



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI

CD200 LİGAND SİLİNİMİŞ FARELERDE TORASİK AORT ENDOTEL  
FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE BU YANITLARDA  
OKSİDATİF STRES VE TNF-ALFA'NIN OLASI ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayça Yağmur YENİDÜNYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selvinaz Taşatargil

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2024

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın ve tezimin her aşamasında bana bilgisi, deneyimi, samimiyeti, sabrı ve her daim güler yüzüyle yol gösteren, üzerimde emeği anlatılamayacak kadar büyük olan, bunlarla birlikte bana hayatta nasıl onurlu, iyi ve mutlu bir insan olunacağını kendi ışığıyla gösteren, hoşgörüsü ve mütevazı kişiliğiyle her zaman örnek aldığım canım danışman hocam Prof. Dr. Selvinaz Taşatargil başta olmak üzere,

Deneyimlerini, desteklerini benden esirgemeyen ve her zaman saygı duyduğum akademik kişiliklerinin yanı sıra güler yüzleri, neşeli sohbetleriyle en zor günlerimde bile yüzümü güldürüp bana destek olan sevgili Prof. Dr. Arda Taşatargil, Prof. Dr. Sadi Özdem ve Doç. Dr. Gül Özbey hocalarıma,

Zorlu tez sürecim boyunca deneyimlerini ve laboratuvar imkanlarını benden esirgemeyen saygıdeğer Prof. Dr. Nuray Erin hocama ve bölümümdeki tüm saygıdeğer hocalarıma,

Deney süreçlerim boyunca bana yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Esra Akçabağ, Arş. Gör. Esra Tavşan, Uzm. Ecz. Başak Tuncel ve tüm bölüm arkadaşlarıma,

Birlikte çalıştığımız, işimi daha da çok severek yapmamı sağlayan, iş yerini benim için bir ev haline getiren başta Arş. Gör. Hazal Taş olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Beni bugüne getiren, her zaman en büyük destekçim olan canım aileme: bana dürüstlüğü, fedakarlığı, zorluklarla başa çıkmayı, paylaşmayı, şefkati, kısacası insan olmayı öğreten, kızı olmaktan gurur duyduğum biricik babam Mehmetali Yenidünya'ya, en büyük örneğim, sağlam duruşuyla bana güç veren, hayran olduğum kadın, biricik annem Birgül Yenidünya'ya ve bana her gün yeniden yaşama enerjisi veren, en iyi arkadaşlarım, gün ışıklarım, canım kız kardeşlerim Aysu, Cansu ve Bahar Güliz Yenidünya'ya

Tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. CD200 Molekülünün Keşfi ve Yapısı	4
2.2. CD200 Molekülünün Fonksiyonları	5
2.3. CD200R Molekülünün Keşfi ve Yapısı	7
2.4. CD200R Molekülünün Fonksiyonları	10
2.5. CD200/CD200R ve Santral Sinir Sistemi	11
2.6. CD200/CD200R ve Otoimmün Hastalıklar	13
2.7. CD200/CD200R ve Kanser	14
2.8. Endotel Fonksiyonu, Oksidatif Stres ve İnflamasyon	18
2.9. CD200 ve Endotel	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>24</b>
3.1. Tezde Kullanılan Kimyasallar	24
3.1.1. Hayvanlarda Anestezi Oluşturmak İçin Kullanılan Maddeler	24
3.1.2. Myografda İn Vitro Deney Ortamı Oluşturmak İçin Gerekli Krebs Solüsyonunu Hazırlamada Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.1.3. Torasik Aort Endotel Dokusunda Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarını Uyarmak İçin Gerekli Kimyasal Maddeler	24
3.1.4. Hayvanlarda Endotel Disfonksiyonunu Düzeltip Düzeltmediği Test Edilen Kimyasal Maddeler	24
3.2. Tezde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	24
3.2.1. İzole Torasik Aort Dokusunu Asmak İçin Kullanılan Cihaz	24
3.2.2. Torasik Aort Dokusunda Fonksiyonel Yanıtları Elde Etmek İçin İzole Dokuların Asıldığı Düzenek	25
3.2.3. Torasik Aort Dokusunda Elde Edilen Fonksiyonel Yanıtları Kaydetmek	

İçin Kullanılan Düzenek	25
3.3. Deneysel Model	25
3.4. İn Vitro Fonksiyonel Analizler	25
3.5. İstatistiksel Analizler	27
<b>4. BULGULAR</b>	<b>28</b>
4.1. İzole Torasik Aort Dokusunda NO Aracılı Endotele Bağımlı Gevşeme Yanıtlarının CD200KO ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması	28
4.2. İnfliximab İnkübasyonunun İzole Torasik Aort Dokusunda NO Aracılı Endotele Bağımlı Gevşeme Yanıtlarına Etkisi	29
4.3. SOD İnkübasyonunun İzole Torasik Aort Dokusunda ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi	29
4.4. İzole Torasik Aort Dokusunda Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtlarının CD200KO ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması	30
4.5. İzole Fare Torasik Aort Dokusunda CD200KO ve Kontrol Gruplarında Phe ile İndüklenen Kasılma Yanıtlarının Karşılaştırılması	31
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>33</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>42</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>43</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>44</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>45</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh: Asetilkolin

AH: Alzheimer hastalığı

APC: Antijen sunan hücreler

C/EBP: CCAAT/bağlanmayı arttırıcı protein

CAT: Katalaz

CD: Yüzey farklılaşma antijeni

CD200R: CD200 reseptörü

CIA: Kollajenle indüklenen artrit

COX: Siklooksijenaz

Csk: C terminal Src kinaz

CTLA: Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen

DC: Dendritik hücre

EAE: Deneysel otoimmün ensefalit

EAU: Deneysel otoimmün üveoretinit

ED: Endotel difonksiyonu

EDHF: Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

GAP: GTPaz aktive edici protein

GPx: Glutasyon peroksidaz

GSH: Redükte glutasyon

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

HLA: İnsan lökosit antijenleri

ICAM: İntrasellüler adezyon molekülü

IFN: İnterferon

IgSF: İmmünglobülin super ailesi

IL: İnterlökin

IRF: İnterferon düzenleyici faktör

ITIM: İmmünoreseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

kDa: Kilodalton

KVH: Kardiyovasküler hastalıklar

MAPK: mitojenle aktive olan protein kinazlar

MCP: Monosit kemoatraktan faktör

MDSC: Myeloid kaynaklı supresör hücreler

MHC: Major doku uygunluk kompleksi

MS: Multiple skleroz

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NCAM: Nöral hücre adezyon molekülü

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NK: Doğal öldürücü

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit anyonu

OH<sup>•</sup>: Hidroksil radikalleri

ONOO<sup>-</sup>: Peroksinitrit

PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri

PD: Programlanmış hücre ölümü

PGI<sub>2</sub>: Prostatiklin

PH: Parkinson hastalığı

PI3K: Fosfotidil inositol 3 kinaz

PTB: Fosfotirozin bağlayan parça

RA: Romatoid artrit

ROS: Reaktif oksijen radikalleri

SHP: Src homoloji 2 bölge içeren fosfatazlar

SHIP: Src homoloji 2 bölge içeren inozitol fosfatazlar

SIRP: Sinyal düzenleyici protein

SNP: Sodyum nitroprussid

SSS: Santral sinir sistemi

STAT: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

TADC: Tümör ilişkili dendritik hücreler

TAM: Tümör ilişkili makrofajlar

TAMC: Tümör ilişkili myeloid hücreler

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

TME: Tümör mikroçevresi

TNF: Tümör nekroz faktörü

TxA2: Tromboksan A2

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü

VSMC: Vasküler düz kas hücreleri

XO: Ksantinoksidaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** Fare torasik aort halkalarında ACh ile indüklenen NO aracılı endotele bağlı gevşeme yanıtları 28
- Şekil 4.2.** İnfliximab inkübasyonunun CD200KO farelerin izole torasik aort halkalarında ACh ile indüklenen endotele bağlı gevşeme yanıtları üzerine etkisi 29
- Şekil 4.3.** SOD inkübasyonunun CD200KO farelerin izole torasik aort halkalarında NO aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtları üzerine etkisi 30
- Şekil 4.4.** Fare torasik aort halkalarında SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme yanıtları 31
- Şekil 4.5.** Fare torasik aort halkalarında Phe ile indüklenen kasılma yanıtları 32

## 1. GİRİŞ

CD200 immüno-supresif bir yüzey farklılaşma antijeni olup immüno-globulin süper ailesinin (IgSF) üyesidir (1–4). Myeloid ve lenfoid kaynaklı hücrelerde, endotel hücrelerinde ve birçok kanser hücresinde eksprese edilmektedir (5–7). Daha önce yapılan çalışmalarda CD200'ün, reseptörü olan CD200R ile etkileşimleri ortaya konmuş (8); bu etkileşimlerin immün yanıtlar üzerine inhibitör roller oynayarak transplantasyonda allograftın yaşam süresinin uzaması, inflamasyonla seyreden hastalıkların şiddetinde azalma, agresif tümörlerde inflamasyonla ilişkili büyümenin sınırlandırılması veya immünojenik tümörlerde progresyonda artma gibi sonuçlara neden olabildiği bildirilmiştir (7,9–12). CD200/CD200R etkileşiminin farklı mekanizmalar üzerinden interferon gama (IFN $\gamma$ ), interlökin (IL)-6, IL-1 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ ) gibi inflamatuvar sitokinleri baskıladığı gösterilmiştir (13–17).

Son yıllarda CD200/CD200R aksının santral sinir sistemi (SSS) homeostazında ve nöroinflamasyondaki rolü daha da iyi anlaşılmıştır. CD200'ü eksprese eden nöronlarla CD200R'yi eksprese eden mikroglial hücrelerin iletişiminin SSS'nin immüno-regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (8,18). Bununla birlikte, nöronların yanı sıra endotel hücreleri ve oligodendrositler gibi diğer SSS hücrelerinde de CD200'ün eksprese ediliyor oluşu bu hücrelerin de CD200/CD200R aksının rollerine katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür (19). Parkinson deney modelinde farelerde SSS'de CD200 ve CD200R ekspresyonlarının zamanla azaldığı, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin ise arttığı gösterilmiştir (17). CD200'ün solubl bir immünoadezin formu olan 'CD200Fc' uygulamasının SSS mikroglia/makrofajlarını inhibe ettiği, IL-6, TNF $\alpha$  gibi inflamatuvar parametreleri ve nitrik oksidi (NO) azalttığı gösterilmiştir (20).

CD200 aynı zamanda çeşitli kanser hücrelerinde de eksprese edilmekte ve bu kanserlerin bazılarında CD200 ekspresyonu tümör progresyonu ile korelasyon göstermektedir (21,22). Tümör davranışı kanser hücrelerinin kendi basit davranışlarından öte tümörün lokal ekosistemi ile ilişkilidir ve farklı stromal hücre

tiplerinin kanser progresyonunu düzenlediği bilinmektedir (23). Akut myeloid lösemide (AML) CD200 ekspresyonu regülatör T hücrelerde artış ile immünosupresör bir tümör mikroçevresi (TME) oluşturmuş ve bu durum kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (24,25). Agresif bir meme kanseri modelinde ise CD200R silinmesi (CD200RKO) tümörü infiltre eden CD8+ sitotoksik T hücrelerinde azalmayla ve TNF $\alpha$ , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerde artışla sonuçlanmıştır; CD200'ü aşırı eksprese eden farelerde (CD200tg) tümörle indüklenen IFN $\gamma$  artmış; TNF $\alpha$  ve IL-6 sitokinleri, tümör büyüme yanıtı ve metastazı azalmıştır (12). İnflamasyonla aşırı eksprese olan TNF $\alpha$ 'nın tümör progresyonunda ve metastazında önemli bir sitokin olduğu bilinmektedir (26). Meme kanseri hastalarında TNF $\alpha$  düzeylerinde artışa rastlanmış (27), prelinik çalışmalarda endojen TNF $\alpha$ 'nın metastazda olası kritik rolleri gözlenmiştir (28). Bu sonuçlar CD200 ekspresyonunun sistemik ve lokal inflamatuvar yanıtları etkileyerek tümör progresyonunda ve metastazında çift yönlü, farklı roller üstlenebileceğine işaret etmektedir.

Damar endoteli kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen tek katlı fonksiyonel tabakadır (29). Basit tek katlı bir tabaka olmasına rağmen, sağlıklı bir endotel hücrelerin adezyonunu, trombosit adezyonunu ve agregasyonunu, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu, vasküler tonusu ve inflamasyonu düzenleyen pek çok farklı ürün sentezlemektedir (30). Endotel hücreleri başta NO olmak üzere çeşitli vazodilatör ajanlar ile vazokonstriktör ajanlar salgılamakta (31,32), NO aracılı önemli fonksiyonel ve yapısal roller üstlenmektedir (33). NO'nun sentez veya biyoyararlanımında azalma endotel disfonksiyonunun (ED) temel sebebidir (34,35). Vasküler endotel, TNF $\alpha$ 'nın temel hedeflerinden biridir ve TNF $\alpha$ 'nın hem in vivo hem in vitro koşullarda mikro ve makrovasküler dolaşımı bozduğuna yönelik kanıtlar giderek artmaktadır (36). İn vivo TNF $\alpha$  uygulamasının çeşitli damar yataklarında endotel NO salınımını bozarak endotel disfonksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (37,38). İnflamasyon ile oksidatif stres arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. İnflamatuvar hücreler yüksek miktarlarda reaktif oksijen radikali (ROS) üretmekte ve artan radikaller de inflamasyonu daha da arttırmaktadır (39,40). Daha önce yapılan çalışmalarda ROS'un nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B)'yi aktive ederek

TNF $\alpha$  ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (41). ROS aracılı oksidatif stresin endotel fonksiyonlarının ve damar tonusunun düzenlenmesinde olumsuz etki gösterdiği bilinmektedir (42). Oksidatif stres ve inflamasyon vücutta homeostazın sağlanmasındaki önemli rolleri ile neredeyse tüm patolojilere dahil olan iki fenomendir. İnflamatuar hücreler inflamasyon sahasında serbest radikaller üreterek oksidatif strese sebep olurken (43) ROS proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu uyaran hücre içi sinyaller oluşturmaktadır (44,45). İnflamasyon ve oksidatif stres patofizyolojik olaylar açısından birbirleriyle yakından ilişkili durumlardır ve endotel tabaka onların önemli bir aktivite alanı olarak bilinmektedir.

CD200'ün skuamöz hücreli kanser (SCC)'de damar endotel hücrelerinde sağlıklı bireylere göre daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (46). SCC mikroçevresinde CD200 temel olarak damar endoteline lokalize bulunmuştur. Ko ve ark. (47) endotelial CD200'ün makrofaj fonksiyonlarını inhibe ederek ve makrofaj adezyon moleküllerini baskılayarak inflamasyon sırasında diapedezi önleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmalarda hem fare hem insan damar endotel hücrelerinde CD200'ün eksprese edildiği, ekspresyonun endotel tipine bağlı olarak farklı düzeylerde olup çeşitli durumlarda özellikle inflamasyon ile indüklenebildiği gösterilmiştir (46–48).

CD200/CD200R etkileşiminin immüno-regülatör rolleri yapılan çalışmalarla bir miktar aydınlatılmış olsa da bu etkileşimin aktivasyonu sonrası devam eden yollar ve ortaya çıkan sonuçların altında yatan mekanizmalar henüz netliğe kavuşmamıştır. Endotel hücrelerinde de eksprese edilen CD200'ün endotel fonksiyonlarına etkisi ve bu etkide TNF $\alpha$  aracılı inflamasyon ile oksidatif stresin rolü daha önce çalışılmamıştır. Bu teze konu olan çalışmanın amacı, CD200 ligand silinmiş farelerden elde edilen damarlarda endotel fonksiyonlarının değişip değişmediğini saptamak, oksidatif stres ve TNF $\alpha$ 'nın bu fonksiyonları etkileyip etkilemediğini değerlendirmek ve bu konuda literatüre katkı sunmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. CD200 Molekülünün Keşfi ve Yapısı

CD200, hücre yüzey glikoproteinlerinin tanımlanması için yapılan çalışmalar sırasında keşfedilmiş ve bir süre 'MRC OX2' adıyla anılmıştır (5). Dokuların düzenlenmesi ve farklılaşmasında hücre yüzeyleri arasında proteinler aracılığıyla gerçekleşen etkileşimlerin oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Hücre yüzeyindeki neredeyse tüm proteinler glikozile şekilde bulunurlar, hücrenin yaşamsal faaliyetleri için büyük öneme sahiptirler (49) ve mikroorganizmaları tanıma, hücre adezyonu, ligand bağlanması gibi pek çok hücre dışı faaliyette çeşitli görevler üstlenmektedirler (50–52). 1979 yılında McMaster ve Williams (5), insanda immün sistemin düzenlenmesinde, özellikle kısa peptitlerin T hücrelere tanıtımında önemli rol oynayan insan lökosit antijenleri (HLA)-DR'nin (53) fare ve sıçan homologu olan Tip 1a benzeri glikoproteinleri tanımlamak için yaptıkları çalışmada 'MRC OX2' monoklonal antikoru sentezleyen hücre serisini üretmiş, ayrıca beyinde ve timusta MRC OX2 molekülünün ekspresyonuna rastlamışlardır. McMaster ve Williams tarafından üretilen bu hücre serisinde bulunan antikor kullanarak, günümüzde 'CD200' adıyla anılan MRC OX2, 1882 yılında Barclay ve ekibi tarafından tanımlanmış ve izole edilmiştir (1). CD200'ün 41-47 kDa moleküler ağırlıkta bir hücre yüzey proteini olup aktif T ve B lenfositler, dendritik hücreler, endotel hücreleri, periferik sinirler, böbrek düz kas hücreleri ve bağırsaklar gibi farklı pek çok dokuya ek olarak kanser hücrelerinde de sentezlediği gösterilmiştir (1,7,54). Bu molekülün lenfoid ve lenfoid olmayan çeşitli dokularda, farklı tip hücrelerde sentezleniyor oluşu vücutta genel bir düzenleme fonksiyonundan çok spesifik işlevleri olabileceğini düşündürmüştü; DNA ve aminoasit sekanslarının lenfositlerin antijen tanınmalarında ve hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rol oynayan IgSF molekülleri (CD4, CD8, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM), nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) gibi) ile olan yüksek oranda benzerliği ise immün sistemde önemli rolleri olabileceğine işaret etmiştir (2,55). 248 aminoasit (a.a) uzunluğunda olan CD200'ün 2 adet IgSF domaininden (V + C) oluşan bir ekstraselüler parça (202 a.a), bir

transmembranel parça ve sinyal oluşturma özelliği bulunmayan küçük bir intrasitoplazmik kuyruk (19 a.a) içerdiği bilinmektedir (2). Membrana bağlı ve plazmada çözülebilir formları mevcut olan (56) CD200'ü sentezleyen genler insanlarda kromozom 3'te lokalizedir (3q12-13) (57). İnsan-fare CD200 ligandları arasında %77,6 protein, %81,7 DNA; insan-sıçan CD200 ligandları arasında %77,2 protein ve %80,7 DNA benzerliği bulunmaktadır (58). CD200 pek çok dokuda yapısal olarak eksprese edilmektedir ve yapısal ekspresyonu inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan C/EBP (CCAAT/bağlanmayı arttırıcı protein)- $\beta$  tarafından düzenlenirken (59); inflamatuvar sitokinler olan IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$ 'nın indüklenebilir CD200 ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (60).

