi çeşitli hayvanlarda deneysel model oluşturularak yapılır. Ancak, MS çok boyutlu ve farklı seyir tiplerine sahip bir hastalıktır. Hastalığı tüm yönleriyle (enflamasyon, demiyelizasyon, akson hasarı) yansıtabilecek tek bir hayvan modeli bulunmadığından model seçiminin araştırma sorusuna uygun yapılması önerilmektedir. Bu derlemenin amacı en sık kullanılan modellerden olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE), kuprizon (CPZ) fare ve Theiler'in kemirgen ensefalomyelit virusu (TMEV) gibi viruslar ile oluşturulan viral modeller hakkında bilgi vermektir.

Anahtar Kelimeler: Kuprizon, demiyelinizasyon, deneysel otoimmün ensefalomyelit, multiple skleroz, Theiler'in kemirgen ensefalomyelit virusu

ABSTRACT

Multiple sclerosis is an autoimmune central nervous system disease characterized by inflammation, loss of oligodendrocyte, demyelination, and axonal damage. Although the etiopathogenesis is not fully understood, several infections such as Epstein–Barr virus, herpes virus type 6, various environmental factors such as smoking addiction and vitamin D and B12 deficiencies, exposure to ultraviolet radiation, and polymorphisms in the genes responsible for the synthesis of immune system molecules are known to play a role in the formation of the disease. Multiple sclerosis develops spontaneously in humans. Except transgenic animal models, it does not occur spontaneously in animals. Therefore, research and preclinical studies to elucidate its pathogenesis are performed in mice, rats, primates, and zebrafish by inducing experimental models. However, multiple sclerosis is a multidimensional disease with different courses and prognosis. Since there is no single animal model that can recapitulate the disease in all aspects (inflammation, demyelination, and axon damage), it is recommended that the model should be selected in accordance with the research question. The aim of this review is to provide information about experimental autoimmune encephalomyelitis, cuprizone mouse, and Theiler's murine encephalomyelitis virus models, which are among the most frequently used models.

Keywords: Cuprizone, demyelination, experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, Theiler's murine encephalomyelitis virus

Giriş

Multiple skleroz enflamasyon, oligodendrosit kaybı, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize oto-immun bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımıyla immun yanıt dengesi bozulur. Miyelin antijenlerine karşı oto-reaktif hale gelen T hücreleri merkezi sinir sistemine infiltre olarak inflamatuvar yanıtı artırır, kan-beyin bariyeri hasarı, akson hasarı ve gliozis şekillenir (Birmipi ve ark., 2022). Deney hayvanlarında MS tablosu oluşturmak için en yaygın kullanılan modeller; deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modeli, Theiler'in kemirgen ensefalomyelit virusu modeli başta olmak üzere viral modeller ve kuprizon (CPZ)

Geliş Tarihi/Received: 14.03.2023

Kabul Tarihi/Accepted: 04.07.2023

Yayın Tarihi/Publication Date: 30.08.2023

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:
Evrım Zeren BİRER
E-mail: evrim.birer@live.acibadem.edu.tr

Cite this article as: Birer EZ. Multiple sclerosis models in experimental animals. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices* 2023;3(2):55-57.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

gibi toksinler kullanılarak oluşturulan kimyasal demiyelinizasyon modelleridir. MS farklı klinik seyir tiplerine (atak ve iyileşmelerle seyreden, primer progresif, sekonder progresif, vb.) sahip bir hastalıktır. Başlangıç ve ileri aşamalarında farklı hücrenel ve moleküler değişimler söz konusu olduğu için hastalığı tüm yönleriyle (demyelinizasyon, nöroinflamasyon, gliozis) yansıtabilecek tek bir hayvan modeli bulunmamaktadır. Seçilecek olan hayvan modelinin araştırma konusuna göre belirlenmesi önerilmektedir (Procaccini ve ark., 2015). Örneğin, toksin modellerinde demiyelinizasyon/remiyelinizasyon ve akson hasarı kolaylıkla izlenebilirken, hastalığın inflamatuvar ve nörodejeneratif boyutunu araştırmak amacıyla deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) modeli tercih edilmektedir.

Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit Modeli (DOE)

MS hastalığının otoimmünite ve nöroinflamasyon ile ilişkisine dair bilgilerin çoğu bu model kullanılarak elde edilmiş ve preklini araştırmaların çoğu DOE ile modellenmiştir. DOE modeli tavşan, Gine domuzu, sıçan, primat gibi pek çok hayvan türünde oluşturulabilir de sıklıkla fare veya sıçanlar tercih edilir. DOE kısaca spesifik antijenlerin hayvana verilmesiyle merkezi sinir sisteminde indüklenmiş bir inflamasyon oluşturulmasıdır. Model, "myelin basic protein" (MBP), "proteolipid protein" (PLP), "Myelin oligodendrosit glikoprotein" (MOG) gibi çeşitli miyelin antijenlerinin Freund adjuvanı ile birlikte uygulanması (aktif DOE) veya aktif DOE oluşturulmuş farelerden izole edilen T hücrelerinin herhangi bir uygulama yapılmamış farelere verilmesiyle (pasif DOE) iki şekilde oluşturulur. Klasik olarak farelerde aktif model miyelin antijeni ve *Mycobacterium tuberculosis* fragmentleri içeren adjuvan (Freund adjuvanı) subkutanöz (s.c) yolla uygulanarak oluşturulur. Bazı çalışmalarda model oluşumunu desteklemek amacıyla Pertusis toksini de enjekte edilmektedir (Burrows ve ark., 2019). Genellikle ilk izlenen nörolojik bulgular kas güçsüzlüğü ve kilo kaybı olur. Vücut ağırlığındaki azalma iyileşme fazı boyunca da sürer. Hastalık kronik faza geçerken vücut ağırlığı artmaya başlar (Martinez & Peplow, 2020). Ağırlık kaybı bulgusuna 9–14. günlerde dengesizlik, kuyrukta düşme, arkadan öne doğru ilerleyen paraliz eklenir. Pasif yolla oluşturulan modellerde nörolojik bulgular daha erken dönemde izlenebilir. Klinik belirtilerin şiddetini değerlendirmede mutlak kabul görmüş bir skala olmasa da, belirtileri "0–5" arası derecelendirmekte kullanılan DOE nörolojik bozukluk skalasından yararlanılır (Stromnes & Goverman, 2006). Bu skala aşağıdaki gibidir:

0 = klinik belirti yok; 1 = kuyrukta paraliz; 2 = hareketlerde koordinasyon kaybı, arka bacaklardan birinde paraliz; 3 = her iki arka bacakta paraliz 4 = ön bacaklarda paraliz; 5 = agoni veya ölüm

Miyelin benzeri antijen uygulamasını takiben hayvanlar günlük olarak tartılarak kilo kaybı kaydedilir ve nörolojik semptomlar 0–5 arası derecelendirilir. Bunun dışında, davranış değişiklikleri izlenerek, rotarod ve açık alan testleriyle de motor bozukluklar ve nörolojik değişiklikler saptanabilir. Model için seçilen hayvanın türü, kullanılan antijen, yaş, cinsiyet, uygulama yolu gibi faktörlere bağlı olarak hastalığın başlangıç zamanında ve lezyonların lokalizasyonunda farklılıklar ve farklı klinik bulgular oluşabilir. Örneğin; SJL farelerde periton içi (i.p) yolla PLP verilerek oluşturulan modelde kısıtlı iyileşme görülen, atak ve remisyonla seyreden kronik bir model oluşur. Dark Agouti sıçanlarda omurilik homojenatı (SCH) ile model oluşturulduğunda ise spontan iyileşme görülen, ataklarla seyreden bir hastalık tablosu oluşur. Hayvanların yaşı da hastalık modellemesi açısından belirleyicidir. Örneğin; genç C57BL/6 farelerde MOG ile oluşturulan modelde akut ensefalomyelit

takiben iyileşme izlenirken, daha yaşlı farelerde şiddetli ve kronik seyirli fenotip olduğu ve iyileşme görülmediği de bildirilmiştir (Burrows ve ark., 2019). Özetle, DOE multiple sklerozun inflamatuvar süreçlerini incelemek için uygun bir model olmasına rağmen, miyelin yapım ve yıkım süreçlerini incelemek için yetersiz bir modeldir (Gharagozloo ve ark., 2022).