Hem dokulardaki geniş çaplı dağılımı hem de sinyal oluşturmayan kısa sitoplazmik kuyruğu CD200'ün fonksiyonlarının anlaşılmasını zorlaştırmıştır. IgSF domain taşıyan yüzey glikoproteinleri (CD4, CD8, ICAM, VCAM, NCAM vb.) lökosit yüzeylerindeki transmembranel proteinlerin çoğunu oluşturmaktadır ve ekstraselüler uzantıları aracılığıyla hücreler arası etkileşimlerde rol oynadıkları bilinmektedir (61). CD200'ün lökosit yüzey glikoproteinleri gibi 2 adet IgSF domain içermesi bu moleküllerle benzer şekilde immün sistemde hücreler arası etkileşimlerde ve yabancı maddeleri tanımada görev alabileceğini düşündürmüştür, CD200'ü ilgi çekici bir araştırma konusu haline getirmiştir.

## 2.2. CD200 Molekülünün Fonksiyonları

CD200 molekülünün immün sistemdeki rolünü anlamak amacıyla yapılan ilk çalışmalar arasında transplantasyon çalışmaları yer almaktadır. Preklinik çalışmalarda portal venin immünizasyonunu takiben donör allograft/ksenograftlara tolerans ile graft sağ kalımında görülen artış, lenfoid hücrelerden salınan sitokinlerin yardımcı T hücrelerin (Th) inflamatuvar Th1 alt grubunun sitokin profilinden (IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), antiinflamatuvar Th2 alt grubu sitokin profiline (IL-4, IL-10, IL-13, transforme edici büyüme faktörü (TGF)  $\beta$ ) kayması ile ilişkilendirilmiştir (62–64). Deri, böbrek, kardiyak ve intestinal transplant hayvan modellerinde CD200'ün allograft sağ kalımını arttırdığı gözlenmiştir (13,65,66). Transplante dokuya karşı tolerans gelişiminin pek

çok mRNA ekspresyonunda artışla ilişkili olduğu, artan mRNA'lardan birinin dendritik hücre (DC) yüzeylerinde de eksprese edilen CD200'e ait olduğu görülmüştür (67). DC'lerin de içlerinde bulunduğu antijen sunan hücrelerin (APC) sentezledikleri major doku uygunluk kompleksi (MHC) ve ko-stimülatör moleküllerin (CD28:CD80, CD86, CD40:CD40L) yardımıyla T hücrelerin aktivasyonunda ve transplantasyonda tolerans gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (68–70). Bununla birlikte DC'lerin yüzeylerinde bulunan CD200'ün immün fonksiyonların düzenlemesinde ko-stimülatör reseptörler gibi rol oynayabileceği düşünülmüş ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. CD200 blokajı yapılan çalışmalarda graft sağ kalımındaki artışın ortadan kalktığı, Th2 sitokine kaymanın tersine döndüğü görülmüştür (13,66,71). Ayrıca CD200Fc'nin T hücre aktivasyonunu ve Th1 sitokin üretimini baskılandığı gösterilmiştir (65). DC'lerde eksprese edilen CD200, CD80 ve CD86 ile yüksek homolojiye sahip olup (72), bu moleküllerden farklı olarak Th2 sitokinlerde yaptığı artış nedeniyle daha çok immünosupresör bir faktör olarak düşünülmüştür (13,67,73). İmmünsupresyon ko-stimülasyonun bloklanmasıyla oluşabileceği gibi, T hücrelere direkt veya indirekt düzenleyici inhibitör sinyaller ileten moleküllerin (*CD47/Sinyal düzenleyici protein (SIRP) $\alpha$ , programlanmış hücre ölümü (PD)-1/PD-Ligandı (PD-L), sitotoksik T lenfosit ilişkili protein (CTLA)-4/CD80, CD86 gibi*) etkileşimiyle de oluşabilmektedir (74–76). CD200'ün düzenleyici bu immünsupresif moleküllerden biri olduğu düşünülmektedir.

CD200'ün santral sinir sistemi (SSS) üzerine olası etkileri ise ilk olarak Hoek ve ark. (3) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada fasiyal sinir transeksiyon modelinde CD200 ligandı silinmiş (CD200KO) fareler ve kontrol grubu karşılaştırılmış, CD200KO farelerde sinir hasarıyla SSS makrofajları olan mikrogliaların aktivasyonunun arttığı ve daha erken dönemde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Aynı ekip mikroglia/makrofajların rol aldığı inflamatuvar otoimmün hastalıklarda CD200'ün hastalık süreci üzerine etkisini anlayabilmek için beyin ve eklemleri etkileyen hastalık deney modellerinde (*sırasıyla multiple skleroz (MS) deney modeli olan otoimmün ensefalomyelit (EAE) ve romatoid artrit (RA) deney modeli olan kollajenle indüklenen artrit (CIA)*) çalışmış ve her iki deney modelinde de CD200KO farelerde daha erken dönemde

ve daha şiddetli hastalık gelişimine rastlanmıştır. Ayrıca bu deneylerde indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunda ve makrofaj/mikroglia düzeyinde artış gözlenmiştir. CIA deney modeliyle yapılan başka bir çalışmada CD200Fc uygulaması ile farelerde TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  sentezinde ve artrit gelişiminde azalma gözlenmiştir (14).

Tümör immünolojisi alanına ilginin arttığı dönemde immünoregülasyondaki olası rolleriyle CD200 de bu alanda çalışılmaya başlanmıştır. Lösemi tümör modellerinde CD200Fc, tümör büyümesine karşı savunmayı CD4+ ve CD8+ T hücreleri aracılığıyla baskılayarak tümör büyümesini hızlandırmış ve mortaliteyi arttırmış, anti-CD200 tedavisi ise tümöre karşı immüniteyi desteklemiştir (77). Kronik lenfositik lösemide (KLL) potansiyel bir terapötik antikor veya tanıya yardımcı bir diagnostik marker bulabilmek için yapılan bir çalışmada B hücre yüzey proteinleri karşılaştırılmış, KLL grubunda B hücrelerde CD200 ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar CD200'ün diagnostik bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür (78). Th1 sitokinlerin etkili sitotoksik yanıt için gerekli olduğu ve bazı kanser türlerinde ilerlemenin Th1 fenotipten Th2'ye kayma ile ilişkili olduğu bilinmektedir (79–81). CD200 Th1 sitokin profilinden Th2 sitokin profiline kayma ile ilişkili olup bu kaymayı tersine döndürecek stratejilerden biri olarak CD200 aksı kanserde potansiyel terapötik bir molekül olarak dikkatleri üstüne çekmiştir.

CD200'ün sinyal oluşturabilen bir sitoplazmik kuyruğu ya da adaptör proteinler için bir bağlanma bölgesi olmadığından immün sistemin regülasyonundaki rollerini reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmüştür (82). CD200'ün fonksiyonlarının anlaşılmasında kilit nokta spesifik olarak bağlandığı bir reseptör tanımlamak ve onun fonksiyonlarını araştırmak olduğundan çalışmalar CD200 reseptörlerine yönelmiştir.

### **2.3. CD200R Molekülünün Keşfi ve Yapısı**

2000 yılında Wright ve ekibi CD200'e benzer şekilde iki adet IgSF domain içeren, CD200'den farklı olarak sinyal oluşturma yeteneği olan uzun bir sitoplazmik kuyruğa sahip reseptörü 'OX2R'yi tanımlamışlardır (8). Zamanla OX2 'CD200' olarak adlandırılırken reseptörü OX2R ise 'CD200R' olarak adlandırılmıştır. CD200 dokularda yaygın bulunan bir hücre yüzey proteiniyken CD200R

immünoregülasyondaki rolüne işaret edecek şekilde özellikle myeloid hücrelerde, makrofajlar, mikroglialar, dendritik hücreler, mast hücreleri, bazı T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde eksprese edilmektedir (8,54,83,84). Her iki protein de Ig-benzeri domainler içerirken reseptörün sitoplazmik kuyruğu daha uzun olup sinyal motifleri içermektedir (8). CD200 ve CD200R N terminal uçlarından GFCC' yüzlerinden birbirlerine tutunurlar (85). CD200R'nin spesifik dağılım paterni, ligandı ile bağlandığında myeloid ve lenfoid hücrelerde immün fonksiyonları düzenleyen hücre içi sinyaller oluşturabileceğine işaret etmiştir. Nöronlarda CD200 (18), mikroglialarda ise CD200R (8) eksprese edilmekte; travma veya iskemi gibi durumlarda CD200/CD200R etkileşiminin nöroinflamasyonu baskılayıcı roller üstlendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (3,86,87). Kronik inflamasyonla seyreden nörodejeneratif hastalıklar olan Parkinson hastalığı (PH) ve Alzheimer hastalığı (AH) ise CD200/CD200R etkileşiminde azalma ile ilişkili bulunmuştur (88,89). Yapılan farklı çalışmalarda CD200/CD200R etkileşimi bloke edildiğinde çeşitli inflamatuvar patolojilerin (RA, MS, üveoretinit gibi) şiddetinde artış görülmüş (3,90), CD200R'nin uyarılmasıyla makrofaj aktivitesinin ve inflamasyonun baskılandığı gözlenmiştir (91,92). Ayrıca CD200/CD200R etkileşiminin ortamın sitokin profilini inflamatuvar Th1 sitokinlerden anti-inflamatuvar Th2 sitokinlere kaydırıldığını gösteren pek çok çalışma da mevcuttur (4,93).

İmmün sistemde görevli hücreler yabancı maddelere, enfeksiyöz organizmalara ve patojenlere karşı yeterli efektif immün yanıtlar oluştururken bir yandan da vücudun self toleransını sağlayan düzenleyici mekanizmalara sahiptirler (94,95). Patojenlere karşı immün yanıtlar daha çok sitokinler ile geniş alanlarda etkili olurken immün sistemin spesifik kontrolünde myeloid hücrelerde eksprese edilen inhibitör ve aktivatör reseptörlerin birlikte görev aldığı bilinmektedir (96–98). Hücre yüzey reseptörlerinden kaynaklanan aktivatör ve inhibitör sinyaller normal koşullar altında vücuttaki immün sistemin homeostazda kalmasını sağlar ve vücudu immünopatolojilerden korur. Bu mekanizmalarda bozulma kronik inflamasyon, otoimmünite ve alerji gibi immünopatolojik sonuçlar ortaya çıkarır (99–101). Yapılan çalışmalar CD200R'nin myeloid ve lenfoid immün sistem hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde

görevli, efektif inflamasyon ile immünopatoloji oluşumu arasındaki dengede anahtar rol oynayan, doku homeostazının sağlanmasında önemli bir immün inhibitör reseptör olduğuna işaret etmiştir (3,71,90,102). İmmün inhibitör reseptörler daha çok ya IgSF ya da C-tip lektin reseptör ailesine dahil olup çoğu immünoresseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi 'ITIM' olarak adlandırılan ortak bir sitoplazmik parça içerir (103). Tüm ITIM'lar tirozin fosforilasyonu ile fosfatazları [SRC homoloji 2 bölge içeren fosfatazlar (SHP1, SHP2) veya inozitol fosfatazlar (SHIP)] toplarlar. Fosfatazların ITIM içeren reseptörlere bağlanması, hücre aktivasyonunu baskılayan defosforilasyon reaksiyonlarını başlatır. CD200R ise immün inhibitör reseptörlerden biri olmasına rağmen diğer inhibitör reseptörlerin çoğundan farklı olarak ITIM içermez, sitoplazmik kuyruğunda üç adet tirozin rezidüsü (Y286, Y289, Y297) bulundurur (104). Y297, fosfotirozin bağlayan parça (PTB) içeren ve inhibitör adaptör proteinler (Dok1, Dok2) için bağlanma bölgesi bulduran bir NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) motifinde lokalizedir. Dok proteinlerinin fosforilasyonu ile SHP2 aracılı RasGAP (GTPaz aktive edici protein), SHIP, Csk (C terminal Src kinaz) gibi inhibitör moleküllerle etkileşim tetiklenir. B hücrelerde Dok1 aracılı mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) inhibisyonunun hücre aktivasyonunu baskıladığı (105), Dok2'nin ise RasGAP aracılığıyla T hücrelerin gelişimini düzenlediği bilinmektedir (106). Ayrıca Dok2-RasGAP kompleksi Ras aktivasyonunu inhibe ederek inflamatuvar yolaklar olan MAPK, Fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K)/Akt ve inflamasyondan sorumlu genlerin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'nin (107) aktivasyonunu da baskılamaktadır (104,108–111). Mast hücrelerinde ise Dok1 aşırı sentezinin Ras/Raf/ERK sinyalinde inhibisyon ve TNF $\alpha$ 'nın de novo sentezinde azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (112). CD200R, ligandı ile bağlandığında Dok1 ve Dok 2 aracılı RasGAP ve SHIP toplanması, Ras inhibisyonu ve potansiyel diğer aracı mediatörlerle MAPK'ların (ERK, p38, JNK) aktivasyonunu baskılayarak immüno-regülasyonda rol oynuyor gibi görünmektedir (104,109). Yapılan çalışmalarda insanlarda bulunmayıp farelerde eksprese edilen farklı CD200 reseptörlerine de rastlanmış, bulunan ilk reseptör CD200R1 olarak adlandırılırken

keşfedilen reseptörler CD200R2-5 veya CD200La-d olarak adlandırılmıştır (83,113,114). Bu reseptörlerin ligandları ve fonksiyonları henüz netlik kazanmadığından bu çalışmada kafa karışıklığını önlemek amacıyla CD200R1'den 'CD200R' olarak bahsedilmektedir.

#### **2.4. CD200R Molekülünün Fonksiyonları**

Makrofajlar bağışıklık sisteminin çok yönlü oyuncularıdır. Patojenleri ve zararlı endojenleri çeşitli kemokinlerin, sitokinlerin salınımıyla ve fagositoz aracılığıyla nötralize ederek etkili bir immün yanıt oluşturulmasına katkı sağladıkları gibi immün yanıtların rezolüsyonunda da önemli roller üstlenmektedirler (115,116). Klasik inflamatuvar M1 makrofajlar yüksek oranda proinflamatuvar sitokin, NO, ROS sentezler, direkt veya indirekt (Th1 hücreler aracılı) olarak immün yanıtları düzenleyerek patojenleri temizler ve IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  ile TNF $\alpha$  tarafından indüklenirler. Regülatör antiinflamatuvar M2a makrofajlar ise Th2 aracılı immün yanıtları düzenler, yara iyileşmesinde rol oynar ve IL-4, IL-13 ile indüklenirler. CD200/CD200R etkileşimi bloke edildikten sonra inflamatuvar hastalıkların şiddetinde görülen artış (3,90) CD200R aktivasyonunun makrofajları baskılayıcı bir sinyal oluşturabileceğine ve makrofaj aktivitesini, böylece inflamasyon alanındaki doku hasarını sınırlandırabileceğine işaret etmektedir (91,92). Yapılan çalışmalar CD200/CD200R etkileşiminin proinflamatuvar yolakları baskılayıcı etkileri üzerine yoğunlaşmış olsa da antiinflamatuvar yolaklar üzerinden de immüno-regülasyonda rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Antiinflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-13 ile CD200 ve CD200R ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (89,102,117,118). İnsan monosit hücre kültürlerinde IL-4 ile indüklenen CD200R ekspresyonunun antiinflamatuvar fenotipte olan M2a makrofajlarla eş zamanlı arttığı gösterilmiş, bu bulgu CD200R'nin M2a makrofajlar için bir hücre yüzey markerı olabileceğine işaret etmiştir (102). Bu çalışmanın bulgularına göre CD200R, IL-4 aracılı M2 makrofajların aktivasyonu ile Th2 immün yanıtlarını uyarıyor, doku iyileşmesini ve homeostazını sağlayacak immüno-supresif ortamın oluşmasını destekliyor gibi görünmektedir (102).

## 2.5. CD200/CD200R ve Santral Sinir Sistemi

SSS'de patojenlerin ve immün moleküllerin girişi kan beyin bariyeri ile sıkı şekilde kontrol altında tutulmakta ve inflamatuvar koşullar altında bile mikroglia aracılı immün reaksiyonlar, düzenleyici mekanizmalar ile immünopatolojilere engel olacak şekilde baskılanmaktadır. Nöronlarda ve oligodendrositlerde CD200'ün (18,19), mikroglialarda ise CD200R'nin eksprese ediliyor oluşu (8) CD200/CD200R etkileşiminin SSS'de olası rollerine işaret etmiş ve bu etkileşimi ilgi çekici bir araştırma konusu haline getirmiştir. CD200KO farelerden hazırlanan glial hücre kültürü gram (-) bakteri duvarı lipopolisakkaridi (LPS) veya IFN $\gamma$  ile uyarıldığında TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve iNOS seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışla beraber mikrogliaların da daha yüksek oranda aktive oldukları görülmüştür (16,119). CD200 yokluğunda görülen bu artmış inflamatuvar yanıt CD200/CD200R etkileşiminin proinflamatuvar mikroglial aktivasyonu baskıladığına işaret etmektedir. LPS ile indüklenmiş retinal mikroglial kültüre CD200Fc eklendiğinde NF- $\kappa$ B'yi baskılayarak proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği görülmüştür (16,120).

Kronik inflamasyonla seyreden, yaşlanmanın önemli bir risk faktörü olduğu ve patogenezinde mikrogliaların önemli rol oynadığı nörodejeneratif hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson hastalıkları CD200/CD200R etkileşiminde azalma ile ilişkili bulunmuştur (17,89). 3 aylık farelerle kıyaslandığında 24 aylık farelerde yaşla birlikte klasik makrofajların aktivasyonunu baskılayan IL-4, IL-13 ve CD200 mRNA ekspresyonlarında azalma görülürken; CD86, IFN $\gamma$ , MHCII gibi inflamatuvar markerların mRNA'larında artış görülmüştür (121). A $\beta$ -amiloid uygulanmış yaşlı sıçanlarda mikroglial aktivasyonda artma ile CD200 ekspresyonlarında azalma gözlenmiş, IL-4 ilave edildiğinde bu bulguların tersine döndüğü saptanmıştır (122). Alzheimer hastalığı olan kişilerin postmortem beyin dokularında yapılan çalışmada hipokampus ve inferior temporal gyruslarda CD200 ve CD200R seviyelerinde anlamlı azalma görülmüş, doku mikrogliaları IL-4 ve IL-13 ile kültüre edildiğinde CD200R ekspresyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir (89). Ayrıca sıçanlarda PH deney modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda CD200/CD200R ekspresyonlarında azalma görülmüş, CD200 uygulanmasıyla mikroglial aktivasyon

baskılanarak IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  ekspresyonlarında azalma saptanmıştır (17). Benzer bir modelde CD200R blokajı daha yüksek TNF $\alpha$  ve IL-6 seviyeleri, artmış mikrogliyal aktivite ve daha şiddetli hastalıkla ilişkili bulunmuştur (123). SSS'nin kronik inflamatuvar nörodejeneratif otoimmün hastalığı olan multiple skleroz deney modellerinde de (EAE) CD200 seviyelerinde azalma gözlenmiş (124,125), CD200Fc uygulamasının SSS mikrogliya/makrofajları inhibe ettiği, CD80, MHCII, IL-6, TNF $\alpha$ , NO gibi inflamatuvar parametreleri azalttığı görülmüştür (20).

Retina, SSS'nin immün ayrıcalıklı bir bölgesi olup mikrogliya-nöron iletişimi burada sıkı bir kontrol altında tutulmaktadır. Retinada CD200R ekspresyonu olmamakla birlikte nöronal ve endotel dokuda CD200 ekspresyonu mevcuttur (126). Deneysel otoimmün üveoretinit (EAU) modelinde T hücre aracılı IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  üretiminin arttığı ve aktive olan klasik makrofajların iNOS sentezlediği bilinmektedir (127). CD200KO farelerde EAU modelinde retinada mikrogliya ve makrofajlar sayıca artmış ayrıca makrofaj aktivasyon belirteci iNOS'un sentezinde de artış gözlenmiştir (90). Aynı modelde CD200R agonistinin kullanılmasıyla retinal makrofaj aktivasyonu ve infiltrasyonu baskılanmıştır (92). CD200R monoklonal antikoru (mAb) kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise hastalık daha erken başlayıp daha şiddetli seyretmiş, doku yıkımı, iNOS düzeyleri ve bununla birlikte endotel dokuda CD200 ekspresyonlarında artış saptanmıştır (128). Ancak bu çalışmada benzer çalışmalarda gözlenenin (3,90,92) aksine dokuya infiltre makrofajlar sayıca artmamış, bu durum dikkatleri endotel tabakanın CD200R+ hücrelerin dokuya geçişi ve dolaşım trafiğindeki olası rollerine çekmiştir.

## **2.6. CD200/CD200R ve Otoimmün Hastalıklar**

Eklemleri tutan, kronik inflamasyonla seyreden otoimmün bir hastalık olan romatoid artrit deney modelinde CD200Fc profilaktik olarak uygulandığında CIA gelişimini önlediği gözlenmiştir (14). CIA deney modelinde CD200KO farelerde hastalık daha hızlı progresyon göstermiş, CD200Fc uygulaması ile proinflamatuvar TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  sitokinlerinde azalma ve hastalık seyrinde yavaşlama görülmüştür (129). Yapılan bir diğer çalışmada hastalığın indüklenmesiyle artritli eklemden CD200

ve CD200R ekspresyonlarında artış gözlenirken, CD200RKO farelerde hastalık şiddetinde artış saptanmıştır (130). IL-17, Th17 hücrelerinden kaynaklanan bir sitokin olup makrofaj aktivasyonu ve IL-6 salınımlarında artışla inflamatuvar yanıtlar oluşturmaktadır; bu sitokinler RA patolojisinde anahtar rol oynamaktadır (131). RA hastalarından alınan periferik kan mononükleer hücreleri arasında CD200 veya CD200R eksprese eden hücrelerin oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmışken; sinovyumda lokalize CD200+ hücreler kontrol grubuna göre artmış, infliximab (anti-TNF $\alpha$  mAb) ve metotreksat (MTX) kullanımı ile periferik CD200, CD200R ekspresyonlarında artış saptanmış, bu artışın hastalık klinik skorlarında iyileşme ile korele olduğu gözlenmiştir (11). Yine bu çalışmada CD200Fc tedavisi CD4+ T hücre proliferasyonunu ve Th17'ye farklılaşmayı inhibe etmiştir. Başka bir RA çalışmasında CD4+ T hücrelerde CD200 ekspresyonunun seropozitif hastalarda ve anti-TNF $\alpha$  tedavisi alan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu, ancak CD200 seviyelerinin klinik hastalık şiddetiyle korele olmadığını gözlemlemişlerdir (132). Araştırmacılar daha önce yapılan çalışmalarda gösterilen TNF $\alpha$  ile indüklenen CD200 ekspresyonuna (60) zıt görünen bu durumu hastalık seyrinde daha yüksek TNF $\alpha$  seviyelerine sahip olan RA hastalarının anti-TNF $\alpha$  tedavisine iyi yanıt veriyor olması ile ilişkilendirmiş ve CD4+ T hücrelerinde CD200 ekspresyon seviyelerinin RA hastalarında anti-TNF $\alpha$  ile tedaviye uygunluk açısından bir belirteç olabileceğinden bahsetmişlerdir (132).

## 2.7. CD200/CD200R ve Kanser

CD200'ün immüsupresif rolleri düşünüldüğünde diğer immün kontrol noktaları (CTLA-4, PD-1, CD47) gibi antitümöral T hücre yanıtlarını ve NK hücreleri baskılayarak protümörojenik bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (133–135). Akut myeloid lösemi (AML) (24), multiple miyelom (MM) (21), kronik myeloid lösemi (KML) (136) gibi pek çok hematolojik kanserde; rektal (137), meme (138), kolon (139), akciğer (140), over (141), baş-boyun (142), pankreas (143) ve mesane kanseri (144) gibi solid tümörlerde, ayrıca skuamöz hücreli, bazal hücreli kanserler (SCC, BCC) ile melanom gibi cilt kanserlerinde (46,145,146) CD200 ekspresyonuna

rastlanmıştır. Bununla birlikte, tümörü besleyen damarların endotel hücreleri ve tümör mikroçevresinde (TME) bulunan aktif T lenfositler ile myeloid hücrelerde de CD200 ve CD200R ekspresyonları saptanmıştır (46,146–148). Tümör ilişkili makrofajlar (TAM), myeloid kaynaklı supresör hücreler (MDSC) ve tümör ilişkili dendritik hücreler (TADC)'den oluşan tümör ilişkili myeloid hücreler (TAMC) TME'de CD200R eksprese eden temel hücreler olup (147) tümör ilişkili inflamasyonda, anjiogenezde, tümör invazyonu ve metastazında rol oynayan, tümör spesifik T hücreli yanıtları düzenleyen önemli yapılardır (149–151). Tümör hücrelerince eksprese edilen CD200 ile TME'de bulunan myeloid hücrelerde eksprese edilen CD200R'nin etkileşiminin tümör ilişkili inflamasyon ve immün yanıtların düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (146–148).

İn vitro çalışmalarda lösemik tümör hücrelerinde CD200 ekspresyonunun tümör spesifik T hücreli yanıtları inhibe ettiği gösterilmiştir (77). CD200 KLL'de sitotoksik CD8+ T hücre proliferasyonunu inhibe etmiş (134), in vitro CD200 blokajı CD8+ T hücrelerinin CD200+ lenfoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini arttırmıştır (152). AML'de artmış CD200 ekspresyonunun antitümöral NK ve bellek T hücre yanıtlarını direkt olarak baskılayabildiği, anti-CD200 tedavisi ile bu baskılanmanın ortadan kalktığı gösterilmiş (135,153). Yine AML'de CD200 ekspresyonu Treg hücrelerde artış ile immüsupresör bir TME (25) ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (24). AML ve ALL fare deneylerinde anti-CD200 antikoru ile IL-2 ve IFN $\gamma$  üretiminde artma, Th1 sitokin yönünde kayma, hastalık gelişiminde yavaşlama ortaya çıkmıştır (154,155). Multiple miyeloma hastalarında miyeloma hücrelerinde CD200 mRNA ekspresyonu azalmış sağ kalımla ilişkilendirilmiş (21), daha sonra yapılan bir başka çalışmada ise miyeloma hücrelerinde CD200 ekspresyonunun kaybı klinik olarak daha şiddetli hastalıkla ilişkili bulunmuştur (156). Zıt sonuçları olan bu iki çalışma arasında hastaların tanı anında veya tedavi aldıktan sonra çalışmaya dahil edilmesi, kullanılan CD200 ölçüm metodları gibi farklılıklar bulunmaktadır. İmmüsupresif fenotipi ile immünoterapiye dirençli bir kanser olan pankreatik adenoduktal karsinomda (PDAC), tümör epitel ve stromal hücrelerinde yüksek oranda CD200, MDSC'lerde ise yüksek oranda CD200R ekspresyonuna

rastlanmış (143,157), PDAC fare modelinde yapılan çalışmada CD200/CD200R sinyali anti-CD200 mAb ile bloke edildiğinde MDSC seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, CD4+ T hücrelerin arttığı ve tümör büyümesinin baskılandığı görülmüştür (157). MDSC'lerin immünsupresör etkiye sahip immature hücreler olduğu, arjinaz-1, iNOS, ROS ve IL-10, IL-13, TGF $\beta$  gibi sitokinler salgılayarak bir yandan Treg, M2 tip makrofajlar ve tolerojenik DC gibi immünsupresör hücre popülasyonlarını uyarırken bir yandan da T ve NK hücreler aracılı antitümöral yanıtları inhibe ettiği bilinmektedir (158,159). BCC'de CD200 varlığı kanser kök hücrelerinde tümör oluşturma kapasitesi ile ilişkilendirilmiş (145), CD200'ün MAPK/ERK yolağının inhibisyonu ile IFN $\gamma$  aracılı sitotoksik antitümöral yanıtları azalttığı, NK hücrelerin aktivitesini baskıladığı ve apoptozlarını arttırdığı gösterilmiştir (160). SCC'de ise CD200 molekülünün metastatik kapasiteyle pozitif yönde korele olduğu bulunmuştur (22).

CD200/CD200R yolağı antitümöral tedavilerde hedef olarak kullanılan immün kontrol noktalarıyla (PD-1, CTLA-4) benzerlikler taşıdığından kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olarak araştırılmaktadır. Bir insan anti-CD200 monoklonal antikoru olan Samalizumab, CD200 eksprese eden hücrelerde CD200/CD200R aksını bloke etmek için tasarlanmış, KLL ve MM hastalarında (sırasıyla 23 ve 3 hasta) faz 1 çalışmaları yapılmıştır (161). KLL hastalarında tümör yükünü %65 oranında azalttığı ancak bu etkide 6 yıllık deney süresince devamlılığın sadece 1 hastada sağlandığı; MM hastalarının ise tedaviye yanıtızsız oldukları görülmüştür. Çalışmada cilt döküntüleri, eklem ağrısı, baş ağrısı, kanama bozuklukları gibi az ve orta şiddetli yan etkiler raporlanmıştır. Bu yan etki profili CD200 silinmiş farelerde ve PD-1, CTLA-4 antikor tedavilerinin klinik çalışmalarında görülen yan etki profilleriyle benzer nitelikte bulunmuştur. CD200/CD200R blokajıyla görülen kısa süreli yanıtların, bu moleküllerin NK ve T hücreleri dışında TME'de bulunan MDSC ve TAM gibi hücreler üzerinde başka mekanizmalarla oluşturdukları etkilerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (162). Ayrıca intrinsik bir proteaz (gama sekretaz) ile koparılan CD200'ün kuyruk parçasının beta-katenin ile bağlanarak nükleer translokasyonla tümör büyümesini destekleyebilecek

transkripsiyonel faktörlerin sentezini arttırabileceği (163) veya farklı kanser tiplerinde sentezlenen ekstrinsik proteazlarca (164,165) dolaşıma saçılan solubl CD200'lerin kullanılan antikörlerle tam olarak bloke edilemeyebileceği de öne sürülmüştür (166).

Bir tümörün gelişimi ve büyümesi protümörojenik olaylar, tümörü besleyen kan damarlarının anjiyogenezi, tümör ilişkili inflamasyon ve T hücre yanıtları gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (151,167). Kontrol altına alnamayan kronik inflamasyon immünsupresif, tümörojenik bir ortam yaratarak tümör gelişimi ve metastazda rol oynamaktadır (168). İmmün sistemin kronik aktivasyonu, inflamatuvar bir mikroçevre, DNA hasarı ve malign transformasyonla sonuçlanmaktadır (167). CD200'ün tümör ilişkili inflamasyonu ve anjiogenezi baskılayarak antitümöral etkiler gösterebileceği düşünülmektedir (146). Miyeloid hücreler tümör hücrelerinin migrasyon, invazyon ve metastazlarında görevli yardımcılarıdır, TME'de TAMC'lar anjiyogenezi, tümör hücrelerinin göçünü ve invazyonunu başlatır, metastatik alanlarda antitümöral immüniteyi baskırlar (168,169). TAMC'lar CD200R ekspres eden major hücre serisi olduğundan (147) CD200 aracılı TAMC inhibisyonunun tümör formasyon ve metastazını inhibe edebileceği de düşünülmektedir. CD200+ ve CD200- B16 melanom hücreleri kıyaslandığında CD200+ hücrelerin uygulandığı deney grubunda tümör formasyonu ve akciğer metastazının anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (146). CD200R'nin uyarılması ile CD200- malign melanomun akciğerlere metastazının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise CD200RKO farelerde CD200- B16 melanomda tümör büyümesinde bir değişiklik yokken CD200+ tümörde artmış büyüme ile birlikte myeloid hücrelerde, anjiogenezi ile ilişkili VEGF ve HIF-1 $\alpha$  genlerinde artış görülmüştür (148). Metastaz yeteneği yüksek agresif bir kanser modeli olan 4THM fare meme kanseri modelinde CD200'ü aşırı ekspres eden transgenik (CD200tg) farelerde IFN $\gamma$  ve IL-10 salınımında artışla TNF $\alpha$  ve IL-6 salınımında, tümör büyüme ve metastazında azalma; CD200RKO farelerde ise tümörü infiltre eden sitotoksik T hücrelerde azalma, TNF $\alpha$  ve IL-6 inflamatuvar sitokinlerde artış ile tümör metastazında artış görülmüştür (12). Nötrofil infiltrasyonu CD200tg farelerde anlamlı şekilde azalmışken CD200RKO farelerde artmıştır. EMT6 meme kanseri modelinde ise CD200tg farelerde kontrol grubuna göre artmış tümöral

büyüme gözlenmiş, anti-CD200 mAb kullanıldığında tümör büyüme ve metastazı azalmıştır (170,171). EMT6 ve 4THM kanser modeli çalışmalarında görülen bu karşıt sonuçlar araştırmacılar tarafından, 'CD200 yüksek immünojenik ve zayıf metastaz yapan tümörlerde malign potansiyeli artırıyor iken artmış sistemik inflamasyonla seyreden agresif tümörlerde antitümöral etki oluşturabilir' şeklinde yorumlanmıştır (12).

Bir SCC çalışmasında CD200 ekspresyonunun invaziv SCC dokusuyla bitişik stromada anlamlı şekilde arttığı gösterilmiş ve SCC'li dokuda vasküler endotel hücrelerinin neredeyse tamamı CD200'ü sentezlerken normal dokuda bu olay gözlenmemiştir (46). Aynı çalışmada tümör süpernatantı ve LPS ile inkübe edilmiş insan dermal endotel hücrelerinde artan CD200 ekspresyonu araştırmacılar tarafından tümör mikroçevresinde bulunan çözülebilir faktörlerin CD200'ü indükleyebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca SCC stromasında normal doku hattına göre anlamlı olarak daha yüksek CD200R ekspresyonu gözlenmiştir. Araştırmacılar tarafından endotelial CD200'ün SCC stromasında bulunan CD200R+ makrofajlar ile diapedez sırasında etkileşime geçerek proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılıyor olabileceği öne sürülmüştür. Tümör hücrelerine ek olarak tümör vasküler yatağının endotel hücreleri de CD200 eksprese etmektedir. Endotelial CD200'ün immün sistem hücreleri ile endotel hücreleri arasındaki etkileşimde ve immün hücre fonksiyonlarının sınırlandırılmasında rol oynayabileceği (46,47), CD200R+ myeloid hücrelerin tümör alanına infiltrasyonunu etkileyerek tümör büyüme ve gelişimini düzenliyor olabileceği düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin metastaz için, antitümöral yanıtları oluşturacak immün hücrelerin ise tümör dokusuna ulaşmak için endotel hücrelerini geçmeleri gerekmektedir (172). Bu nedenle bu çalışmada SCC tümör hücrelerinin antitümöral immün yanıtları baskılamak, tümörün dolaşımında yayılımını arttırmak için endotelial CD200 ekspresyonlarını artırıyor olabileceği düşünülmüştür (46).

## 2.8. Endotel Fonksiyonu, Oksidatif Stres ve İnflamasyon

Vasküler relaksasyon için oldukça önemli bir molekül olan NO'nun keşfiyle damar duvarı ve kan arasında seçici geçirgen basit bir katman olduğu düşünülen endotel tabakanın aslında kompleks fonksiyonları olan büyük bir endokrin organ olduğu anlaşılmıştır (31,173). Endotelyal tabaka kalpten en küçük kapiller damarlara kadar tüm dolaşım sistemini kaplar, oldukça farklı ve benzersiz pek çok fonksiyona sahiptir. Endotel hücreleri fonksiyonlarını bulundukları yüzey reseptörleri ile hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimlerini sağlayan bağlantı proteinleri/reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (174). Sağlıklı bir endotelyal tabaka farklı hücrelerin adezyonunu, trombosit adezyonu ve agregasyonunu, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu, vasküler tonusu ve inflamasyonu düzenleyen pek çok farklı ürün sentezlemektedir (30): NO, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), C-tip natriüretik peptid, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi vazodilatör ajanlar ile endotelin, anjiyotensin 2, tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) gibi vazokonstriktör ajanlar bunlardan bazılarıdır (31,32). Vasküler endotelde bulunan NO, L-arjininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (175). NOS enziminin yapısal NOS'lar olan endotelyal (e)NOS ve nöronal (n)NOS ile indüklenebilir form olan (i)NOS olmak üzere 3 temel izoformu bulunmaktadır (176). eNOS enziminin endotel hücrelerinin mekanik uyarılması, shear stres, asetilkolin (ACh) veya bradikinin tarafından uyarıldığı bilinmektedir (177–179). Endotelde eNOS aracılığıyla sentezlenen NO parakrin etki ile komşu vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) solubl guanilatsiklaz (sGC) aktivasyonunu artırarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretiminde artışa, vasküler düz kaslarda relaksasyona ve böylece vazodilatasyona neden olmaktadır (180). Nitrik oksidin vazodilatör etkisine ek olarak antioksidan etkilere sahip olduğu ve inflamasyonu, platelet agregasyonunu, lökosit adezyonunu inhibe ettiği de bilinmektedir (33). Sağlıklı bir vasküler yatakta fonksiyonel bir endotel tabaka vazodilatasyonla vazokonstriksiyon, proliferasyonla antiproliferasyon, koagülasyonla antikoagülasyon, inflamasyonla antiinflamasyon arasındaki dengeyi düzenlemektedir (181). NO sentezinde veya biyoyararlanımında azalma endotel disfonksiyonunun başta

gelen sebepleridir (35) ve disfonksiyonel bir endotel tabaka endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma ile karakterize olup inflamasyonu, lipoproteinlerin oksidasyonunu, platelet agregasyonunu ve trombüs formasyonunu tetikleyerek ateroskleroz gelişimine zemin hazırlamaktadır (35,181). Ayrıca endotel disfonksiyonu hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi gibi pek çok durumun patogeneğinde önemli rol oynamakta (35,42) ve günümüzde kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde prediktör bir faktör olarak değerlendirilmektedir (182). RA ve psöriazis gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda artmış inflamasyonun endotel disfonksiyonuna neden olarak erken ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (183–186). Endotel disfonksiyonunu önleyen veya ortadan kaldıran tedavi yöntemleri koroner ve serebrovasküler olayları azaltabilme potansiyeli taşıdığından endotel tabaka önemli bir tedavi hedefi haline gelmiştir.