Kimyasal (Toksik) Modeller

Kimyasal modeller lisesit, 6-aminonikotinamid, anti galaktoserebroid+antikör kompleksi, kuprizon (CPZ) gibi kimyasallarla oluşturulan demiyelinizasyon modelleridir. CPZ haricindekiler beyine fokal olarak mikroenjeksiyonla uygulanır ve sınırlı bir alanda demiyelinizasyon oluştururlar. En yaygın kullanılan maddelerden biri olan kuprizon (CPZ) ise diğer toksin modellerinden farklı olarak yemle birlikte oral uygulanabildiğinden cerrahi girişime gerek kalmaksızın model oluşturmaya olanak sağlar. Yem ile birlikte verilerek oluşturulan bu modelde generalize demiyelinizasyon izlenir (Martinez & Peplow, 2020). CPZ bakır şelatör bir ajandır ve spesifik olarak erişkin oligodendrositleri hedef alır. Merkezi sinir sisteminin diğer hücrelerini ve oligodendrosit progenitor hücreleri etkilenmez. Mekanizması net olarak açıklanamamakla birlikte erişkin oligodendrositlerde mitokondriyel faaliyetlerin azalmasına, reaktif oksijen türlerinin artmasına yol açarak enerji metabolizmasını bozar. Buna bağlı olarak corpus callosum, internal kapsül, talamus gibi çeşitli bölgelerde miyelin yıkımına sebep olur. Oral uygulama kesildikten bir süre sonra remiyelinizasyon spontan olarak başlar. CPZ modeli SJL, Albino, Swiss, Balbc gibi çeşitli fare türlerinde, Wistar sıçanlarda, makaklarda ve Gine domuzunda oluşturulabilir (Vega-Riquer ve ark., 2019). Erkek C57BL/6 fareler CPZ modeline çok iyi yanıt verdiklerinden sıklıkla tercih edilir. Farklı kemirgen türlerinin modele farklı yanıtlar verdiği bildirilmiştir. Örneğin; C57BL/6 farelerin aksine BALBc farelerde beyin spesifik kısımlarında gecikmiş ve tam olmayan demiyelinizasyon şekillenebilir (Skripuletz ve ark., 2008). Dişi C57BL/6 farelerin CPZ modeline daha dirençli olduğu bilinmektedir (Taylor ve ark., 2009). Model standart olarak 8 haftalık C57BL/6 erkek farelere 5–6 hafta boyunca düşük doz (%0,2) CPZ içeren yem verilerek oluşturulur. Uygulamadan birkaç gün sonra oligodendrositlerde apoptoz görülür. Dördüncü haftada demiyelinizasyon şiddetlenir ve 5–6. haftalara kadar devam eder. Spontan remiyelinizasyon (iyileşme dönemi) ise CPZ alımı sonlandırıldıktan 1 hafta sonra izlenebilmekle birlikte 2–4. haftalarda maksimuma ulaşır (Vega-Riquer ve ark., 2019). CPZ içeren yem uygulamasına 12–13 hafta devam edildiğinde veya 6–9 hafta boyunca daha yüksek dozlar uygulandığında ise kronik demiyelinizasyon ve akson hasarı oluşur, spontan remiyelinizasyon minimuma iner. Bu nedenle CPZ modelinin hastalığın hem erken hem de progresif fazlarını incelemek için kullanılabilirliği bildirilmektedir (Zhan ve ark., 2020). CPZ modeli oligodendrositozu, miyelin yıkımını ve yapımını incelemek için en uygun model olarak kabul edilir. Ancak MS'in inflamatuvar süreçlerini ve immün sistemin patogenezdaki rolünü araştırmak için yeterli bir model değildir (Gharagozloo ve ark., 2022).

Viral Modeller

Çeşitli çalışmalardan elde edilen bilgiler *Herpesviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae* gibi virüs ailelerinin MS ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Diğer nörolojik hastalıklarda görülme, sadece MS hastalarında Human Herpes Virus Tip 6 antijeni saptanmış olması da buna bir örnek olarak verilebilir. MS'in virüslerle ilişkisinin tespit edilmesinin ardından hayvanlarda deneysel olarak kronik demiyelinizasyon ve akson hasarı oluşturularak hastalığın patogenezi aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Mecha ve ark., 2013). Viral demiyelinizasyon modellerinde sıklıkla fareler ve

Theiler's murine encephalomyelitis virusu (TMEV), Murine hepatitis virusu (MHV), Semliki Forest virusu (SFV) gibi nörotropik özellikte virüsler kullanılır. Bu virüsler kemirgenlerde doğal olarak patojendir. MHV ve SFV daha kısa süreli hastalık tablosu oluşturduğundan MS'in kronik özelliğini yansıtmaz. Bu nedenle TMEV daha çok tercih edilir (Pike ve ark., 2022). TMEV merkezi sinir sistemindeki tüm hücre tiplerini enfekte eder ve paralize yol açar. Viral modellerde miyelin yıkım mekanizması tam olarak anlaşılacak şekilde, TMEV duyarlı farelerde erken dönemde akut ensefalomyelit ve takiben kronik demiyelinizasyon olmak üzere iki aşamalı bir tablo oluşturur. Virüsün intrakraniyel inokulasyonunu takiben 3–12. günlerde ensefalomyelit (akut faz), 2. haftadan sonra yaygın demiyelinizasyon ve sonra medulla spinaliste atrofi ve akson kaybı görülür. 30–40. günlerde kronik demiyelizasyon faz başlar (30–40 gün) ve ölümlerle sonuçlanır (Oleszak ve ark., 2004). Diğer modellerde olduğu gibi, seçilen hayvan türüne bağlı olarak hastalığın farklı fazları oluşabilir. Örneğin; C57BL/6 gibi dirençli farelerde sadece akut fazın görüldüğü, kronik demiyelizasyon fazının ise izlenmediği bildirilmiştir (Lorch ve ark., 1981). TMEV modeli insanlardaki kronik progresif MS'e çok benzer tablo oluşturabilmesi bakımından avantaj sağlayan, akson hasarı ve inflamasyona bağlı demiyelinizasyonu araştırmak için uygun bir modeldir (Procaccini ve ark., 2015).