Temelde NO biyoyararlanımını azaltarak endotel disfonksiyonuna katkı sağladığı bilinen oksidatif stres, süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikalleri ( $OH^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi serbest radikaller ile süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır (187). Patolojik koşullar altında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, ksantinoksidaz (XO), siklooksijenaz (COX) gibi ROS üreten enzimlerin aktivasyonunun artması veya bozulmuş mitokondriyal elektron transportu sonucu artan ROS üretimi ve azalan ROS süpürücü antioksidan sistemlerin zemininde oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (188,189). Uzun süreli oksidatif stres farklı mekanizmalar üzerinden NO biyoyararlanımında azalmaya neden olmaktadır. ROS, eNOS ekspresyonunu direkt olarak inhibe edebileceği gibi (190), eNOS'ta uncouplinge de neden olabilmektedir (188,191). Ayrıca NO biyoyararlanımını belirleyen temel reaksiyon  $O^-$  iyonlarının NO ile reaksiyona girerek  $ONOO^-$ 'ya dönüşümüdür ve  $O^-$  artışının bu reaksiyonu arttırarak NO biyoyararlanımında azalma ile endotel disfonksiyonuna neden olduğu da bilinmektedir (188,192).  $O^-$  radikalleri, SOD enzimi aracılığıyla daha az reaktif bir molekül olan  $H_2O_2$ 'ye indirgenmekte ve bu sayede NO biyoyararlanımını azaltan reaksiyona kayma azalmaktadır (42). SOD inkübasyonu ile

tavşan aort halkalarında indüklenmiş  $O_2^-$  salınımının yol açtığı endotel disfonksiyonunun iyileştiği (193), hipertansif sıçan renal arteriollerinde ise yine benzer şekilde asetilkolinle gevşeme yanıtlarının düzeldiği gözlenmiştir (194). ROS artışının NF- $\kappa$ B yolağını aktive ederek, inflamatuvar adezyon moleküllerini, sitokin ve kemokinleri arttırdığı da bilinmektedir (41,195,196). Sitokinler inflamatuvar hücrelerden salınan major sinyal molekülleri olup çok çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$ ) ve anti-inflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF $\beta$ ) olmak üzere 2 grupta sınıflandırılırlar (197). TNF $\alpha$  inflamasyonun en erken salınan ve en önemli sitokinlerinden biri olup homeostazda ve çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Keşfinden bu yana yaklaşık 40 yılda klinikte inflamatuvar hastalıkların (RA, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriyazis gibi) tedavisinde bir hedef molekül haline gelmiştir (198–200). TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B aracılığıyla diğer inflamatuvar sitokinlerin salınmasını, adezyon moleküllerinin aktivasyonunu, iNOS ekspresyonunu uyarmakta ve endotel hücrelerinin de dahil olduğu (201) immün sistem hücrelerinde aktivasyona sebep olmaktadır (202,203). TNF $\alpha$ 'nın inflamasyondaki major rolleri düşünüldüğünde çalışmaların TNF $\alpha$ 'nın biyolojik ajanlarla bloke edilmesinin oluşturacağı etkiler üzerine yoğunlaşmış olması şaşırtıcı bir durum değildir. Yapılan çalışmalarda infliximab gibi monoklonal antikörlerle TNF $\alpha$  blokajının IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  gibi inflamatuvar sitokinlerin, akut-faz proteinlerinin, adezyon moleküllerinin ve iNOS'un ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (204,205). TNF $\alpha$ 'nın kan damarlarında en önemli ROS kaynağı olan NADPH oksidaz (206) aracılığıyla oksidatif stresi arttırdığı, eNOS ekspresyonunu inhibe ettiği ve NO biyoyaralanımını azaltarak endotel fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu bilinmektedir (38,207,208). Tip 2 diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, NADPH oksidaz ve  $O_2^-$  seviyelerinde artış ile koroner arterde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlenirken anti-TNF $\alpha$  (2E2 mAb) inkübasyonu ile ONOO $^-$ ,  $O_2^-$  ve NF- $\kappa$ B seviyelerinde azalma ve koroner arter halkalarında endotel fonksiyonlarında anlamlı düzelme gözlenmiştir (209). Picchi ve ark. (38) metabolik sendromda TNF $\alpha$ 'nın rolünü araştırmak için prediyabetik obez

farelerde koroner arterlerde çalışmış, TNF $\alpha$  artışı ile NADPH oksidaz ve O $_2^-$  seviyelerinde artış ve endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında anlamlı azalma gözlenmiştir, anti-TNF $\alpha$  (2E2 mAb) inkübasyonu ile koroner arterlerde endotel fonksiyonlarında düzelme saptamışlardır. İnsan koroner arter endotel hücrelerinde TNF $\alpha$  inkübasyonunun eNOS ekspresyonunu baskıladığı; insan aortik endotel hücrelerinde ise eNOS ekspresyonunu baskımlarken iNOS ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (210,211). Ayrıca klinik çalışmalarda sağlıklı gönüllülerde TNF $\alpha$  infüzyonu ile endotel fonksiyonlarında bozulma gözlenirken (37); RA, sistemik vaskülit ve Crohn hastalarında infliximab ile tedavinin endotel fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir (212–215).

## 2.9. CD200 ve Endotel

CD200 venlerin, venüllerin, arteriollerin ve kapillerin endotel hücrelerinde önemli oranda eksprese edilirken büyük artelerin endotel hücrelerinde çok daha az miktarda bulunmaktadır (8,47). Farklı vasküler yataklarda (arterler, venler, kapiller) endotel hücrelerinin yapı, fonksiyon, ekspresyon paternleri ve sinyal yolları açısından farklı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (216,217). Arterlerde venlere kıyasla endotelial CD200 ekspresyonunun daha az olmasının, artmış shear stres ve intraluminal basıncın CD200 mRNA ekspresyonunu azaltmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür (47,218). Ayrıca farklı miktarlarda endotelial CD200 ekspresyonu CD200'ün damar endotellerindeki spesifik rollerine işaret ediyor da olabilir (219). İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve insan aortik makrovasküler endotel hücreleri (HAEC) kullanılarak yapılan bir çalışmada LPS ile uyarıldıktan sonra endotel hücrelerinde CD200 ekspresyonunda artış gözlenmiş, bunun olasılıkla endotelden salınan IL-1 gibi inflamatuvar sinyaller aracılı olduğu ileri sürülmüştür (47). Yapılan bir çalışmada TNF $\alpha$  ve LPS'nin C/EBP $\beta$  transkripsiyonunu indükleyerek CD200 mRNA ekspresyonunu arttırabileceği gösterilmiştir (59). Ayrıca endotelial CD200'ün muhtemelen makrofaj adezyon moleküllerinin inhibisyonu ile inflamasyon esnasında artan diapedezi engelleyerek makrofaj fonksiyonlarını ve T lenfositlerin adezyon ve migrasyonunu inhibe edebileceği de düşünülmektedir

(16,47). İskemik inme sonrası ortaya çıkan inflamasyonun mikroglial hücrelerin aktivasyonu ve periferik immün hücrelerin iskemik beyin dokusuna göçüyle karakterize olduğu ve bunun CD200/CD200R aracılı inhibitör mekanizmalarla dengelenmeye çalışıldığı ileri sürülmektedir (220–222). Endotelial CD200'ün iskemik inmede immün regülasyondaki rolünü araştırmak için; sadece endotelial CD200'ün bloke edildiği fare modeli olan 'CD200CKO' ile çalışılmış, orta serebral arterin geçici oklüzyonu ile CD200CKO farelerde kontrol grubuna kıyasla daha büyük enfarkt alanı ve daha çok nörodavranışsal bozukluk görülmüştür (48). Ancak bu çalışmada doku mikroglialarında CD200R ekspresyonunun minimal olduğu bildirilmiştir. Bu bulguların ışığında araştırmacılar, nöroinflamasyonda CD200'ün antiinflamatuvar etkilerinin mikroglia aracılı değil endotelial CD200 ile periferik CD200R+ immün hücrelerin iletişimi aracılı gerçekleştiriyor olabileceğini söylemişlerdir.

Yara iyileşmesinde endotelial dokunun myeloid hücrelerle etkileşiminin önemli rol oynadığı bilinmektedir (223,224). Cohen ve ark. (225) yaptıkları deneylerde kan-omurilik bariyeri endotel hücrelerinin normalde CD200 eksprese etmediğini, akut omurilik hasarı sonrası lezyon alanının ortasında oluşan yeni endotel hücrelerinde CD200 ekspresyonuna rastlandığını ve inflamatuvar M1 makrofajlarda daha çok olmak üzere hem M1 hem antiinflamatuvar M2 makrofajlarda artmış CD200R ekspresyonunun ortaya çıktığını saptamışlardır. Lezyonda bulunan yeni CD200+ endotel hücrelerinin CD200R+ doku mikrogliaları ve dokuya infiltre olan makrofajlarla etkileşime girerek ortamı proinflamatuvar fenotipten anti-inflamatuvar fenotipe değiştirdiği hipotezinde bulunmuşlardır. Araştırmacıların makrofajlarda LPS ile indüklenen TNF $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  sentezinde CD200 ligandının veya endotel hücrelerinin yokluğunda gözledikleri artış, CD200/CD200R etkileşiminin endotel ile makrofajlar arasında inflamasyon baskılayıcı bir iletişim kurduğunu desteklemiştir.

CD200/CD200R etkileşiminin immünoregülatör rolleri yapılan çalışmalarla bir miktar aydınlatılmış olsa da bu etkileşimin aktivasyonu sonrası devam eden yollar ve ortaya çıkan sonuçların altında yatan mekanizmalar henüz netliğe kavuşmamıştır. Endotel hücrelerinde de eksprese edilen CD200'ün endotel fonksiyonlarına etkisi ve

bu etkide TNF $\alpha$  aracılı inflamasyon ile oksidatif stresin rolü daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, CD200 ligand silinmiş farelerden elde edilen damarlarda endotel yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla değişip değişmediğini saptamak, değişmiş ise bu yanıtlarda oksidatif stres ve TNF $\alpha$ 'nın rolünün olup olmadığını belirlemek ve çok az bilinen CD200-endotel etkileşimi hakkında literatüre katkı sunmaktır.



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Tezde Kullanılan Kimyasallar**

##### **3.1.1. Hayvanlarda Anestezi Oluşturmak İçin Kullanılan Maddeler**

Ketamin (Ketasol rp-Richter Pharma, Avusturya), Ksilazin (Xylazımbio %2 50 ml, Bioveta, Çek Cumhuriyeti)

##### **3.1.2. Myografta İn Vitro Deney Ortamı Oluşturmak İçin Gerekli Krebs Solüsyonunu Hazırlamada Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Sodyum klorid (27810.295 VWR Prolabo Chemicals, Belçika), Potasyum klorid (1049361000 Emsure, Almanya), Sodyum hidrojen karbonat (9691031000 Isolab Chemicals, Almanya), Potasyum fosfat (04243 Sigma Aldrich ABD), Magnezyum sülfat (11596 Alfa Aesar, Almanya), Kalsiyum klorid dihidrat (9090261 Isolab Chemicals, Almanya), D-Glukoz (9270130500 Isolab Chemicals, Almanya)

##### **3.1.3. Torasik Aort Endotel Dokusunda Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarını Uyarmak İçin Gerekli Kimyasal Maddeler**

R-(-)-Phe hidroklorid (P6126-5G Sigma, Almanya), ACh klorid (L02168 Alfa Aesar, Almanya), SNP Dihidrat (13451-100, Sigma Aldrich, Polonya)

##### **3.1.4. Hayvanlarda Endotel Disfonksiyonunu Düzeltip Düzeltmediği Test Edilen Kimyasal Maddeler**

İnfliximab (Remsima, Celltrion Healthcare, Türkiye), SOD (MP Biomedicals, Fransa)

#### **3.2. Tezde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler**

##### **3.2.1. İzole Torasik Aort Dokusunu Asmak İçin Kullanılan Cihaz**

Diseksiyon mikroskobu (Cail Zeiss- 455043-0000 Stemi 2000-C, Almanya)

### 3.2.2. Torasik Aort Dokusunda Fonksiyonel Yanıtları Elde Etmek İçin İzole Dokuların Asıldığı Düzenek

Mulvany-Halpern Tel Myograf (Danish MyoTechnology, Danimarka)

### 3.2.3. Torasik Aort Dokusunda Elde Edilen Fonksiyonel Yanıtları Kaydetmek İçin Kullanılan Düzenek

Bilgisayar bilgi işletim sistemi MP35 BIOPAC (Commat Ltd., Ankara/Türkiye), İzometrik güç transduseri (Danish MyoTechnology, Danimarka)

## 3.3. Deneysel Model

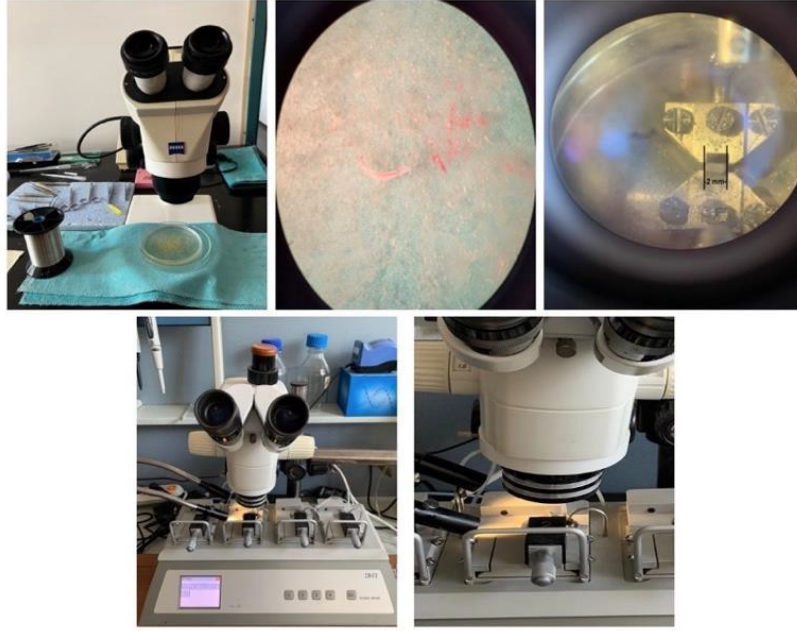
Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Komitesi'nden onay alınarak yapılmıştır (onay tarihi: 21.11.2022). Çalışmamızda yaklaşık 18-30 gr ağırlığında, 10-30 haftalık toplam 24 adet erkek/dişi fare kullanılmıştır. Kobaydan temin edilen kontrol Balb/c fareler ile Prof. Dr. Reginald Gorczynski'den Prof. Dr. Nuray Erin'e 2015 tarihinde hediye edilen ve gerekli oldukça Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen CD200 ligand silinmiş Balb/c fareler (CD200KO) kullanılmıştır. Her biri 12 adet fareden oluşan *Kontrol grubu* ve *CD200KO grubu* olmak üzere 2 ayrı deney grubu oluşturulmuştur ( $n=12$  her bir grup için). Çalışmada kullanılan İnfliximab ve SOD dozları literatüre uygun olarak seçilmiştir (226–228). Bütün deneyler boyunca kullanılan kimyasallar günlük olarak taze hazırlanmış ve distile suda çözülerek deneylere hazır hale getirilmiştir. Şekil 3.

## 3.4. İn Vitro Fonksiyonel Analizler

Çalışmamızda 12 adet kontrol, 12 adet CD200KO erkek/dişi fare kullanıldı. Kontrol ve CD200KO fareler ketamin-ksilazin anestezisi altında servikal dislokasyon metodu ile ötenazi edilerek torasik aortları çıkarılıp, etraf dokulardan dikkatle temizlendi. Elde edilen arter halkaları 2-3 mm uzunluğunda kesildikten sonra her bir

aort halkası taze Krebs solüsyonu (mM: NaCl 118, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5 ve glikoz 11.2) ile dolu 5 ml'lik myograf haznelere yerleştirildi. İn vitro fonksiyonel çalışmaları gerçekleştirmek için aort halkaları 2 adet tungsten teli (40 mm genişlikli) ile damar endoteli zedelenmeden dikkatlice asıldı ve 0.75 g optimal bir dinlenme gerginliği uygulanıp dokular pH 7.4 olacak şekilde %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlanması sağlanarak 37°C'de 60 dakika süre boyunca dinlenmeye bırakıldı. İzometrik gerilim bir bilgisayar-tabanlı veri toplama sistemine (Biopac MP35, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) bağlı bir izometrik güç transduseri (Danish MyoTechnology, Danimarka) ile deneyler boyunca ölçüldü ve kaydedildi. Dinlenme süresi içerisinde krebs solüsyonu 15 dakikada bir değiştirildi ve daha sonra deneylere başlandı.

Gevşeme çalışmaları için damar şeritleri 10 µM fenilefrin ile kasıldı. Fenilefrin ile indüklenen kasılma platoya ulaştığında, endotel bağımlı vazodilatör ajan olan asetilkolinin kümülatif şekilde artan konsantrasyonları (1 nM-10 µM) banyoya eklenerek asetilkolin konsantrasyon-gevşeme yanıtı eğrisi elde edildi. Endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını incelemek için, fenilefrin ile indüklenen kasılma platoya ulaştığında, endotelden bağımsız vazodilatör ajan olan sodyum nitroprussid'in kümülatif şekilde artan konsantrasyonları (0.1 nM-10 µM) banyoya eklenerek konsantrasyon-gevşeme yanıtı eğrisi elde edildi. Daha sonra aortik düz kas yanıtlarını değerlendirmek için artan konsantrasyonlarda (10 nM-10 µM) fenilefrin eklenerek konsantrasyon-kasılma yanıt eğrisi elde edildi. Tüm bu deneyler kontrol ve CD200KO gruplarında ayrı ayrı gerçekleştirildi.



Şekil 3. Fare torasik aortundan izole edilen damar dokusunun hazırlanışı ve izole organ banyosunun görüntüsü

Deneylerin devamında CD200KO gruptan elde edilen aort halkalarına monoklonal TNF $\alpha$  antikorunu İnfliximab 100  $\mu$ M konsantrasyonda inkübe edilerek 30 dakika boyunca beklendi ve ACh doz-yanıt protokolü tekrarlandı. Ayrıca CD200KO grupta antioksidan enzim olan SOD inkübasyonu (150 U/ml-30 dakika boyunca) gerçekleştirildi ve ACh gevşeme yanıtları yeniden kaydedildi. Gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı istatistiksel analizlerle saptandı.

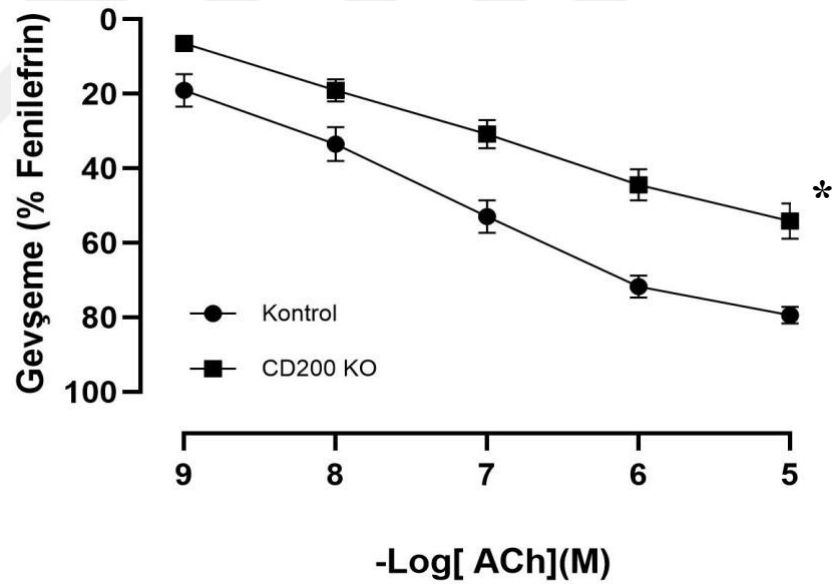
### 3.5. İstatistiksel Analizler

Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Gevşeme yanıtları (ACh ve SNP) Phe ile elde edilen kasılmaya karşı % gevşeme yanıtı olarak hesaplandı. Fenilefrin ile elde edilen kasılma verileri 80 Mm KCl yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Sonuçların istatistiksel analizi uygunluğuna göre tek yönlü ANOVA analiz yöntemi veya student t-test kullanılarak yapıldı. Elde edilen verilerde 0.05 altında bulunan p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzole Torasik Aort Dokusunda NO Aracılı Endotele Bağımlı Gevşeme Yanıtlarının CD200KO ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

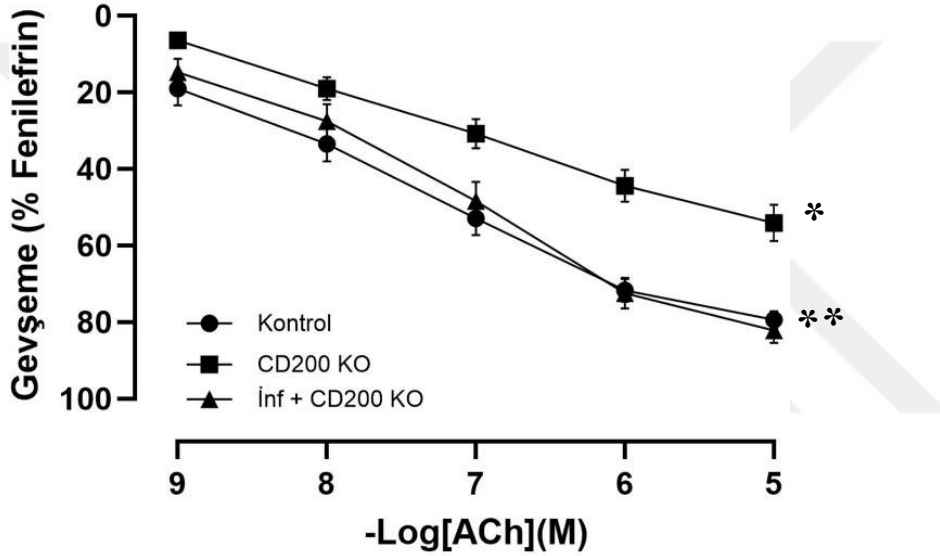
CD200 ligand silinmesinin endotele bağımlı gevşeme yanıtları üzerine etkisini değerlendirmek için torasik aort halkaları 10  $\mu$ M Phe ile kasılmış ve daha sonra ACh kümülatif şekilde artan konsantrasyonlarda (1 nM-10  $\mu$ M) eklenerek ACh konsantrasyon-gevşeme yanıtı eğrisi elde edilmiştir. CD200KO farelerin torasik aort halkalarında endotele bağımlı gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak bozulduğu görülmüştür. Şekil 4.1.



Şekil 4.1. Fare torasik aort halkalarında ACh ile indüklenen NO aracılı endotele bağımlı gevşeme yanıtları. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \*P<0.05

## 4.2. İnfliximab İnkübasyonunun İzole Torasik Aort Dokusunda NO Aracılı Endotele Bağlı Gevşeme Yanıtlarına Etkisi

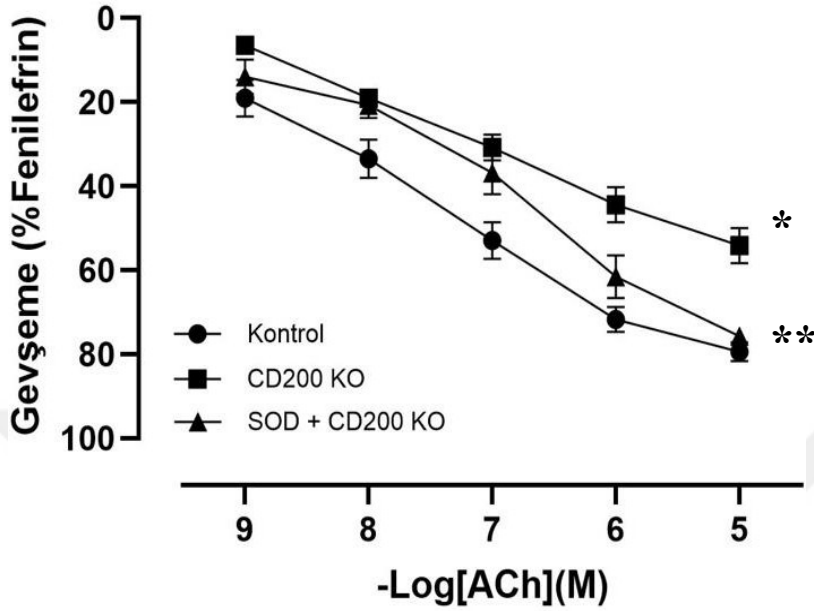
Monoklonal TNF $\alpha$  antikoru olan infliximab ile inkübasyonun CD200KO farelerde ACh ile oluşan gevşeme yanıtlarında anlamlı düzelme sağladığı görülmüştür. Şekil 4.2.



Şekil 4.2. İnfliximab inkübasyonunun CD200KO farelerin izole torasik aort halkalarında ACh ile indüklenen endotele bağlı gevşeme yanıtları üzerine etkisi. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \*P<0.05 Kontrol ve CD200KO, \*\*P<0.05 ise CD200KO ve İnf+CD200KO grupları arasındaki farkı ifade etmektedir.

## 4.3. SOD İnkübasyonunun İzole Torasik Aort Dokusunda ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi

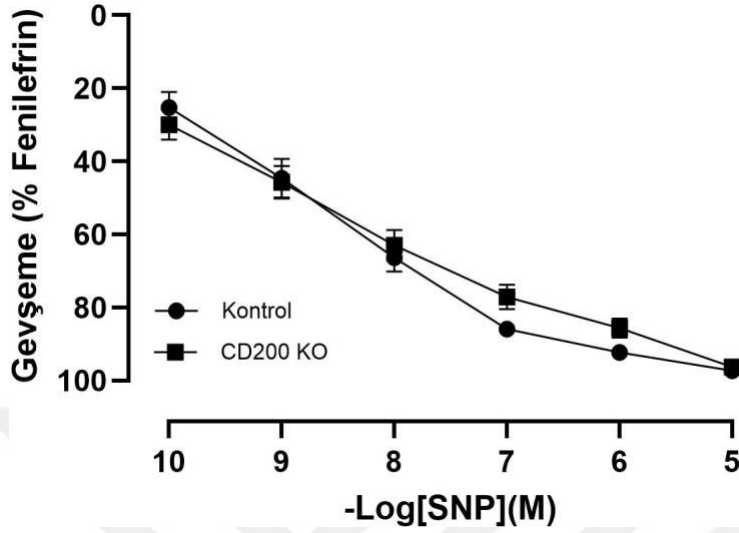
CD200KO farelerden alınan torasik aort dokusunun antioksidan bir enzim olan SOD ile 30 dakika inkübasyonunun NO aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında anlamlı düzelme sağladığı görülmüştür. Şekil 4.3.



Şekil 4.3. SOD inkübasyonunun CD200KO farelerin izole torasik aort halkalarında NO aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtları üzerine etkisi. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* $P < 0.05$  Kontrol ve CD200KO, \*\* $P < 0.05$  ise CD200KO ve SOD+CD200KO grupları arasındaki farkı ifade etmektedir.

#### 4.4. İzole Torasik Aort Dokusunda Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtlarının CD200KO ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

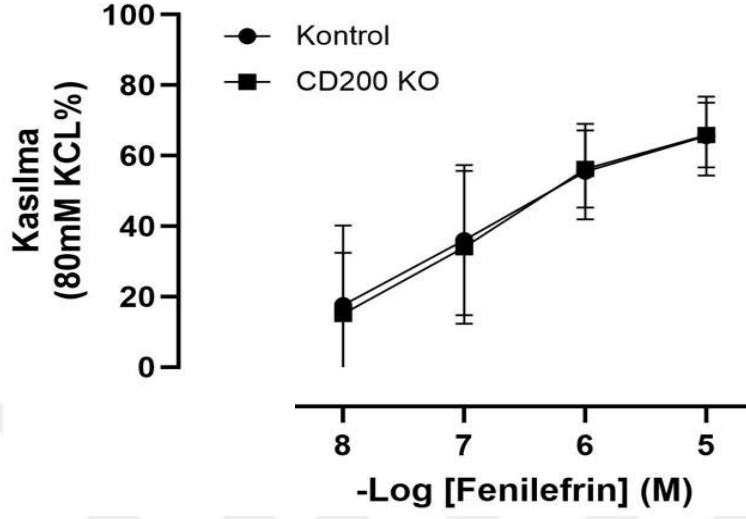
CD200 ligand silinmesinin endotelden bağımsız gevşeme yanıtları üzerine etkisini değerlendirmek için torasik aort halkaları 10  $\mu$ M Phe ile kasılmış ve daha sonra SNP konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir. SNP ile endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.4.



Şekil 4.4. Fare torasik aort halkalarında SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme yanıtları. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

#### 4.5. İzole Fare Torasik Aort Dokusunda CD200KO ve Kontrol Gruplarında Phe ile İndüklenen Kasılma Yanıtlarının Karşılaştırılması

Aortik düz kas yanıtlarını değerlendirmek için torasik aort halkalarına fenilefrin artan konsantrasyonlarda (10 nM-10  $\mu$ M) eklenerek konsantrasyon-kasılma yanıt eğrisi elde edilmiştir. CD200 ligandı silinmiş fareler ile kontrol grubu arasında fenilefrinle indüklenen kasılma yanıtlarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.5.



Şekil 4.5. Fare torasik aort halkalarında Phe ile indüklenen kasılma yanıtları. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Tez projesine konu olan bu çalışma endotel hücrelerinde eksprese edilen CD200'ün endotel fonksiyonlarına etkisini ve bu etkide TNF $\alpha$  aracılı inflamasyon ile oksidatif stresin rolünü araştıran ilk çalışmadır. Bu amaçla bu çalışmada, CD200 ligand silinmiş farelerden elde edilen damarlarda endotel fonksiyonlarının değişip değişmediği, infliximab ve SOD inkübasyonlarının bu fonksiyonları etkileyip etkilemediği değerlendirilmiştir.

CD200'ün inflamasyon ve oksidatif stres üzerine olası baskılayıcı rolleri yapılan çalışmalarda gösterilmiş olduğundan endotel fonksiyonlarına potansiyel etkilerini araştırmak için bu çalışmada öncelikle CD200 ligandının silinmesinin izole fare torasik aort dokusunda endotel bağımlı gevşeme yanıtlarına etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla fenilefrin ile kasılmış olan dokulara endotel bağımlı gevşetici bir ajan olan ACh giderek artan konsantrasyonlarda uygulanmış ve CD200KO farelerin torasik aort dokusunda endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak bozulduğu görülmüştür. Bununla birlikte ACh'e bağılı gevşeme yanıtlarında oluşan bu bozulmanın infliximab ve SOD inkübasyonları ile anlamlı olarak düzeldiği saptanmıştır.

Daha önceki çalışmalarda CD200KO farelerde çeşitli uyaranlarla TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve iNOS seviyelerinde ciddi artış gözlenmiş (16,119), CD200Fc uygulandığında NF- $\kappa$ B transkripsiyonunda azalma ile proinflamatuvar sitokinlerin salınımının inhibe olduğu görülmüştür (120). Gerçekten de farelerde postoperatif kognitif bozukluğun incelendiği bir çalışmada CD200/CD200R aktivasyonunun kognitif bozulmayı, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sitokinlerini ve mikroglial nöroinflamasyonu PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B aksı üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir (87). Bunlara ek olarak RA fare deney modelinde yapılan bir çalışmada CD200Fc uygulamasının TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  sitokinlerinde TNFRFc ile görülen inhibisyonla benzer oranda azalma sağladığı görülmüş, CD200'ün RA tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceği düşünülmüştür (129). TNF $\alpha$ 'nın eNOS ekspresyonunu inhibe ettiği ve NO biyoyaralanımını azaltarak endotel fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu da bilinmektedir (38,207,210). Bu

bilgiler beraber değerlendirildiğinde CD200'ün TNF $\alpha$ 'yı baskılayarak endotel fonksiyonlarını koruyucu etki gösterebileceği düşünülebilir ve bizim çalışmamızda CD200 ligand silinmesinin fare torasik aort dokusunda ACh bağımlı endotelial gevşemeleri bozduğu gösterilmiş, CD200 eksikliğinde görülen endotel fonksiyonlarındaki bozulmanın mekanizmasını aydınlatmak için infliximab varlığında ACh yanıtları tekrar değerlendirildiğinde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında anlamlı düzelme görülmüştür. Bu sonuç CD200'ün TNF $\alpha$ 'yı baskılayarak endotel fonksiyonlarını koruyucu etki gösterebileceğini telkin etmektedir.

Mekanizmayı aydınlatmak için ayrıca, endotelden bağımsız gevşeme yanıtları üzerine CD200'ün etkisine bakılmış, fenilefrin ile kasılan izole torasik aort dokularında endotelden bağımsız gevşetici bir ajan olan SNP ile oluşan gevşeme yanıtlarının her iki grupta da benzer olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar CD200 ligand silinmesinin izole torasik aort dokusunda temelde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını bozduğuna işaret etmiştir.

Daha önceki birçok çalışmada süperoksitlerin artışının NO biyoyaralanımını azaltarak endotel disfonksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (188,190). Ayrıca TNF $\alpha$ 'nın da NADPH oksidaz ve iNOS aracılığıyla oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir (38,209,229). Bunlara ek olarak Parkinson fare deney modelinde mikroglial kültürde CD200R blokajının p38 MAPK aktivasyonu ile NADPH oksidaz aracılı ROS üretimini arttırdığı gözlenmiştir (230). Bu bilgiler beraber değerlendirilerek CD200'ün oksidatif stresi baskılayarak endotel fonksiyonlarını koruyucu etki gösterebileceği de düşünülmüş, bu durumu değerlendirmek için SOD inkübasyonunun endotel bağımlı gevşeme yanıtlarına etkisi incelenmiştir. CD200KO farelerin izole torasik aort halkalarının 30 dakika süre ile SOD inkübasyonu ACh ile oluşan gevşeme yanıtlarında anlamlı düzelme sağlamıştır.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde CD200 ligand silinmesinin torasik aort dokusunda endotele bağlı gevşeme yanıtlarını bozduğunu ve bunun infliximab ve SOD inkübasyonlarıyla anlamlı olarak iyileştiğini göstermektedir. Bu çalışmada infliximab ve SOD kullanılarak CD200'ün literatürde belirtilen olası TNF $\alpha$  ve oksidatif stresi baskılayıcı etkileri bir kez daha gözlenmiş ve buna ek olarak bu

etkilerin endotel dokuda NO aracılı gevşeme yanıtlarının düzenlenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler fare torasik aortunda CD200 eksikliğinde inflamasyonla ilişkili endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının bozulmasının TNF $\alpha$  ve süperoksit aracılığıyla tetiklendiğini telkin etmekte ve CD200'ün antiinflamatuvar, antioksidan etkileri ile endotel disfonksiyonuna karşı koruyucu yeni bir rolüne işaret etmektedir.

Eksojen veya endojen uyaranlara yanıt olarak ortaya çıkan inflamasyon temelde hücre hasarına karşı koruyucu etkiler oluşturmakta (43), ancak kontrol edilemeyen aşırı inflamasyon doku hasarı ve kronik hastalıklara yol açmaktadır. İnflamasyonun kritik aşamalarından biri nötrofiller, monositler, lenfositler gibi inflamatuvar hücrelerin uyarının geldiği alana geçişidir. Bu hücrelerin dokuya infiltrasyonu endotele marjinyasyon, yuvarlanma ve adezyonlarını, endotel boyunca transmigrasyonlarını ve kemotaktik uyarana doğru ilerlemelerini kapsayan bir süreçtir. İnflamasyon alanına geldiklerinde aktive inflamatuvar hücrelerden pek çok enzim (proteazlar, lipazlar gibi), sitokin, NO ve ROS dahil olmak üzere çeşitli mediatörler salınmakta ve bu da oksidatif strese ve doku hasarına neden olabilmektedir. NF- $\kappa$ B proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, inflamatuvar enzimlerin, adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını düzenlemekte, aynı zamanda hücre farklılaşması, proliferasyon ve hücre ölümünde de rol almaktadır (231,232). NF- $\kappa$ B'yi uyaran stimuluslardan biri de oksidatif streştir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NF- $\kappa$ B'yi aktive ederken, antioksidanlar bu aktivasyonu baskılamaktadır (44). ROS aracılı NF- $\kappa$ B artışının TNF $\alpha$  dahil inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığı, bununla birlikte inflamatuvar sitokinlerin de NF- $\kappa$ B aracılığıyla ROS üretimini arttırdığı bilinmektedir (41,202,233). Psöriazis deney modelinde ciltte CD200 ve reseptöründe azalma ile birlikte TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 sitokinlerinde artış saptanmış, in vitro CD200 uygulaması ile makrofajlarda CD200R ekspresyonu artarken inflamatuvar sitokinlerde azalma gözlenmiştir (234). Western blot analizleri CD200'ün inflamatuvar makrofajlar üzerinde etkisini NF- $\kappa$ B sinyal yolağını inhibe ederek gösterdiğine işaret etmiştir. Ayrıca CD200KO farelerde osteoblastların osteoklastlara farklılaşmasında azalmanın NF- $\kappa$ B ve MAPK yolları aracılığıyla olduğu gözlenmiştir (235). Bununla birlikte endotel hücrelerinde CD200

ekspresyonunun LPS, TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  ile NF- $\kappa$ B, IRF-1, STAT-1 aracılığıyla indüklenbildiği de gösterilmiştir (60). Meningokok enfeksiyonu fare modelinde yine makrofajlarda CD200 indüksiyonunun NF- $\kappa$ B sinyali aracılığıyla olduğu görülmüş (236), benzer durum kemik iliği mezenkimal hücrelerinde CD200 ekspresyonunda da gözlenmiştir (237). Zıt olarak Anti-TNF $\alpha$  kullanan RA hastalarında periferik kan CD4+ T hücrelerinde CD200 ekspresyonunda artış saptanmıştır (132). Yine başka bir RA çalışmasında hastaların periferik kan mononükleer hücreleri arasında CD200 veya CD200R eksprese eden hücrelerin oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmışken; sinovyumda lokalize CD200+ hücreler kontrol grubuna göre artmış, infliximab ve metotreksat (MTX) tedavisi ile periferik kan mononükleer hücrelerinde CD200, CD200R ekspresyonlarında artış saptanmış, bu artışın hastalık klinik skorlarında iyileşme ile korele olduğu gözlenmiştir (11). Aynı çalışmada izole edilen CD4+ T hücrelerine CD200Fc uygulamasının CD4+ T hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı, apoptozlarını ise arttırdığı görülmüştür. Kontrol grubunda CD200Fc ile bu etkilerin görülüyor oluşu CD200'ün proliferasyon ve apoptoz üzerine etkilerini romatoid artritte aşırı aktive olan PI3K ve ERK yollarını Dok2 fosforilasyonu aracılı baskılamasından kaynaklanabileceğine işaret etmiştir. RA hastalarıyla yapılan daha önceki çalışmalarda gözlenen inflamatuvar sitokinler ile indüklenen CD200 ekspresyonuna zıt görünen bu durumu Chakera ve ark. (132) hastalık seyrinde daha yüksek TNF $\alpha$  seviyelerine sahip olan RA hastalarının anti-TNF $\alpha$  tedavisi alıyor olması ile ilişkilendirmiş ve CD4+ T hücrelerde CD200 ekspresyon seviyelerinin RA hastalarında anti-TNF $\alpha$  ile tedaviye uygunluk açısından bir belirteç olabileceğinden bahsetmişlerdir. Ancak, spontan abortus fare modelinde CD200 ekspresyonunun TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  ile inhibe olduğunu gösteren bir çalışmada mevcuttur (93). Ayrıca CD200-CD200R etkileşiminin klasik inflamatuvar makrofajların aktivasyon yollarından olan MAPK (p38, ERK, JNK) sinyal yollarını inhibe ettiğini (15); CD200 ekspresyonunsa ERK ile indüklendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (238). Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde CD200'ün TNF $\alpha$  dahil inflamatuvar sitokinleri baskılayıcı roller üstlendiği literatürde pek çok çalışmayla desteklenmişken (14,16,20,120), inflamatuvar sitokinlerin CD200 ekspresyonu üzerine

etkisi konusunda çelişkili sonuçlar mevcuttur (60,93). Bu çalışmada infliksimab ile CD200KO farelerde endotel fonksiyonlarında görülen düzelme literatürdeki mevcut 'CD200'ün TNF $\alpha$ 'yı baskıladığı' bilgisini destekliyor gibi gözükmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu durumun MAPK (p38, ERK, JNK) veya PI3K/Akt/NF $\kappa$ B aksının inhibisyonu üzerinden gerçekleştiği (11,15,87) gösterilmiş olsa da CD200 ve TNF $\alpha$  ilişkisinin altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için yapılacak ileri çalışmalara gereksinim vardır.