Sonuç ve Öneriler

Multiple skleroz insanlarda görülen kronik, oto-immun özellikte bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. İnsan dokularına erişim sınırlı olduğu için hastalığın patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi için hayvanlarda yukarıda bahsedilen modeller başta olmak üzere çeşitli deneysel modeller tasarlanmaktadır. Ancak, MS çok boyutlu, farklı seyir tiplerine sahip bir hastalık olduğu için hastalığı tüm yönleriyle yansıtabilecek tek bir hayvan modeli bulunmadığından model seçiminin araştırma sorusuna uygun yapılması önerilmektedir (Lassmann & Bradl, 2017). Model seçiminin araştırma sorusuna uygun yapıldığı durumlarda dahi pek çok faktör araştırma sonucunu etkileyebilir. Örneğin; duyarlı farelerde DOE modeli oluşturulduğunda hayvanın soyu, yaşı, cinsiyeti, seçilen antijenin türü, miktarı ve uygulama yolu ortaya çıkacak klinik tabloyu, demiyelizasyon plaklarının yerleşimini ve dolayısıyla ilaç yanıtı değiştirebilir. Preklinik çalışmaların translasyonel açıdan değer taşıyabilmesi için modellerin tekrarlanabilir olması ve standardize edilmesinin yanı sıra, MS'in inflamasyon ve remiyelinizasyon-demiyelinizasyon süreçlerinin aynı modelde incelenmesine olanak tanıyacak yeni deneysel modellere ihtiyaç vardır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Declaration of Interests: The author declare that they have no competing interest.

Funding: The author have no conflicts of interest to declare.

Kaynaklar

- Birmpili, D., Charmarke Askar, I. C., Bigaut, K., & Bagnard, D. (2022). The translatability of multiple sclerosis animal models for biomarker discovery and their clinical use. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11532. [CrossRef]
- Burrows, D. J., McGown, A., Jain, S. A., De Felice, M., Ramesh, T. M., Sharrack, B., & Majid, A. (2019). Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. *Multiple Sclerosis*, 25(3), 306–324. [CrossRef]
- Gharagozloo, M., Mace, J. W., & Calabresi, P. A. (2022). Animal models to investigate the effects of inflammation on remyelination in multiple sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 15, 995477. [CrossRef]
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: Experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 223–244. [CrossRef]
- Lorch, Y., Friedmann, A., Lipton, H. L., & Kotler, M. (1981). Theiler's murine encephalomyelitis virus group includes two distinct genetic subgroups that differ pathologically and biologically. *Journal of Virology*, 40(2), 560–567. [CrossRef]
- Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. Y., Mestre, L., Feliu, A., Guaza, C. (2013). Viral models of multiple sclerosis: Neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Progress in Neurobiology*, 101–102, 46–64. [CrossRef]
- Martinez, B., & Peplow, P. V. (2020). Protective effects of pharmacological therapies in animal models of multiple sclerosis: A review of studies 2014–2019. *Neural Regeneration Research*, 15(7), 1220–1234. [CrossRef]
- Oleszak, E. L., Chang, J. R., Friedman, H., Katsetos, C. D., & Platsoucas, C. D. (2004). Theiler's virus infection: A model for multiple sclerosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 174–207. [CrossRef]
- Pike, S. C., Welsh, N., Linzey, M., & Gilli, F. (2022). Theiler's virus-induced demyelinating disease as an infectious model of progressive multiple sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(15), 1019799.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of multiple sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 759, 182–191. [CrossRef]
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., & Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *American Journal of Pathology*, 172(4), 1053–1061. [CrossRef]
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4), 1810–1819. [CrossRef]
- Taylor, L. C., Gilmore, W., & Matsushima, G. K. (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathology*, 19(3), 467–479. [CrossRef]
- Vega-Riquer, J. M., Mendez-Victoriano, G., Morales-Luckie, R. A., & Gonzalez-Perez, O. (2019). Five decades of cuprizone, an updated model to replicate demyelinating diseases. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 129–141. [CrossRef]
- Zhan, J., Mann, T., Joost, S., Behrangi, N., Frank, M., & Kipp, M. (2020). The cuprizone model: Dos and do nots. *Cells*, 9(4), 843. [CrossRef]