TNF $\alpha$  aynı zamanda tümör progresyonu ve büyümesinde de önemli bir sitokin olduğundan (28,239,240) endotel disfonksiyonundaki rolleri göz önünde bulundurulduğunda tümöral inflamasyonun, endotel fonksiyonlarını etkileyebileceği de düşünülmüştür. Bu konuda yapılan bir çalışmada metastatik meme kanseri modelinde metastatik olmayan gruba göre artan TNF $\alpha$ 'nın NADPH oksidaz aracılı süperoksit ile endotel fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (228). Anjiyogenezin tümör büyüme ve gelişimindeki önemi ve disfonksiyonel endotel tabakanın tümöral patolojik anjiyogenezde rol oynadığı bilinmektedir (23,241,242). Anjiyogenez var olan damarlardaki endotel hücrelerin çoğalması ve neovasküler formasyonu olarak tanımlanmakta, proangiogenik faktörler olan VEGF, FGF ile uyarılmaktadır (243,244). Anjiyogenik damarlar tümöral dokuya besin ve oksijen iletmenin dışında mitojenik büyüme faktörleri ve anti-apoptotik sinyalleri de iletmektedir (245). Ayrıca TME'de patolojik anjiyogenezin tümörü besleyen damarlarda morfolojik ve fonksiyonel bozulmalara neden olduğu da bilinmektedir (246). Vasküler geçirgenlikte artış kanser hücrelerinin ekstrasvazasyonunu ve metastazı kolaylaştırırken endotel fonksiyonlarının bozulması nedeniyle anti-tümöral immün hücrelerin ve tedavilerin tümör dokusuna erişimi de kısıtlanmaktadır. Bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde CD200 eksikliğinde görülen endotel disfonksiyonunun tümörü besleyen damarlarda anjiyogenezini destekleyerek tümör büyüme ve metastazına sebep olabileceği düşünülebilir. Bununla uyumlu olarak melanom tümör modelinde CD200RKO farelerde VEGF artışı ile anjiyogenezde artış (148), bir başka çalışmada ise (247) CD200KO farelerde kontrol grubuna göre daha şiddetli oküler neovaskülerizasyon saptanmıştır. Oksijen ilişkili retinopati deney modelinde ise CD200Fc'nin intravitreal

enjeksiyonu VEGF-A, COX-2, IL-6, monosit kemoatraktan faktör (MCP)-1, TNF $\alpha$  salınımını inhibe etmiş ve mikrogial aktivasyonu baskılamıştır (248). Zıt olarak, proliferatif diyabetik retinopatide (PDR) iskemi ve kronik inflamasyon kaynaklı VEGF aracılı neovaskülerizasyonda CD200'ün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, endotel kaynaklı CD200'ün arttığı ve bu artışın VEGF'de ve inflamatuvar sitokinlerde artışla korele olduğu görülmüştür (249). Bu durum araştırmacılar tarafından PDR'de VEGF salınımını düzenlemek için endotelial CD200 düzeylerinin arttığı, bu artışla inflamatuvar yanıtların ve anjiyogenezin baskılandığı şeklinde yorumlanmıştır.

Literatür verileri değerlendirildiğinde tümör ve CD200 konusunda birbirine zıt sonuçları olan pek çok çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir. CD200-CD200R etkileşiminin bir yandan inflamatuvar sitokinlerin sentezini ve T hücre aracılı antitümöral yanıtları baskılayarak, tümöre karşı inflamatuvar yanıtları inhibe edip protümörojenik etki gösterebileceği düşünülürken (24,25,135,153) diğer yandan uzamış kronik inflamasyon ve kronik anjiyogenez ile seyreden agresif tümörlerde tümörün sebep olduğu inflamasyonu baskılayarak progresyonu ve metastazı azaltan anti-tümörojenik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (12,146). Gerçekten de Erin ve ark. (12) agresif bir kanser modeli olan 4THM'de CD200tg farelerde tümör büyüme ve metastazında azalma, CD200RKO farelerde ise TNF $\alpha$  ve IL-6 inflamatuvar sitokinlerde artış ile tümör metastazında artış gözlemlenmiştir. Benzer hücre dizilerinde yapılan başka bir çalışmada metastatik grupta artan TNF $\alpha$ 'nın NADPH oksidaz aracılı süperoksit ile endotel fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (228). Bu verilerle birlikte değerlendirildiğinde bizim çalışmamızın sonuçları CD200KO farelerde olasılıkla inflamasyon aracılı bozulmuş olan endotel fonksiyonlarının bahsi geçen agresif tümörlerde anjiyogenez, tümör büyüme ve gelişimine sebep olabileceği hipotezini desteklemektedir.

Literatürde CD200 ekspresyonunun p53 ile indüklendiğini ve apoptotik inflamasyonu baskıladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (250). Doğal hücre döngüsünün bir sonucu olarak hücreler devamlı apoptoza uğramakta, apoptotik hücrelerden salınan antijenlerin inflamatuvar bir yanıt oluşturması ise bu hücreler tarafından aktif bir şekilde immüno-regülatör sinyallerin salınımı ile baskılanmaktadır

(251). Apoptoza uğrayan DC'lerde CD200 ekspresyonunun arttığı, CD200 geninde bulunan p53 yanıt elementleri aracılığıyla p53 ve kaspaz bağımlı yolların CD200 ekspresyonunu düzenleyebileceği, CD200'ün apoptozda immün toleransın sağlanmasında rol oynayabileceği gösterilmiştir (250). Apoptotik hücrelerde bulunan CD200'ün otoimmün hastalıkların oluşumunu önlediği düşünülmektedir. HUVEC'lerin diyabetik hastalardan alınan serum ile inkübasyonu ile yapılan bir çalışmada TNF $\alpha$  artışı ile eNOS seviyelerinde azalma ve apoptoz saptanmış, anti-TNF $\alpha$  antikoru ile bu etkiler tersine dönmüştür (252). Yüksek doz TNF $\alpha$  maruziyetinin endotel disfonksiyonuna ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aşırı TNF $\alpha$  ve ROS maruziyetinin vasküler endotel hücrelerde JNK/p38 MAPK ve kaspazlar aracılı apoptozu indüklediği de bilinmekte ve bu durum endotel fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır (253–255). Bununla uyumlu olarak bu çalışmada da CD200KO farelerin endotelinde olasılıkla oksidatif stres ve inflamasyona bağlı olarak endotelial gevşeme yanıtlarının bozulduğu gösterilmiştir. Her ne kadar bu çalışmada apoptoz değerlendirilmemiş olsa da bozulan yanıtların infliximab ve SOD ile düzelmesi CD200'ün TNF $\alpha$  ve oksidatif stresi baskılayarak endotel hücrelerini apoptozdan koruyucu fonksiyon gösterebileceğini de telkin etmektedir.

CD200 ekspresyonunun venlerin, venüllerin, arteriollerin ve kapillerin endotel hücrelerinde daha yüksek, arterlerde çoğunlukla daha düşük olduğu gözlenmiştir (8,47). Bununla birlikte endotelial CD200 ekspresyonlarının LPS, TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$  ile NF- $\kappa$ B, IRF-1 ve STAT-1 aracılı indüklenebildiği de bilinmektedir (60). Her ne kadar CD200'ün damar endotelinde ekspresyonu konusunda çelişkili sonuçlar mevcut olsa da, arteriyal CD200 ekspresyonlarının kısıtlı olduğunu gösteren çalışmaların aksine sadece endotelial CD200'ün bloke edildiği fare deney modelinde orta serebral arterin geçici oklüzyonu ile kontrol grubuna kıyasla daha büyük enfarkt alanı ve daha çok nörodavranışsal bozukluk görülmüş olması görece büyük arteriyal yapılarda da CD200 ekspresyonu olduğuna işaret etmiştir (48).

Miyokard infarktüsü ve iskemik inme dahil olmak üzere aterosklerotik vasküler hastalıklar dünyada morbidite ve mortalitenin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (256). Son 20 yılda yapılan pek çok klinik ve prelinik çalışma

aterosklerozun düşük dereceli kronik inflamasyonla seyreden bir hastalık olduğunu göstermiş (257) ve RA, psöriatik artrit, ankilozan spondilit, sistemik lupus eritematozus (SLE), inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar açısından riskin arttığı gözlenmiştir (258–260). Günümüzde hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, obezite, sigara gibi bilinen risk faktörlerine ek olarak bazı inflamatuvar biyomarkerlar da kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için risk belirteçleri olarak değerlendirilmektedir (261,262). KVH risk faktörlerinin temelinde sistemik inflamasyon ve oksidatif stres aracılığıyla NO biyoyararlanımında azalma ile vasküler geçirgenlikte artışa sebep olarak subendotelyal matrikste lipid birikimi, oksidasyonu ve agregasyonuna yol açtığı bilinmektedir (263). İnflamasyonda lökositlerden salınan TNF $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B yolağı aracılığıyla endotel hücrelerinde proinflamatuvar-protrombotik fenotipte aktivasyona neden olmakta (264,265), aktive endotelden T hücreler, monositler, makrofajlar ve diğer lökositlerin dolaşım trafiğinde görevli olan hücre yüzey proteinlerinin selektinler, ICAM, VCAM ve integrinlerin salınımı artmaktadır (265). Ayrıca subendotele geçen okside lipid partikülleri de endotelden MCP-1 salınımını arttırarak dolaşımdaki monositleri olay yerine çağırıp ateroskleroz öncüsü olan köpük hücrelerinin oluşumunu başlatmaktadır. ICAM ve VCAM ile benzer şekilde bir endotel hücre yüzey proteini olan CD200'ün de ateroskleroza zemin hazırlayan bu inflamasyon-endotel-immün hücre trafiğinde rol oynuyor olabileceği düşünülebilir. Bunu destekler şekilde CD200KO farelerde EAU deney modelinde retinada mikrogliya ve infiltre makrofajlarda artış gözlenmiş (90), aynı modelde CD200R agonistinin kullanılmasıyla retinal makrofaj aktivasyonu ve infiltrasyonu baskılanmıştır (92). CD200R bloke edilerek yapılan bir başka EAU çalışmasında benzer şekilde makrofaj aktivasyonunda artış gözlenirken dokuya infiltre makrofajlarda artış saptanmamıştır (128). Ek olarak bu çalışmada endotelial CD200 ekspresyonlarında artış olması endotel tabakanın CD200R+ hücrelerin dokuya geçişi ve dolaşım trafiğindeki olası rollerine dikkat çekmiştir. Diğer yandan daha önce yapılan çalışmalarda RA hastalarında kardiyovasküler mortalite ve morbidite de artış gözlenmiş, hastalık seyrindeki sistemik inflamasyon, endotel disfonksiyonu aracılı ateroskleroz ile ilişkilendirilmiştir (266). Anti-TNF $\alpha$  tedavisinin kardiyovasküler

olaylar açısından potansiyel faydaları konusunda çelişkili sonuçlar mevcut olsa da (267,268), bir çalışmada özellikle RA ilk 6 ayda kontrol altına alınabildiğinde kardiyovasküler sonlanımlar açısından koruyucu etkileri olabileceği gözlenmiş (269), Ljung ve ark. (270) meta-analizlerinde anti-TNF $\alpha$  tedavisine iyi klinik yanıt veren RA hastalarında akut koroner sendrom risklerinin azaldığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdaysa CD200KO farelerin torasik aortlarında bozulan endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının infliximab ile düzeldiği görülmüştür. Bu bilgiler beraber değerlendirildiğinde CD200'ün TNF $\alpha$ 'yı baskılayarak endotel fonksiyonlarını koruyucu ve dolayısıyla kardiyovasküler olaylara karşı önleyici potansiyel bir etki gösterebileceğini telkin etmekle birlikte bu konuda ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Bizim çalışmamızda fare torasik aort dokusunda endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının CD200KO grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak bozulduğu, deney düzeneğine infliximab ve SOD eklenmesiyle bu yanıtların anlamlı olarak düzeldiği gösterilmiştir. Dolayısıyla CD200KO grupta endotel fonksiyonlarının bozulmasına aracılık eden mekanizmanın bu grupta artan oksidatif stres ve inflamasyon olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte CD200'ün inflamasyon ve oksidatif stresi baskılayarak endotel fonksiyonlarını düzeltmesine aracılık eden mekanizmalar tam olarak bilinmemekte ve bu konuda yapılacak ileri araştırmalara gereksinim bulunmaktadır.

## 6. SONUÇ

Bu çalışma CD200'ün endotel fonksiyonu üzerine etkisini ve bu etkide TNF $\alpha$  ile oksidatif stresin rolünü araştıran literatürde mevcut ilk çalışmadır. NO endotel fonksiyonlarının korunmasında en önemli faktör olduğundan çeşitli KVH, kanser, otoimmün hastalıklar gibi kronik inflamasyonla seyreden patolojik koşullar altında bozulan endotel fonksiyonlarını düzeltmeye yönelik tedavi stratejilerinin önemi oldukça büyüktür. Bu çalışmanın sonuçları göz önüne alındığında CD200KO farelerde azalmış olan NO aracılı yanıtlardaki düzelmenin TNF $\alpha$  ve ROS'un baskılanması ile ilişkili olduğu ileri sürülebilmekte fakat altta yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

## 7. ÖZET

Bu çalışma; CD200 ligand silinmiş farelerden elde edilen damarlarda endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının değişip değişmediğini ve oksidatif stres ile TNF $\alpha$ 'nın bu fonksiyonları etkileyip etkilemediğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Bu amaçla çalışmada CD200KO ve kontrol grubu olmak üzere iki grup farenin torasik aort dokusunda endotel-bağımlı, endotel-bağımsız gevşeme yanıtları sırasıyla asetilkolin ve sodyum nitropurissid ile değerlendirildi. Ayrıca endotel bağımlı gevşemelerde TNF $\alpha$  ve süperoksit radikallerinin rolünü araştırmak için CD200KO grupta deneyler infliximab ve SOD varlığında tekrarlandı.

Her iki grupta endotel bağımsız gevşeme yanıtlarında anlamlı bir fark gözlenmezken, CD200 ligandı silinen farelerde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak bozulduğu saptanmıştır. Ayrıca bu grupta torasik aort dokusunda azalan gevşeme yanıtlarının infliximab ve SOD inkübasyonu ile anlamlı olarak düzeldiği görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçları göz önüne alındığında CD200KO farelerin endotel bağımlı gevşeme yanıtlarındaki bozulmanın TNF $\alpha$  ve ROS ile ilişkili olduğu ileri sürülebilmekte fakat altta yatan mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** CD200, Endotel Disfonksiyonu, İnflamasyon, Oksidatif Stres

## 8. ABSTRACT

The aim of this study is to determine whether endothelium-dependent relaxation responses are altered in CD200KO mice and to evaluate whether oxidative stress and TNF $\alpha$  affect these functions.

Endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation responses in the thoracic aortic tissue of two groups of mice were evaluated by acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively. In addition, experiments were repeated in the CD200KO group in the presence of infliximab and SOD to investigate the role of TNF $\alpha$  and superoxide radicals in endothelium-dependent relaxations.

While there was no difference in endothelium-independent relaxation responses in both groups, endothelium-dependent relaxation responses were significantly impaired in CD200KO group compared to the control group. In this group, decreased relaxation responses in thoracic aortic tissue were significantly improved with infliximab and SOD incubations.

Considering the results of this study, it can be suggested that the impairment in endothelium-dependent relaxation responses in CD200KO mice is related to the TNF $\alpha$  and ROS, but further studies are required to fully elucidate the underlying mechanism.

**Key words:** CD200, Endothelial Dysfunction, Inflammation, Oxidative Stress

## 9. KAYNAKLAR

1. BARCLAY AN, WARD HA. Purification and Chemical Characterisation of Membrane Glycoproteins from Rat Thymocytes and Brain, Recognised by Monoclonal Antibody MRC OX 2. *Eur J Biochem.* 1982;129(2):447–58.
2. Clark MJ, Gagnon' J, Williams AF, Barclay AN, Williams AF. MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. Vol. 4, *EMBO Journal.* 1985.
3. Hoek RH, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science (1979).* 2000 Dec 1;290(5497):1768–71.
4. Gorczynski RM. CD200:CD200R-Mediated Regulation of Immunity. *ISRN Immunology.* 2012 Dec 12;2012:1–18.
5. McMaster WR, Williams AF. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol.* 1979;9(6):426–33.
6. Barclay AN. Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ta, Thy-1 and MRC OX 2 antigens. Vol. 44, *Immunology.* 1981.
7. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 1;366(1):117–22.
8. Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH, et al. Lymphoid/Neuronal Cell Surface OX2 Glycoprotein Recognizes a Novel Receptor on Macrophages Implicated in the Control of Their Function). N-CAM and L1 are involved in mediating The OX2 protein (CD200) belongs to a group of leukocyte Results Production of a Monoclonal Antibody that Binds Rat Resident Peritoneal Cells and Blocks OX2 Binding In a previous study, a receptor for OX2 was identified. Vol. 13, *Immunity.* 2000.
9. Gorczynski R, Bransom J, Cattral M, Huang X, Lei J, Min W, et al. Dendritic Cells Expressing TGF/IL-10, and CHO Cells With OX-2, Increase Graft Survival. 2001.

10. Podnos A, Clark DA, Erin N, Yu K, Gorczynski RM. Further evidence for a role of tumor CD200 expression in breast cancer metastasis: Decreased metastasis in CD200R1KO mice or using CD200-silenced EMT6. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(1):117–27.
11. Ren Y, Yang B, Yin Y, Leng X, Jiang Y, Zhang L, et al. Aberrant CD200/CD200R1 expression and its potential role in Th17 cell differentiation, chemotaxis and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom).* 2014 Dec 11;54(4):712–21.
12. Erin N, Podnos A, Tanriover G, Duymuş, Cote E, Khatri I, et al. Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis, with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. *Oncogene.* 2015 Jul 21;34(29):3860–70.
13. Gorczynski RM, Cohen Z, Fu XM, Lei J. Anti-rat OX-2 blocks increased small intestinal transplant survival after portal vein immunization. *Transplant Proc.* 1999 Feb 1;31(1–2):577–8.
14. Gorczynski RM, Chen Z, Yu K, Hu J. CD200 immunoadhesin suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clinical Immunology.* 2001;101(3):328–34.
15. Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH. Molecular Mechanisms of CD200 Inhibition of Mast Cell Activation. *The Journal of Immunology.* 2004 Dec 1;173(11):6786–93.
16. Denieffe S, Kelly RJ, McDonald C, Lyons A, Lynch MA. Classical activation of microglia in CD200-deficient mice is a consequence of blood brain barrier permeability and infiltration of peripheral cells. *Brain Behav Immun.* 2013 Nov 1;34:86–97.
17. Ren Y, Ye M, Chen S, Ding J. CD200 inhibits inflammatory response by promoting KATP channel opening in microglia cells in Parkinson's disease. *Medical Science Monitor.* 2016 May 23;22:1733–41.
18. Webb M, Barclay AN. Localisation of the MRC OX-2 Glycoprotein on the Surfaces of Neurones. *J Neurochem.* 1984 Oct 12;43(4):1061–7.

19. Koning N, Swaab DF, Hoek RM, Huitinga I. Distribution of the Immune Inhibitory Molecules CD200 and CD200R in the Normal Central Nervous System and Multiple Sclerosis Lesions Suggests Neuron-Glia and Glia-Glia Interactions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Feb;68(2):159–67.
20. Liu Y, Bando Y, Vargas-Lowy D, Elyaman W, Khoury SJ, Huang T, et al. CD200R1 agonist attenuates mechanisms of chronic disease in a murine model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience*. 2010 Sep 1;30(6):2025–38.
21. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4194–7.
22. Stumpfova M, Ratner D, Desciak EB, Eliezri YD, Owens DM. The immunosuppressive surface ligand CD200 augments the metastatic capacity of squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2010 Apr 1;70(7):2962–72.
23. Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER. Stromal Endothelial Cells Directly Influence Cancer Progression. *Sci Transl Med*. 2011 Jan 19;3(66).
24. Tonks A, Hills R, White P, Rosie B, Mills KI, Burnett AK, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007 Mar 25;21(3):566–8.
25. Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, Tabrizi M, Emami AH, Alimoghaddam K, et al. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Tumor Biology*. 2013 Feb 18;34(1):531–42.
26. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor- $\alpha$  as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 2006 Apr 1;42(6):745–50.
27. Hamed EA, Zakhary MM, Maximous DW. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Jun 24;138(6):999–1009.
28. Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N. Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of

- intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6682–7.
29. GIMBRONE MA. Vascular Endothelium: Nature's Blood-Compatible Container. *Ann N Y Acad Sci.* 1987 Dec 17;516(1):5–11.
  30. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation.* 2007 Mar 13;115(10):1285–95.
  31. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov;288(5789):373–6.
  32. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1987 Dec;84(24):9265–9.
  33. Luscher TF, Barton M. Biology of the Endothelium; Biology of the Endothelium. *Clin Cardiol.* 1997;20:11–4.
  34. Potenza M, Gagliardi S, Nacci C, Carratu M, Montagnani M. Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Targets. *Curr Med Chem.* 2009 Jan 1;16(1):94–112.
  35. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther.* 2014 Dec;144(3):253–67.
  36. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X ping, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. *Clin Sci.* 2009 Feb 1;116(3):219–30.
  37. Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KAA, Newby DE. Intra-Arterial Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Impairs Endothelium-Dependent Vasodilatation and Stimulates Local Tissue Plasminogen Activator Release in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Apr;23(4):695–701.
  38. Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Endothelial Dysfunction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Circ Res.* 2006 Jul 7;99(1):69–77.

39. Ródenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1998 Mar 1;274(3):C827–30.
40. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jan;25(1):29–38.
41. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of Oxidants in NF- $\kappa$ B Activation and TNF- $\alpha$  Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin. *The Journal of Immunology*. 2000 Jul 15;165(2):1013–21.
42. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*. 2009;73(3):411–8.
43. Collins T. Acute and chronic inflammation. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia, Pa, USA: W.B. Saunders; 1999. p. 55–88.
44. Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox Regulation of NF-kappa B Activation. *Free Radic Biol Med*. 1997 Jan 1;22(6):1115–26.
45. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018 Mar 16;122(6):877–902.
46. Belkin DA, Mitsui H, Wang CQF, Gonzalez J, Zhang S, Shah KR, et al. CD200 upregulation in vascular endothelium surrounding cutaneous squamous cell carcinoma. *JAMA Dermatol*. 2013 Feb;149(2):178–86.
47. Ko YC, Chien HF, Jiang-Shieh YF, Chang CY, Pai MH, Huang JP, et al. Endothelial CD200 is heterogeneously distributed, regulated and involved in immune cell-endothelium interactions. *J Anat*. 2009;214(1):183–95.
48. Misrani A, Ngwa C, Mamun A Al, Sharmeen R, Manyam KV, Ritzel RM, et al. Brain endothelial CD200 signaling protects brain against ischemic damage. *Brain Res Bull*. 2024 Feb 1;207.
49. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Newyork: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008.

50. LIS H, SHARON N. Protein glycosylation. *Eur J Biochem.* 1993 Nov 3;218(1):1–27.
51. Gabius HJ. Biological Information Transfer Beyond the Genetic Code: The Sugar Code. *Naturwissenschaften.* 2000 Mar 20;87(3):108–21.
52. Pulsipher A, Griffin ME, Stone SE, Hsieh-Wilson LC. Long-Lived Engineering of Glycans to Direct Stem Cell Fate. *Angewandte Chemie International Edition.* 2015 Jan 26;54(5):1466–70.
53. Holoshitz J. The quest for better understanding of HLA-disease association: scenes from a road less travelled by. *Discov Med.* 2013 Sep;16(87):93–101.
54. Preston S, Wright GJ, Starr K, Barclay AN, Brown MH. The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. *Eur J Immunol.* 1997 Aug;27(8):1911–8.
55. Williams AF, Barclay AN. The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Annu Rev Immunol.* 1988 Apr;6(1):381–405.
56. Wong KK, Brenneman F, Chesney A, Spaner DE, Gorczynski RM. Soluble CD200 Is Critical to Engraft Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Immunocompromised Mice. *Cancer Res.* 2012 Oct 1;72(19):4931–43.
57. McCaughan GW, Clarks MJ, Hurst J, Grosveld F, Barclay AN. The gene for MRC OX-2 membrane glycoprotein is localized on human chromosome 3. *Immunogenetics.* 1987 Feb;25(2):133–5.
58. Walker DG, Lue LF. Understanding the Neurobiology of Cd200 and the Cd200 Receptor: A Therapeutic Target For Controlling Inflammation In Human Brains? *Future Neurol.* 2013 May 31;8(3):321–32.
59. Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Cloning and characterization of the human CD200 promoter region. *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(6):579–87.
60. Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Immunol.* 2009 Jun;46(10):1951–63.

61. Halaby DM, Mornon JPE. The immunoglobulin superfamily: An insight on its tissular, species, and functional diversity. *J Mol Evol.* 1998 Apr;46(4):389–400.
62. Qian J, Hashimoto T, Fujiwara H, Hamaoka T. Studies on the induction of tolerance to alloantigens. I. The abrogation of potentials for delayed-type-hypersensitivity response to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol.* 1985 Jun;134(6):3656–61.
63. Gorczynski RM. Immunosuppression induced by hepatic portal venous immunization spares reactivity in IL-4 producing T lymphocytes. *Immunol Lett.* 1992 Jun;33(1):67–77.
64. GORCZYNSKI RM, CHUNG S, HOANG Y, SULLIVAN B, CHEN Z. Altered patterns of migration of cytokine-producing T lymphocytes in skin-grafted naive or immune mice following *in vivo* administration of anti-VCAM-1 or -ICAM-1. *Immunology.* 1996 Apr 30;87(4):573–80.
65. Gorczynski RM, Cattral MS, Chen Z, Hu J, Lei J, Min WP, et al. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1654–60.
66. Gorczynski RM, Chen Z, He W, Khatri I, Sun Y, Yu K, et al. Expression of a CD200 Transgene Is Necessary for Induction but Not Maintenance of Tolerance to Cardiac and Skin Allografts. *The Journal of Immunology.* 2009 Aug 1;183(3):1560–8.
67. Gorczynski RM, Chen Z, Fu XM, Zeng H. Increased Expression of The Novel Molecule OX-2 Is Involved In Prolongation Of Murine Renal Allograft Survival1. *Transplantation.* 1998 Apr;65(8):1106–14.
68. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996 Nov 26;93(24):13967–72.

69. Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, et al. On the Role of Dendritic Cells in Peripheral T Cell Tolerance and Modulation of Autoimmunity. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):217–27.
70. Belz GT, Heath WR, Carbone FR. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol*. 2002 Oct;80(5):463–8.
71. Yu K, Chen Z, Gorczynski R. Effect of CD200 and CD200R1 expression within tissue grafts on increased graft survival in allogeneic recipients. *Immunol Lett*. 2013 Jan;149(1–2):1–8.
72. Borriello F, Tizard R, Rue E, Reeves R. Characterization and localization of Mox2, the gene encoding the murine homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Mammalian Genome*. 1998 Feb;9(2):114–8.
73. Gorczynski L, Chen Z, Hu J, Kai Y, Lei J, Ramakrishna V, et al. Evidence that an OX-2-positive cell can inhibit the stimulation of type 1 cytokine production by bone marrow-derived B7-1 (and B7-2)-positive dendritic cells. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):774–81.
74. Brown E. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*. 2001 Mar 1;11(3):130–5.
75. Özkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O’Keefe T, et al. Programmed Death-1 Targeting Can Promote Allograft Survival. *The Journal of Immunology*. 2002 Dec 1;169(11):6546–53.
76. Ariyan C, Salvalaggio P, Fecteau S, Deng S, Rogozinski L, Mandelbrot D, et al. Cutting Edge: Transplantation Tolerance through Enhanced CTLA-4 Expression. *The Journal of Immunology*. 2003 Dec 1;171(11):5673–7.
77. Gorczynski RM, Chen Z, Hu J, Kai Y, Lei J. Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. Vol. 126, *Clin Exp Immunol*. 2001.
78. McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a

- tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Jan 24;103(4):1041–6.
79. Takeuchi T, Ueki T, Sasaki Y, Kajiwara T, Li B, Moriyama N, et al. Th2-like response and antitumor effect of anti-interleukin-4 mAb in mice bearing renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 1997 Feb 1;43(6):375–81.
  80. Filella X, Alcover J, Zarco MA, Beardo P, Molina R, Ballesta AM. Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate*. 2000 Sep 1;44(4):271–4.
  81. Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocák I, Vagundová M, Zaloudík J, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma*. 2002;49(3):159–66.
  82. Gorczynski RM, Yu K, Clark D. Receptor Engagement on Cells Expressing a Ligand for the Tolerance-Inducing Molecule OX2 Induces an Immunoregulatory Population That Inhibits Alloreactivity In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2000 Nov 1;165(9):4854–60.
  83. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, et al. Characterization of the CD200 Receptor Family in Mice and Humans and Their Interactions with CD200. *The Journal of Immunology*. 2003 Sep 15;171(6):3034–46.
  84. Rijkers ESK, de Ruiter T, Baridi A, Veninga H, Hoek RM, Meyaard L. The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol Immunol*. 2008 Feb;45(4):1126–35.
  85. Hatherley D, Barclay AN. The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains. *Eur J Immunol*. 2004 Jun;34(6):1688–94.
  86. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Takahashi H, Imai Y, et al. Expression of CD200 by macrophage-like cells in ischemic core of rat brain

- after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett*. 2007 May;418(1):44–8.
87. Qian H, Gao F, Wu X, Lin D, Huang Y, Chen A, et al. Activation of the CD200/CD200R1 axis attenuates neuroinflammation and improves postoperative cognitive dysfunction via the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway in aged mice. *Inflammation Research*. 2023 Dec 1;72(12):2127–44.
  88. Wang XJ, Ye M, Zhang YH, Chen SD. CD200–CD200R Regulation of Microglia Activation in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2007 Aug 3;2(3):259–64.
  89. Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF. Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer’s disease: A potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol*. 2009 Jan;215(1):5– 19.
  90. Broderick C, Hoek RM, Forrester J V, Liversidge J, Sedgwick JD, Dick AD. Constitutive Retinal CD200 Expression Regulates Resident Microglia and Activation State of Inflammatory Cells during Experimental Autoimmune Uveoretinitis.
  91. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD. Regulation of Myeloid Cell Function through the CD200 Receptor. *The Journal of Immunology*. 2006 Jan 1;176(1):191–9.
  92. Copland DA, Calder CJ, Raveney BJE, Nicholson LB, Phillips J, Cherwinski H, et al. Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis. *American Journal of Pathology*. 2007;171(2):580–8.
  93. Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. Vol. 7, *Molecular Human Reproduction*. 2001.
  94. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):769–80.

95. Gordon S. Pattern Recognition Receptors. *Cell*. 2002 Dec;111(7):927–30.
96. Healy JI, Goodnow CC. POSITIVE VERSUS NEGATIVE SIGNALING BY LYMPHOCYTE ANTIGEN RECEPTORS. *Annu Rev Immunol*. 1998 Apr;16(1):645–70.
97. Long EO. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES THROUGH INHIBITORY RECEPTORS. *Annu Rev Immunol*. 1999 Apr;17(1):875–904.
98. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan 1;3(1):23–35.
99. Ravetch J V., Lanier LL. Immune Inhibitory Receptors. *Science* (1979). 2000 Oct 6;290(5489):84–9.
100. Pritchard NR, Smith KGC. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology*. 2003 Mar 25;108(3):263–73.
101. Katz HR. Inhibitory receptors and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):698–704.
102. Koning N, Van Eijk M, Pouwels W, Brouwer MSM, Voehringer D, Huitinga I, et al. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J Innate Immun*. 2010 Feb;2(2):195–200.
103. Daëron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev*. 2008 Aug 4;224(1):11–43.
104. Zhang S, Phillips JH. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol*. 2005 Dec 5;79(2):363–8.
105. Yamanashi Y, Tamura T, Kanamori T, Yamane H, Nariuchi H, Yamamoto T, et al. Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev*. 2000 Jan 1;14(1):11–6.
106. Gugasyan R, Quilici C, I STT, Grail D, Verhagen AM, Roberts A, et al. Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-

- activating protein and Nck docking sites. *J Cell Biol.* 2002 Jul 8;158(1):115–25.
107. Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M, et al. NF- $\kappa$ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Mar 4;9(1):53.
  108. Holmannová D, Koláčková M, Kondělková K, Kuneš P, Krejsek J, Andrýs C. CD200/CD200R PAIRED POTEnT InHIBITORY MOIECulEs REgulATIng IMMunE AnD InflAMMATORY REsPOnsEs; PART I: cd200/cd200r StrUctUre, activation, aNd FUNctioN.
  109. Mahrshahi R, Barclay AN, Brown MH. Essential Roles for Dok2 and RasGAP in CD200 Receptor-Mediated Regulation of Human Myeloid Cells. *The Journal of Immunology.* 2009 Oct 15;183(8):4879–86.
  110. Mahrshahi R, Brown MH. Downstream of Tyrosine Kinase 1 and 2 Play Opposing Roles in CD200 Receptor Signaling. *The Journal of Immunology.* 2010 Dec 15;185(12):7216–22.
  111. Lyons A, Downer EJ, Costello DA, Murphy N, Lynch MA. Dok2 mediates the CD200Fc attenuation of A $\beta$ -induced changes in glia. *J Neuroinflammation.* 2012 Dec 29;9(1):720.
  112. Abramson J, Rozenblum G, Pecht I. Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fc $\epsilon$  receptor. *Eur J Immunol.* 2003 Jan 13;33(1):85–91.
  113. Gorczynski R, Chen Z, Kai Y, Lee L, Wong S, Marsden PA. CD200 Is a Ligand for All Members of the CD200R Family of Immunoregulatory Molecules. *The Journal of Immunology.* 2004 Jun 15;172(12):7744–9.
  114. Hatherley D, Cherwinski HM, Moshref M, Barclay AN. Recombinant CD200 Protein Does Not Bind Activating Proteins Closely Related to CD200 Receptor. *The Journal of Immunology.* 2005 Aug 15;175(4):2469–74.
  115. MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677–86.

116. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958–69.
117. Lyons A, McQuillan K, Deighan BF, O'Reilly JA, Downer EJ, Murphy AC, et al. Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2009 Oct;23(7):1020–7.
118. Varnum MM, Kiyota T, Ingraham KL, Ikezu S, Ikezu T. The anti-inflammatory glycoprotein, CD200, restores neurogenesis and enhances amyloid phagocytosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015 Nov;36(11):2995–3007.
119. Costello DA, Lyons A, Denieffe S, Browne TC, Cox FF, Lynch MA. Long Term Potentiation Is Impaired in Membrane Glycoprotein CD200-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Oct;286(40):34722–32.
120. Jiang L, Xu F, He W, Chen L, Zhong H, Wu Y, et al. CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. *Inflammation Research*. 2016 Jul 8;65(7):521–32.
121. Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging*. 2006 May;27(5):717–22.
122. Lyons A, Downer EJ, Crotty S, Nolan YM, Mills KHG, Lynch MA. CD200 Ligand–Receptor Interaction Modulates Microglial Activation *In Vivo* and *In Vitro* : A Role for IL-4. *The Journal of Neuroscience*. 2007 Aug 1;27(31):8309–13.
123. Zhang S, Wang XJ, Tian LP, Pan J, Lu GQ, Zhang YJ, et al. CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 6;8(1):154.

124. Koning N, Bö L, Hoek RM, Huitinga I. Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 2007 Nov 19;62(5):504–14.
125. Valente T, Serratos J, Perpiñá U, Saura J, Solà C. Alterations in CD200-CD200R1 System during EAE Already Manifest at Presymptomatic Stages. *Front Cell Neurosci*. 2017 May 4;11.
126. Dick AD, Broderick C, Forrester J V, Wright GJ. Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jan;42(1):170–6.
127. Robertson MJ, Erwig LP, Liversidge J, Forrester J V, Rees AJ, Dick AD. Retinal microenvironment controls resident and infiltrating macrophage function during uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jul;43(7):2250–7.
128. Banerjee D, Dick AD. Blocking CD200-CD200 receptor axis augments NOS-2 expression and aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. *Ocul Immunol Inflamm*. 2004 Jun;12(2):115–25.
129. Šimelyte E, Criado G, Essex D, Uger RA, Feldmann M, Williams RO. CD200-FC, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Apr 27;58(4):1038–43.
130. Šimelyte E, Alzabin S, Boudakov I, Williams R. CD200R1 regulates the severity of arthritis but has minimal impact on the adaptive immune response. *Clin Exp Immunol*. 2010 Sep 9;162(1):163–8.
131. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clinical Immunology*. 2009 Sep;132(3):295–304.
132. Chakera A, Bennett SC, Morteau O, Bowness P, Luqmani RA, Cornall RJ. The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.

133. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, et al. CD200 Expression on Tumor Cells Suppresses Antitumor Immunity: New Approaches to Cancer Immunotherapy. *The Journal of Immunology*. 2007 May 1;178(9):5595–605.
134. Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, Wendtner CM. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk Res*. 2009 Mar;33(3):460–4.
135. Coles SJ, Wang ECY, Man S, Hills RK, Burnett AK, Tonks A, et al. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 May 28;25(5):792–9.
136. Miao Y, Fan L, Wu YJ, Xia Y, Qiao C, Wang Y, et al. Low expression of CD200 predicts shorter time-to-treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):13551–62.
137. Bisgin A, Meng WJ, Adell G, Sun XF. Interaction of CD200 Overexpression on Tumor Cells with CD200R1 Overexpression on Stromal Cells: An Escape from the Host Immune Response in Rectal Cancer Patients. *J Oncol*. 2019 Jan 21;2019:1–7.
138. Curry A, Khatri I, Kos O, Zhu F, Gorczynski R. Importance of CD200 expression by tumor or host cells to regulation of immunotherapy in a mouse breast cancer model. *PLoS One*. 2017 Feb 24;12(2):e0171586.
139. Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Dec;364(4):778–82.
140. Yoshimura K, Suzuki Y, Inoue Y, Tsuchiya K, Karayama M, Iwashita Y, et al. CD200 and CD200R1 are differentially expressed and have differential prognostic roles in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2020 Jan 7;9(1).
141. Siva A, Xin H, Qin F, Oltean D, Bowdish KS, Kretz-Rommel A. Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the

- immunosuppressive molecule CD200. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008 Jul 1;57(7):987–96.
142. Jung YS, Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, et al. CD200: Association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015 Mar;37(3):327–35.
  143. Wedig J, Jasani S, Mukherjee D, Lathrop H, Matreja P, Pfau T, et al. CD200 is overexpressed in the pancreatic tumor microenvironment and predictive of overall survival. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2024 Apr 15;73(6):96.
  144. Rexin P, Tauchert A, Hänze J, Heers H, Schmidt A, Hofmann R, et al. The Immune Checkpoint Molecule CD200 Is Associated with Tumor Grading and Metastasis in Bladder Cancer. *Anticancer Res*. 2018 May;38(5):2749–54.
  145. Colmont CS, BenKetah A, Reed SH, Hawk N V., Telford WG, Ohyama M, et al. CD200-expressing human basal cell carcinoma cells initiate tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Jan 22;110(4):1434–9.
  146. Talebian F, Liu JQ, Liu Z, Khattabi M, He Y, Ganju R, et al. Melanoma cell expression of CD200 inhibits tumor formation and lung metastasis via inhibition of myeloid cell functions. *PLoS One*. 2012 Feb 3;7(2).
  147. Wang L, Liu J, Talebian F, El-Omrani HY, Khattabi M, Yu L, et al. Tumor expression of CD200 inhibits IL-10 production by tumor-associated myeloid cells and prevents tumor immune evasion of CTL therapy. *Eur J Immunol*. 2010 Sep 26;40(9):2569–79.
  148. Liu JQ, Talebian F, Wu L, Liu Z, Li MS, Wu L, et al. A Critical Role for CD200R Signaling in Limiting the Growth and Metastasis of CD200+ Melanoma. *J Immunol*. 2016 Aug 15;197(4):1489–97.
  149. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):618–31.
  150. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162–74.

151. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):39–51.
152. Wong KK, Khatri I, Shaha S, Spaner DE, Gorczynski RM. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2010 May 4;88(2):361–72.
153. Coles SJ, Hills RK, Wang ECY, Burnett AK, Man S, Darley RL, et al. Expression of CD200 on AML blasts directly suppresses memory T-cell function. *Leukemia*. 2012 Sep 20;26(9):2148–51.
154. Rastogi N, Baker S, Man S, Uger RA, Wong M, Coles SJ, et al. Use of an anti-CD200-blocking antibody improves immune responses to AML *in vitro* and *in vivo*. *Br J Haematol*. 2021 Apr 30;193(1):155–9.
155. Diamanti P, Cox C V, Ede BC, Uger RA, Moppett JP, Blair A. Targeting pediatric leukemia-propagating cells with anti-CD200 antibody therapy. *Blood Adv*. 2021 Sep 28;5(18):3694–708.
156. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, et al. Diagnostic Usefulness and Prognostic Impact of CD200 Expression in Lymphoid Malignancies and Plasma Cell Myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2012 Jan 1;137(1):93–100.
157. Choueiry F, Torok M, Shakya R, Agrawal K, Deems A, Benner B, et al. CD200 promotes immunosuppression in the pancreatic tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*. 2020 Jun;8(1):e000189.
158. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162–74.
159. Mundy-Bosse BL, Lesinski GB, Jaime-Ramirez AC, Benninger K, Khan M, Kuppusamy P, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cell Inhibition of the IFN Response in Tumor-Bearing Mice. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5101–10.
160. Morgan HJ, Rees E, Lanfredini S, Powell KA, Gore J, Gibbs A, et al. CD200 ectodomain shedding into the tumor microenvironment leads to NK cell dysfunction and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2022 Nov 1;132(21).

161. Mahadevan D, Lanasa MC, Farber C, Pandey M, Whelden M, Faas SJ, et al. Phase I study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: Blockade of the immune checkpoint CD200. *J Immunother Cancer*. 2019 Aug 23;7(1).
162. Shao A, Owens DM. The immunoregulatory protein CD200 as a potentially lucrative yet elusive target for cancer therapy. *Oncotarget*. 2023 Feb 4;14:96–103.
163. Chen Z, Kapus A, Khatri I, Kos O, Zhu F, Gorczynski RM. Cell membrane-bound CD200 signals both via an extracellular domain and following nuclear translocation of a cytoplasmic fragment. *Leuk Res*. 2018 Jun;69:72–80.
164. Twito T, Chen Z, Khatri I, Wong K, Spaner D, Gorczynski R. Ectodomain shedding of CD200 from the B-CLL cell surface is regulated by ADAM28 expression. *Leuk Res*. 2013 Jul;37(7):816–21.
165. Morgan HJ, Rees E, Lanfredini S, Powell KA, Gore J, Gibbs A, et al. CD200 ectodomain shedding into the tumor microenvironment leads to NK cell dysfunction and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2022 Nov 1;132(21).
166. Wong KK, Zhu F, Khatri I, Huo Q, Spaner DE, Gorczynski RM. Characterization of CD200 Ectodomain Shedding. *PLoS One*. 2016 Apr 25;11(4):e0152073.
167. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436–44.
168. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005 Mar;7(3):211–7.
169. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell*. 2006 Jan;124(2):263–6.
170. Gorczynski RM, Chen Z, Diao J, Khatri I, Wong K, Yu K, et al. Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Sep 2;123(2):405–15.

171. Gorczynski RM, Clark DA, Erin N, Khatri I. Role of CD200 expression in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov 17;130(1):49–60.
172. Mierke CT. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *Journal of Biophysics.* 2008 Mar 5;2008:1–13.
173. Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:171–89.
174. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3527–61.
175. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006 Apr 4;113(13):1708–14.
176. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109–42.
177. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, et al. Reciprocal Phosphorylation and Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase in Response to Bradykinin Stimulation. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 May;276(19):16587–91.
178. Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R, et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. *Nitric Oxide.* 2010 May;22(4):304–15.
179. Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid Redox Signal.* 2015 May 10;22(14):1230–42.
180. Umans JG, Levi R. Nitric Oxide in the Regulation of Blood Flow and Arterial Pressure. *Annu Rev Physiol.* 1995 Oct;57(1):771–90.
181. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999 Jan 14;340(2):115–26.

182. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial Function. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):363–8.
183. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid Arthritis A Model of Systemic Inflammation Driving Atherosclerosis. *Circulation Journal*. 2009;73(6):977–85.
184. Gabriel SE. Cardiovascular Morbidity and Mortality in Rheumatoid Arthritis. *Am J Med*. 2008 Oct;121(10):S9–14.
185. Yim KM, Armstrong AW. Updates on cardiovascular comorbidities associated with psoriatic diseases: epidemiology and mechanisms. *Rheumatol Int*. 2017 Jan 24;37(1):97–105.
186. Anyfanti P, Margouta A, Goulas K, Gavriilaki M, Lazaridou E, Patsatsi A, et al. Endothelial Dysfunction in Psoriasis: An Updated Review. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:864185.
187. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Jan;39(1):44–84.
188. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840–4.
189. Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Apr;175(8):1279–92.
190. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing Effects of Reactive Oxygen Species and Cholesterol on Endothelial Nitric Oxide Synthase and Endothelial Cell Caveolae. *Circ Res*. 1999 Jul 9;85(1):29–37.
191. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Jun;278(25):22546–54.
192. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996 Nov 1;271(5):C1424–37.

193. Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL, Sjöqvist PO. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res.* 1992 Feb;70(2):264–71.
194. OZAWA Y, HAYASHI K, KANDA T, HOMMA K, TAKAMATSU I, TATEMATSU S, et al. Impaired nitric oxide- and endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation of renal afferent arteriole in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology.* 2004 Oct 22;9(5):272–7.
195. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox Regulation of NF- $\kappa$ B Activation: Distinct Redox Regulation Between the Cytoplasm and the Nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Mar;7(3–4):395–403.
196. Lingappan K. NF- $\kappa$ B in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Feb;7:81–6.
197. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.
198. Matthews N, Watkins JF. Tumour-necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. *Br J Cancer.* 1978 Aug;38(2):302–9.
199. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012 Jan 19;119(3):651–65.
200. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol.* 2015 Jan;27(1):55–62.
201. Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Sep 29;15(9):555–67.
202. Zhong L, You J, Sun Q. [The role of NF-kappa B in the TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1999 Nov;79(11):863–6.
203. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017 Jul 14;2(1):17023.

204. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today*. 1997 Oct;18(10):487–92.
205. Muth KN, Rech J, Losch FO, Hoerning A. Reversing the Inflammatory Process—25 Years of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitors. *J Clin Med*. 2023 Jul 31;12(15):5039.
206. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jun 1;10(6):453–71.
207. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*. 1993 Jul;73(1):205–9.
208. Huang Y, Yan L, Rong S, Haller H, Kirch T. TNF- $\alpha$  induces endothelial dysfunction via PKC- $\zeta$ -dependent NADPH oxidase activation. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2012 Oct 18;32(5):642–7.
209. Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Endothelial Dysfunction in Lepr<sup>db</sup> Mice. *Circulation*. 2007 Jan 16;115(2):245–54.
210. Seidel M, Billert H, Kurpisz M. Regulation of eNOS expression in HCAEC cell line treated with opioids and proinflammatory cytokines. *Kardiol Pol*. 2006 Feb;64(2):153–8; discussion 159-60.
211. Macnaul KL, Hutchinson NI. Differential Expression of iNOS and cNOS mRNA in Human Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells under Normal and Inflammatory Conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Nov;196(3):1330–4.
212. Hürlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Treatment Improves Endothelial Function in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Circulation*. 2002 Oct 22;106(17):2184–7.
213. CARDILLO C, SCHINZARI F, MORES N, METTIMANO M, MELINA D, ZOLI A, et al. Intravascular tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade reverses

- endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Sep;80(3):275–81.
214. Booth AD, Jayne DRW, Kharbanda RK, McEniery CM, Mackenzie IS, Brown J, et al. Infliximab Improves Endothelial Dysfunction in Systemic Vasculitis. *Circulation.* 2004 Apr 13;109(14):1718–23.
215. Schinzari F, Armuzzi A, De Pascalis B, Mores N, Tesaro M, Melina D, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Antagonism Improves Endothelial Dysfunction in Patients With Crohn's Disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Jan 16;83(1):70–6.
216. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res.* 2007 Feb 2;100(2):158–73.
217. Minami T, Aird WC. Endothelial Cell Gene Regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2005 Jul;15(5):174.e1-174.e24.
218. Andersson M, Karlsson L, Svensson PA, Ulfhammer E, Ekman M, Jernås M, et al. Differential Global Gene Expression Response Patterns of Human Endothelium Exposed to Shear Stress and Intraluminal Pressure. *J Vasc Res.* 2005;42(5):441–52.
219. Choe D, Choi D. Cancel cancer: The immunotherapeutic potential of CD200/CD200R blockade. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
220. Zhao X, Li J, Sun H. CD200-CD200R Interaction: An Important Regulator After Stroke. *Front Neurosci.* 2019;13:840.
221. Ritzel RM, Al Mamun A, Crapser J, Verma R, Patel AR, Knight BE, et al. CD200-CD200R1 inhibitory signaling prevents spontaneous bacterial infection and promotes resolution of neuroinflammation and recovery after stroke. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 18;16(1):40.
222. Al Mamun A, Ngwa C, Qi S, Honarpisheh P, Datar S, Sharmeen R, et al. Neuronal CD200 Signaling Is Protective in the Acute Phase of Ischemic Stroke. *Stroke.* 2021 Oct;52(10):3362–73.
223. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005 Nov;15(11):599–607.

224. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):753–62.
225. Cohen M, Ben-Yehuda H, Porat Z, Raposo C, Gordon S, Schwartz M. Newly formed endothelial cells regulate myeloid cell activity following spinal cord injury via expression of CD200 ligand. *Journal of Neuroscience*. 2017 Jan 25;37(4):972–85.
226. Adachi T, Toishi T, Takashima E, Hara H. Infliximab Neutralizes the Suppressive Effect of TNF- $\alpha$ ; on Expression of Extracellular-Superoxide Dismutase &lt;i>in Vitro&lt;/i>; *Biol Pharm Bull*. 2006;29(10):2095–8.
227. Virdis A, Santini F, Colucci R, Duranti E, Salvetti G, Rugani I, et al. Vascular Generation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Reduces Nitric Oxide Availability in Small Arteries From Visceral Fat of Obese Patients. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jul;58(3):238–47.
228. Dalaklioglu S, Tasatargil A, Kale S, Tanriover G, Dilmac S, Erin N. Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- $\alpha$  and NADPH oxidase. *Vascul Pharmacol*. 2013 Sep;59(3–4):103–11.
229. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther*. 2010 Sep;127(3):295–314.
230. Wang XJ, Zhang S, Yan ZQ, Zhao YX, Zhou HY, Wang Y, et al. Impaired CD200–CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: Roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*. 2011 May;50(9):1094–106.
231. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- $\kappa$ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*. 1997 Apr 10;336(15):1066–71.

232. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12(1):86.
233. Brasier AR, Recinos A, Eledrisi MS. Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Aug;22(8):1257–66.
234. Li D, Wang Y, Tang L, Jin X, Xia C, Xu H, et al. CD200-CD200R1 signalling attenuates imiquimod-induced psoriatic inflammation by inhibiting the activation of skin inflammatory macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jan 1;78.
235. Cui W, Cuartas E, Ke J, Zhang Q, Einarsson HB, Sedgwick JD, et al. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Sep 4;104(36):14436–41.
236. Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC, Williams KJ, Varin A, Makepeace K, et al. Immune Inhibitory Ligand CD200 Induction by TLRs and NLRs Limits Macrophage Activation to Protect the Host from Meningococcal Septicemia. *Cell Host Microbe*. 2010 Sep;8(3):236–47.
237. Pontikoglou C, Langonné A, Ba MA, Varin A, Rosset P, Charbord P, et al. CD200 expression in human cultured bone marrow mesenchymal stem cells is induced by pro-osteogenic and pro-inflammatory cues. *J Cell Mol Med*. 2016 Apr 16;20(4):655–65.
238. Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D, Groben P, McKinnon K, Buehler C, et al. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2007 Nov 15;
239. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*. 2008 Nov;29(11):1275–88.
240. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jul 12;6(1):263.

241. Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol.* 2019 Dec 12;9.
242. Jeong JH, Ojha U, Lee YM. Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. *Arch Pharm Res.* 2021 Jan 23;44(1):1–15.
243. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 2013 Dec 22;13(12):871–82.
244. Katoh M. Therapeutics Targeting FGF Signaling Network in Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Dec;37(12):1081–96.
245. Welch DR, Hurst DR. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* 2019 Jun 15;79(12):3011–27.
246. Azzi S, Hebda JK, Gavard J. Vascular Permeability and Drug Delivery in Cancers. *Front Oncol.* 2013;3.
247. Horie S, Robbie SJ, Liu J, Wu WK, Ali RR, Bainbridge JW, et al. CD200R signaling inhibits pro-angiogenic gene expression by macrophages and suppresses choroidal neovascularization. *Sci Rep.* 2013 Oct 30;3(1):3072.
248. Hu Y, Wei T, Gao S, Cheng Q. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of CD200–CD200R1 axis in oxygen-induced retinopathy mice model. *Inflammation Research.* 2019 Nov 23;68(11):945–55.
249. Hu Y, Xie A, Cheng Q. Upregulated CD200 in pre-retinal proliferative fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy patients and its correlation with vascular endothelial growth factor. *Inflammation Research.* 2019 Dec 14;68(12):1071–9.
250. Rosenblum MD, Woodliff JE, Johnson BD, Konkol MC, Gerber KA, Orentas RJ, et al. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. 2004; Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)
251. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239–57.

252. Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S, Watanabe R, Abe N. High serum TNF- $\alpha$  level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications*. 2005 Nov;19(6):347–55.
253. Grethe S, Ares MPS, Andersson T, Pörn-Ares MI. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-xL. *Exp Cell Res*. 2004 Aug;298(2):632–42.
254. WINN RK, HARLAN JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005 Aug;3(8):1815–24.
255. Sun L, Yau HY, Wong WY, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H(2)O(2)-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e43186.
256. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11).
257. Libby P, Hansson GK. From Focal Lipid Storage to Systemic Inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Sep;74(12):1594–607.
258. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJL, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):17–28.
259. Aniwaniwan S, Pardi DS, Tremaine WJ, Loftus E V. Increased Risk of Acute Myocardial Infarction and Heart Failure in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018 Oct;16(10):1607-1615.e1.
260. Tektonidou MG, Kravvariti E, Konstantonis G, Tentolouris N, Sfikakis PP, Protogerou A. Subclinical atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus:

- Comparable risk with Diabetes Mellitus and Rheumatoid Arthritis. *Autoimmun Rev.* 2017 Mar;16(3):308–12.
261. Ridker PM, Koenig W, Kastelein JJ, Mach F, Lüscher TF. Has the time finally come to measure hsCRP universally in primary and secondary cardiovascular prevention? *Eur Heart J.* 2018 Dec 7;39(46):4109–11.
262. Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014 Mar;35(9):578–89.
263. Dri E, Lampas E, Lazaros G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, et al. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life.* 2023 Jun 20;13(6):1420.
264. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol.* 1985 Dec;121(3):394–403.
265. Immanuel J, Yun S. Vascular Inflammatory Diseases and Endothelial Phenotypes. *Cells.* 2023 Jun 15;12(12):1640.
266. Khan F, Galarraga B, Belch JFF. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 May 30;6(5):253–61.
267. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Mar;74(3):480–9.
268. Singh S, Fumery M, Singh AG, Singh N, Prokop LJ, Dulai PS, et al. Comparative Risk of Cardiovascular Events With Biologic and Synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2020 Apr 27;72(4):561–76.

269. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DPM. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy: Results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep 30;56(9):2905–12.
270. Ljung L, Rantapää-Dahlqvist S, Jacobsson LTH, Askling J. Response to biological treatment and subsequent risk of coronary events in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016 Dec;75(12):2087–94.

